

Holdbarhetsforlengende prosess- og emballasjeteknologi for ferske produkter av taskekrabbe (Cancer pagurus)

Anne Marit Holten

Mat og teknologi

Innlevert: mai 2018

Hovedveileder: Jørgen Lerfall, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Førord

Denne masteroppgaven har vært en del av master i mat og teknologi (TMMT5003)ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap ved NTNU. Oppgaver er et samarbeid med Hitramat AS og problemstillingene i oppgaven er utarbeidet basert på innspill fra oppdragsgiver. Råstoffet ble levert av Hitramat AS og arbeidet ble gjennomført på laboratoriet ved NTNU Kalvskinnet.

Jeg vil rette en takk til Hitramat AS for muligheten til å jobbe med denne oppgaven og et godt samarbeidet. Vil spesielt takke Kolbjørn Ulvang hos Hitramat AS for raske svar på spørsmål, tips og råd knyttet til oppgaven og spesielt til krabbeproduktet som har svært god kjennskap til.

Takk til Lisbeth, Nanna, og Kari for hjelp og tips i arbeidet på laboratoriet på spørsmål knyttet til arbeidet her

Jeg vil rette en stor takk til min veileder førsteamanuensis Jørgen Lerfall for god veiledning og støtte med denne oppgaven. Uten hans hjelp og ekspertise ville det vært vanskelig å gjennomføre arbeidet knytte til denne oppgaven. Jeg setter stor pris på de konstruktive tilbakemeldingen jeg har fått. Dette har vært med på å gjør dette til en bedre oppgave.

Til slutt må jeg takk venner og familie for god hjelp og oppmuntring under master perioden. Jeg vil spesielt takke Lisa, Cathrine og Marit for hjelp til korrekturlesing og hjelp med Word.

Sammendrag

Denne oppgaven er et samarbeid med Hitramat AS som ønsket å undersøke mulighetene og effekten av å bruke ulike tilsetningsstoffer for å øke holdbarheten til produktet «fylt krabbeskjell av taskekrabbe». Krabbe er et lett bedervelig produkt som er utsatt for forringelse og god holdbarhet på produktene er avgjørende for distribusjon og omsetning av produktene. På grunn av det ønsket Hitramat AS å undersøke om tilsetningsstoffene sitronsyre, natriumacetat og brunalgen (butare) kunne være med å forbedre produktets holdbarhet (Forsøk 1). Et utvalg av de undersøkte gruppene ble videre brukt for å undersøke gassmiksens betydning for produktets holdbarhet og kvalitet (Forsøk 2). Hovedmålet med oppgaven var å forlenge produktets holdbarhet og på den måten gjøre produktet lengre tilgjengelig i butikk og gjøre det lettere å distribuere som ferskvare.

Som nevnt består denne oppgaven av to forsøk. Hensikten med forsøk en var å teste hvordan bruk av de ulike tilsetningsstoffene (syv ulike kombinasjoner + negativ kontroll) påvirket mikrobiell vekst (Jernagar og Long & Hammer) og dannelse av metabolitter (nedbrytningsprodukter til ATP). I dette forsøket ble det tilsatt 5% (w/w) tilsetningsstoff i forhold til produkt. I del to ble de to tilsetningsstoffene som hadde lavest mikrobiologisk vekst i del 1 valgt for å undersøke effekten av pakke gas. Krabbeproduktet tilsatt sitronsyre og alge + sitronsyre (2,5%) ble pakket i henholdsvis CO₂:O₂ (70:30) og CO₂:N₂ (70:30). Det ble deretter utført analyser av mikrobiell vekst (Jernagar og Long & Hammer) og dannelse av metabolitter (nedbrytningsprodukter til ATP).

De mikrobiologiske undersøkelser viser at alle tilsetningsstoffene senker veksten av aerobe og psykrotrofe bakterier. I forsøkene er det kun to av de undersøkte gruppene som overstiger anbefalt bakteriegrense for humant konsum på 10⁶ CFU/g ved lagringsforsøkets slutt. Kontrollprøven overstiger derimot denne grensen etter åtte dagers lagring (4°C). I forsøk 1 overstiger prøvene tilsatt 5% (w/w) alge 10⁶ CFU/g (på Long & Hammar) etter 15 dagers lagring (4 °C). I forsøk 2 ble dette observert for prøvene tilsatt 2,5% (w/w) alge + sitronsyre etter 12 dager lagring (4 °C). PH-målingen tyder på at pH verdier under 4 hemmer all vekst av de undersøkte mikroorganismene og forklarer den lav mikrobiologisk vekst i prøvene fra gruppene tilsatt sitronsyre. Det er videre vist at brunalge (butare) og natriumacetat har en antimikrobiell virkning uten at pH nivået i prøvene var senket.

Resultatet fra forsøk 2 viser en positiv effekt, med senket mikrobiologisk vekst, ved å benytte en gas miks bestående av CO₂:O₂ (70:30). Denne effekten synes derimot ikke når pH verdien blir for lav (pH<4) eller kimtallet (CFU/g) blir for høy.

Basert på resultatene kan en konkludere med at det å bruke ulike tilsetningsstoffer for å forlenge holdbarheten til det undersøkte krabbeproduktet. Av de undersøkte tilsetningsstoffene vil det være hensiktsmessig å benytte natriumacetat eller tørket alge i kombinasjon med MAP (CO₂:O₂, 70:30). Det er derimot en usikkerhet knyttet til om forbrukeren vil akseptere et produkt med et svakt grønnskjær. Dette bør undersøkes i et videre arbeid der også smak bør vurderes.

Abstract

This thesis is a collaboration with Hitramat AS, who wanted to investigate the possibilities and effects of using different preservatives to increase the durability of the product "filled crab shell with brown crab". Crab is a product prone to spoilage, and good shelf life is important for the distribution and sale of the products. For this reason, Hitramat AS wanted to investigate whether the preservatives citric acid, sodium acetate and brown algae (*Alaria esculenta*) could help improve product shelf life (experiment 1). A selection of the investigated groups was then further used to investigate the importance of the gas mixture for the shelf life and quality of the product (experiment 2). The main scope of this thesis is to prolong the products shelf life and therefore make the product more accessible in stores and make it easier to distribute as a fresh food.

As mentioned this thesis consist of two experiments. The purpose was to test how the use of the various preservatives (seven different combinations + negative control) affected microbial growth (iron ager and Long & Hammer) and the formation of metabolism (ATP degradation products). In this experiment, 5% (w/w) preservatives was added to the product. In part two the preservatives that had the lowest microbiological growth in part 1 was chosen to investigate the effect of modified atmosphere. The crab product that had citric acid and algae + citric acid (2.5%) were packed in CO₂: O₂ (70:30) and CO₂: N₂ (70:30) respectively. Subsequently, microbial growth (Iron Ages and Long & Hammer) and metabolism growth was examined (ATP degradation products). The microbiological survey shows that all preservatives reduce the growth of aerobic and psychrotrophic bacteria. Of the tested groups there is only two of the them that exceed the recommended bacterial limit for human consumption of 10⁶ CFU/g at the end of the experiment. The control test, however, exceeds this limit after eight days.

In experiment 1, who had 5% (w/w) algae 10⁶ CFU/g (on Long & Hammar) exceed bacterial limit after 15 days storage (4 ° C). And in experiment 2 it was observed for the samples added 2.5% (w / w) algae + citric acid after 12 days of storage (4 ° C). PH measurements indicates that pH level below four inhibits all growth of the examined microorganisms, and therefore explains the low microbiological growth in samples with the groups added citric acid. It appears that brown algae (*Alaria esculenta*)and sodium acetate has an antimicrobial effect without lowering the pH level in the samples.

The result of experiment 2 shows a positive effect with reduced microbiological growth using a gas mixture consisting of CO₂: O₂ (70:30). This effect, however, does not occur when the pH is too low (pH <4) or the colony count (CFU / g) becomes too high.

Based on the results it can be concluded that by using different preservatives the shelf life of the investigated crab will increase. Of the investigated preservatives the appropriate preservatives to use will be sodium acetate or dried algae, in combination with MAP (CO₂:O₂, 70:30). Although there is uncertainty tied to whether the consumer will accept a product with tints of green. This should be investigated in further studies, where taste also should be evaluated.

Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING	1
2. TEORI	3
2.1. TASKEKRABBE	3
2.1.1. <i>Fiske av taskekrabbe</i>	4
2.1.2. <i>Produksjon av taskekrabbe produkter</i>	4
2.1.3. <i>Markedet for taskekrabbe</i>	5
2.2. TILSETNINGSSTOFFER.....	5
2.2.1. <i>Sitronsyre</i>	6
2.2.2. <i>Natriumacetat (CH₃COONa)</i>	7
2.2.3. <i>Butare</i>	7
2.3. FORRINGELSE AV SJØMAT	8
2.3.1. <i>Autolytiske forandring</i>	9
2.3.2. <i>Lipid oksidasjon</i>	10
2.3.3. <i>Mikrobiell aktivitet</i>	11
2.4. PAKKING I MODIFISERT ATMOSFÆRE.....	13
3. MATERIAL OG METODER	15
3.1. RÅSTOFF	15
3.2. FORSØK 1 -EFFEKT AV TILSETNINGSSTOFFENE	16
3.3. FORSØK 2 -EFFEKT AV ULIKE PAKKEMETODER	17
3.4. TILLAGING AV MEDIER	18
3.4.1. <i>Peptonvann</i>	18
3.4.2. <i>Jernagar</i>	18
3.4.3. <i>Long & Hammer</i>	18
3.4.4. <i>Pseudomonas agar</i>	18
3.5. ANALYSEUTTAK	19
3.5.1. <i>Innveiing og fortytning</i>	19
3.5.2. <i>Platespreding og inkubering</i>	19
3.5.3. <i>Avlesning</i>	20
3.6. KJEMISKE ANALYSER	20
3.6.1. <i>ATP analyse med High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	20
3.6.2. <i>pH</i>	21
3.6.3. <i>Gassmålinger</i>	21
3.6.4. <i>Tørking av brunalge</i>	21
3.6.5. <i>Vanninnhold</i>	21
3.6.6. <i>Fett % etter Bligh and Dyer-metoden</i>	22
3.6.7. <i>Peroksidtall</i>	22
3.6.8. <i>Protein</i>	22
3.7. STATISTIKK	22

4.	RESULTAT	23
4.1.	RÅSTOFF	23
4.1.1.	Kjemisk sammensetning av råstoffet	24
4.2.	FORSØK 1- EFFEKTEN AV TILSETNINGSSTOFFENE	24
4.2.1.	Kjemisk sammensetning	24
4.2.2.	Gassmålinger	25
4.2.3.	Totalt aerobt kimtall	26
4.2.4.	H ₂ S produserende bakterier	27
4.2.5.	Totalt psykotroft kimtall	28
4.2.6.	PH	29
4.2.7.	Dannelse av peroksider	30
4.2.8.	Nedbrytningsproduktene av ATP	31
4.3.	FORSØK 2 –EFFEKT AV ULIK PAKKEMETODE	37
4.3.1.	Kjemiske sammensetning	37
4.3.2.	Gassmålinger	37
4.3.3.	Totalt aerobt kimtall	40
4.3.4.	H ₂ S produserende bakterier	41
4.3.5.	Totalt psykotroft kimtall	42
4.3.6.	Vekstkurve presumtiv Pseudomonas	43
4.3.7.	PH	44
4.3.8.	Dannelse av peroksider	45
4.3.9.	Nedbrytningsproduktet av ATP	46
4.3.10.	K-verdi	50
5.	DISKUSJON	51
5.1.	RÅSTOFFET	51
5.2.	FORSØK 1 -EFFEKT AV TILSETNINGSSTOFFENE	52
5.3.	FORSØK 2- EFFEKT AV PAKKEMETODE	55
5.4.	SAMMENLIGNING AV FORSØK 1 OG FORSØK EN	58
5.5.	SVAKHETER I ANALYSENE	59
6.	KONKLUSJON	60
7.	VIDERE ARBEID	61

[VEDLEGG 1: METODEBESKRIVELSE](#)

[VEDLEGG 2: MÅLING AV GASS](#)

[VEDLEGG 3: ADP MÅLINGER](#)

[VEDLEGG 4: HOVEDEFFEKT](#)

[VEDLEGG 5: UV-FLUORISERENDE PSUDOMONAS](#)

1. Innledning

Denne oppgaven er et samarbeid med Hitramat As, de ønsker å undersøke om det er mulig å forlenge holdbarheten til krabbekjøttet fra taskekrabbe som de selger. Hitramat AS er en bedrift plassert på Hitra i Sør-Trøndelag og er en del av Concelia konsernet. Hitramat AS produserer sjømatprodukter, men hovedsakelig produkter av taskekrabbe som selges i Norge og utlandet.

Foringelse av sjømat defineres som en endring av sensoriske egenskaper (utsende, smak, lukt og tekstur) noe som gjør produktet uegnet for konsum. Årsaken til forringelsen kan skyldes enzymer, dehydrering, oksidasjon, forurensing eller skader. Hovedårsaken til forringelse er mikrobiell vekst og metabolsk aktivitet. Dette er et globalt problem, da opp mot 25% av maten som produseres kastes på grunn av mikrobiell aktivitet (Robson et al., 2007). Det er derfor ønskelig å finne metoder som er med på å forlenge holdbarheten.

Bruk av konserveringsmiddel er en metode for å forlenge holdbarheten, det benyttes i mat for å hemme eller hindre forringelse, og veksten av patogene bakterier. Generelt er stoffene som blir tilsatt med på å senke vannaktiviteten og/eller virker antimikrobielt i produktet. Bruk av konserveringsmidler kombineres ofte med kjøling, for alene hindrer det ikke den mikrobielle aktiviteten. Forbrukerne stiller stadig strengere krav til produktene, og på grunn av dette bruker man stadig mildere konserveringsmetoder og modifisert atmosfære pakking (MAP). MAP kan være med på å forlenge holdbarheten til et produkt, ved at den er med på å hemmer mikrobiell vekst og oksidative reaksjoner (Kirtil and Oztop, 2016).

Etter samtaler med Hitramat As ble det valgt å ta utgangspunkt i fylt krabbeskjell som i dag pakkes MAP som består av CO₂:N₂ (70:30) og har en holdbarhet på åtte dager. Fylt krabbeskjell består av: krabbeskjell fylt med brunkrabbekjøtt, hvitkrabbekjøtt toppet med klo og rogn. Ut fra komponentene i det fylte krabbeskjellet ble det valgt å fokusere på det hvite og brune krabbekjøttet da dette er hovedandelen av produktene. Det er ønskelig å forlenge denne holdbarheten lengst mulig slik at Hitramat As kan utvide markedet sitt, spesielt i Norge.

Hitramat As ønsker å undersøke om det å bruke tilsetningsstoffer i krabben ville være med å forlenge holdbarheten. Siden det er utført liten eller ingen forskning ved bruk av tilsetningsstoffer i krabbe ble det valgt å bruke sitronsyre (Bou et al., 2017) og natriumacetat (Ibrahim Sallam, 2007), som er brukt på ulike fiskearter for å forlenge holdbarheten.

Det ble i tillegg valgt å bruke brunalge, som har et høyt innhold av antioksidanter og er et nytt og mer naturlig alternativ til de tradisjonelle tilsetningsstoffene (Skjermo et al., 2015).

Hovedmålet med oppgaven er å forlenge produktets holdbarhet og på den måten gjøre produktet mer tilgjengelig i butikk og gjøre den lettere å distribuere som ferskvare. På grunnlag av dette ønskes det å undersøke om bruken av tilsetningsstoffene sitronsyre, natriumacetat og brunalgen (butare) (forsøk 1) har noe effekt. Et utvalg av forsøk 1 ble videre brukt for å undersøke om gassmiksen hadde betydning for produktets holdbarhet og kvalitet (forsøk 2). Det ble studert hvordan bruken av tilsetningsstoffene og gassmiksen påvirker pH, nedbrytningsprodukter til ATP, lipid oksidasjon (PV-verdi) og den mikrobielle veksten på Jernagar, Long & Hammer. På grunn av tidsbegrensinger ble det valgt å ikke gjennomføre sensoriske analyser selv om dette var planlagt og bør vurderes i videre studier.

2. Teori

2.1. Taskekrabbe

Taskekrabbe (*Cancer pagurus*) lever på grunt vann og ned til 100 meters dyp. Den lever gjerne i tareskogen og foretrekker at bunnen er hard, men kan også leve på bløtere bunntyper. Taskekrabben spiser både små og store krepsdyr som blåskjell, snegler og andre skjell. Skjellet til taskekrabbe er oval i formen og kan bli opptil 25 cm i bredde, den er ofte mellom 15 cm og 22 cm i lengde. Hannene er større enn hunnene, og de kan få en vekt på over 2,5 kilo. De har øyne i en fordyping midt i forkantene av skjellet, der sitter også to små antenner. Taskekrabben har ferm gangbein, der de fremste er to store klør som de bruker til å skaffe mat (Havforskningsinstituttet, 2008). Fiske etter krabbe skjer etter at de er blitt kjønnsmoden, dette skjer ca. når de er 5 år gamle. Fiske skjer på høsten, fra juli til november, for da er matinnholdet størst (Woll, 2005).

Det er få sykdommer og parasitter som er knyttet til taskekrabbe, men det er utført relativt lite forskning på dette området. Krabben kan derimot akkumulere DSP-toksiner ved at den spiser giftige blåskjell. Toksinet er funnet i levermassen til krabben, men ikke rognen og det hvite kjøttet. DSP-toksinet produseres av mikroalger og kan gi diaré-symptomer hos mennesker (Woll, 2005).

Kadmium akkumuleres i skalldyr, skjell og er et tungmetall som er naturlig utbredt på jordskorpa. Inntak av kadmium over tid kan gi nyre- og skjelettskader og gir økt sjanse for utvikling av kreft. Norge og EU har kun satt en grenseverdi for kadmium i klokjøttet (0,5 mg/kg), men det finnes ingen grenseverdier for brunt kjøtt. Forskning utført av Havforskningsinstituttet har vist at krabbekjøtt fra Nord-Norge har større innhold av kadmium sammenlignet med krabbe fanget i Sør-Norge. Deres undersøkelse viser også at brunmaten fra hel kokt krabbe og fylte krabbeskjell har et høyere innhold av kadmium enn grenseverdien til klokjøttet. Dette skyldes at tungmetallene samles opp i fordøyelseskjertelen som er en stor del av den brune maten. Selv om det ikke er satt noe grenseverdi for brunt krabbekjøtt anbefaler mattilsynet at kvinner i fruktbar alder, barn og ammende ikke spiser det (Frantzen et al., 2018).

2.1.1. Fiske av taskekrabbe

Taskekrabbe er utbredt fra Middelhavet til Atlanterhavet. Hovedutbredelsesområde er langs den engelske, irske og skotske kysten, I Norge er den vanlig langs hele kysten helt opp til Troms, størstedelen lever på Vestlandet og langs Helgelandskysten figur 1 viser denne utbredelsen (Havforskningsinstituttet, 2008).

Fiske av krabbe foregår hovedsakelig på høsten og skjer ved bruk av teiner. Krabben sorteres i ulike kategorier ut fra kvalitet av fiskerne. Hunkrabben og hannkrabben sorteres hver for seg i de ulike kategoriene. Behandlingen av krabben etter fangst er også viktig for å beholde kvaliteten og unngå dødelighet. Krabbene lagres i plastkasser ombord. For å unngå dødelighet er det viktig at

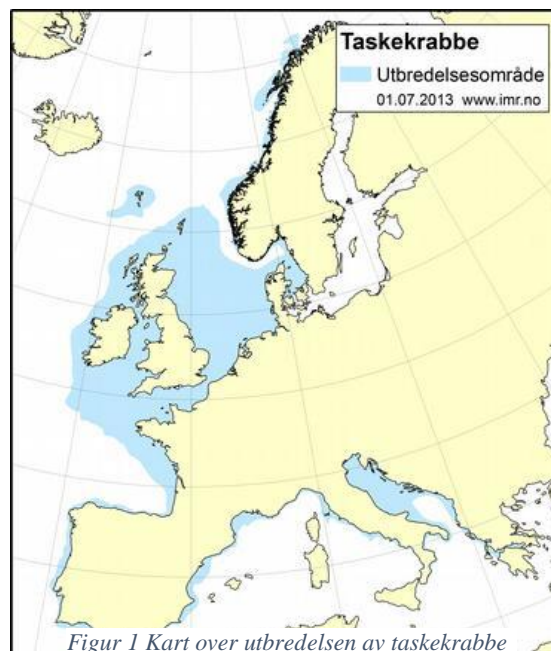
krabben behandles varsomt og ikke kastes i kassene. Krabben bør ikke utsettes for direkte sollys og trekk siden dette forårsaker uttørking. Ved å holde krabbene fuktig reduseres sjansen for uttørking. Krabben skal leveres levende og bør leveres sammen dag som den er fanget.(Woll, 2005).

2.1.2. Produksjon av taskekrabbe produkter

Hunkrabben selges som hel kokt krabbe om matinnholdet i krabben er høyt nok.

Resten av krabbene blir kjølt ned med isvann for å senke aktiviteten i krabbene. Arbeidere deler opp krabbene ved at klørne vrís av, kløster slås slik at det faller av.

De oppdelte delene sendes videre på samleband til koking og avkjøles i rensset saltvann hente fra 60 meter dyp. Delene går til ulike deler av fabrikk, de beste klørne pakkes og noe fryses. De dårligste går til oppdeling sammen med kløsteret. Kløsterne og bena separeres ved hjelp av en trommel som deretter homogeniserer det og oppbevares ved 0-4 °C frem til bruk. Kjøttet i skjellet skrapes av arbeidere og fraktes videre til homogenisering og oppbevares ved 0-4 grader frem til bruk. Ved produksjob av fylt krabbeskjell, pakkes det homogeniserte brune og hvite kjøttet i krabbeskjell for hånd og toppes med klo og rogn (Utviklings sjef Kolbjørn Ulvang 2018. pers.med).



Figur 1 Kart over utbredelsen av taskekrabbe (Havforskningsinstituttet, 2008)

2.1.3. Markedet for taskekrabbe

Fiske etter krabber foregår hovedsakelig fra juni til november, der høysesongen er fra august til oktober. Det er i denne perioden Hitramat AS får inn mest krabbe, på en god dag kan de ta imot 50 tonn. I dag har Hitramat AS et marked der de eksporterer ca. 25% av produktene sine og de resterende 75% selges i Norge. Hitramat eksporterer hovedsakelig til Frankrike, men de selger også til land som Sverige, Irland og England. Selv om England og Irland også produserer taskekrabbe selger de mye produkter til Kina der markedet for krabbe stadig bli større. Hitramat ønsker å kunne selge sine produkter til Kina. Kina har ennå ikke godtatt salg av slike produkter fra Norge . På grunn av at England og Irland eksporterer mye hit har de fått et større marked i Europa.

Produkter de selger er hel kokt krabbe, kokte krabbe klør, fylte krabbeskjell og industriblokker. Det er kun 6-8% av krabbene som har god nok kvalitet og høyt nok matinnhold til å selges som hel kokt krabbe. Kokte krabbe klør er det produktet de selger mest av og Hitramat har stadig for lite av disse. Fylte krabbeskjell består av hvitt- og brunt krabbekjøtt som er pakket i MAP. Hitramat AS selger ca. 1,5 millioner fylte skjell i året og håper å selge mer. På grunn av den korte holdbarheten (åtte dager) er det få butikker som ønsker å selge produktet (Utviklings sjef Kolbjørn Ulvang 2018. pers.med).

2.2. Tilsetningsstoffer

Tilsetningsstoffer er en fellesbetegnelse på stoffer som tilsettes i mat for å erstatte sukker, gi smak, gi farger eller øke holdbarheten. (Mattilsynet, 2012) For å kunne benytte et tilsetningsstoff må dette være godkjente av EU å finnes i forordning (EF) 1333/2008 del E. Alle er godkjent av European food safety autoristis (EFSA) før den havner på listen over godkjente stoffer. Det er tre vilkår som må være oppfylt for at tilsetningsstoffer kan bli godkjent. Det må ikke utgjøre en helseisiko, det må være et behov og skal tilslutt ikke villedde forbrukerne (Mattilsynet, 2013).Tilsetningsstoffene deles ofte inn i ulike grupper som konserveringsmiddel, fargestoffer, søtstoffer, antioksidanter og konsistensmiddel. Alle tilsetningsstoffene har et E-nummer som representere gruppen den tilhører. Mengden av hvert tilsetningsstoff som tilsettes skal begrenses sånn at det ikke overstiger det anbefalte daglige inntaket (Carocho et al., 2018). Når det brukes et tilsetningsstoff i et næringsmiddel skal dette fremgå i ingrediensliste etter regelverket. Dette dekkes av Matinformasjonsforskriften. Bortsett fra enkelte unntak som er beskrevet i Matinformasjonsforskriften skal tilsetningsstoffer og enzymer oppføres under hvilken kategori den tilhører etterfulgt av sitt spesifikke navnet eller sitt E-nummer (matinformasjonsforskriften, 2014, siste endre 2017).

Det er viktig å skille mellom tilsetningsstoffer og teknisk hjelpestoffer, siden dette innebærer at man må følge ulike regelverk. Spesielt i sjømatbransjen har dette vært et problem. Det som skiller disse er at det tekniske hjelpestoff brukes for å oppfylle et spesifikt behov i et prosessstrinn og skal ikke virke inn på det ferdige produktet. Eksempel på et teknisk hjelpestoff er bruk av lut i produksjon av tran. Mens et tilsetningsstoff har flere funksjoner i et næringsmiddel. Tilsetningsstoffet har flere brukerområder enten ved at det øker holdbarheten, påvirker farge og smak eller endre konsistensen (Mattilsynet, 2014).

2.2.1. Sitronsyre -E330

Sitronsyre er en svak syre som finnes i flere frukter og grønnsaker. Det er et naturlig konserveringsmiddel og virker pH regulerende i næringsmiddel. Det brukes blant annet i brus, syltetøy, fiks og frukt. Sitronsyre har E-nummer 330 og er en antioksidant som vil si at den hemmer oksidasjon ved at den hindrer dannelsen av frie radikaler på ulike måter. (Yılmaz et al., 2008) Den antimikrobielle aktiviteten til sitronsyre skyldes udisosiert sitronsyres som passerer lett igjennom cellemembranen og syrer cytoplasmaet som fører til senkning av pH i produktet (Qiu et al., 2014). Sitronsyre ble først isolert av Carl Scheele fra sitronsaft i 1784, og frem til 1919 da det ble oppdaget at *Aspergillus nigeri* produserte sitronsyre. Noe som førte til at sitronsyre produseres ved å bruke *A.nigeri* (Medina and Vargas, 2012) Bruk av sitronsyre øker, i 2008 var 64% av sitronsyre brukt i USA brukt i ulike mat- og drikkeprodukter (Medina and Vargas, 2012). Sitronsyrer er mye brukt i matindustrien, men også brukt i kosmetikk og legemiddelindustrien. Den har vist seg å ha god effekt på fiskefilet siden den fungerer antimikrobielt og er en antioksidant som hemmer oksidasjon som fører til dårlig lukt og smak. Det å tilsette en organisk syre som sitronsyre er med på å senke pH i produktet som i noen tilfeller kan ha negativ effekt. Ved lav pH kan hemoglobin lipid oksidasjon skje raskere (Bou et al., 2017). I tillegg til at sitronsyrer kan hemme oksidasjon har den vist seg å redusere det totale bakterieantallet, og hemme veksten av H₂S produserende bakterier, melkesyrebakterier og Enterobacteriaceae på CO₂-pakket laks (Schirmer et al., 2009).

2.2.2. Natriumacetat -E262

Natriumacetat er et salt av natrium og eddiksyre. Det blir fremstilt ved natriumhydroksid eller natriumkarbonat løses i eddiksyre (Liu et al., 2015). Natriumacetat har E-nummer 262 og regnes som en antioksidant. Det brukes ofte i næringsmiddel sammen med eddik og brukes blant annet i potetgull. Natriumacetat er et konserveringsmiddel som brukes for å kontrollere pH og som smakstilsetning i mat. Bruk av MAP eller vakuu sammen med natriumacetat har vist seg å ha holdbarhetsforlengende effekt på kjølelageret fisk (Yesudhasan et al., 2014). Flere typer sodium-salter har blitt brukt for å hemme mikrobiell vekst, forbedre ulike sensoriske egenskaper og gi lenger holdbarhet til kjøtt, fisk og fjærkre. Natriumacetat og laktat har vist seg også hatt en god effekt på ulike patogener som *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* og *E. coli* (Ibrahim Sallam, 2007). Natriumacetat har vist seg å ha en god antibakteriell effekt spesielt for vekst av aerobe bakterier og er med på å hemme utvikling av den naturlige floraen i produktet. Det har også vist seg å ha en effekt på veksten av H₂S produserende bakterier (Yesudhasan et al., 2014)

2.2.3. Brunalgen Butare (*Alaria esculenta*)

Alger deles inn i to grupper, mikroalger og makroalger. På grunn av at alger har et lavt fettinnhold, høyt innhold av polysakkarider, høyt innhold av vitaminer og mineraler samt innholdet av ulike bioaktive komponenter er de en god kilde til sunn mat (Gupta and Abu-Ghannam, 2011). Butare er en marin brunalge med gul/brun farge som vokser blant annet langs Trøndelagskysten. Den har et høyt proteininnhold som gjør at det er interessant å bruke i mat og fôr (Skjermo et al., 2014) Butare er også rik på karbohydrater, vitaminer og spormetaller (Handå et al., 2009)

Mange marine alger produserer antimikrobielle komponenter som kan være med på å inhibere bakterier, virus og sopp. De antimikrobielle komponentene er avhengig av ulike faktorer blant annet art, type mikroorganismer, vekstforhold og sesong (Liao et al., 2003) Brunalger har vist seg å ha et høyt innhold av polyfenoler (phlorotannins) som er gode antioksidanter, anti-kreftfremkallende og betennelsesdempende. Polyfenolen har også vist seg å ha god effekt i mat og virker antimikrobielt mot patogener bakterier og antibiotika resistente bakterier (Eom et al., 2012) I tillegg har et høyt innhold av polyfenoler vist seg å ha god effekt for å hemme lipid oksidasjon (Roohinejad et al., 2017)

2.3. Forringelse av sjømat

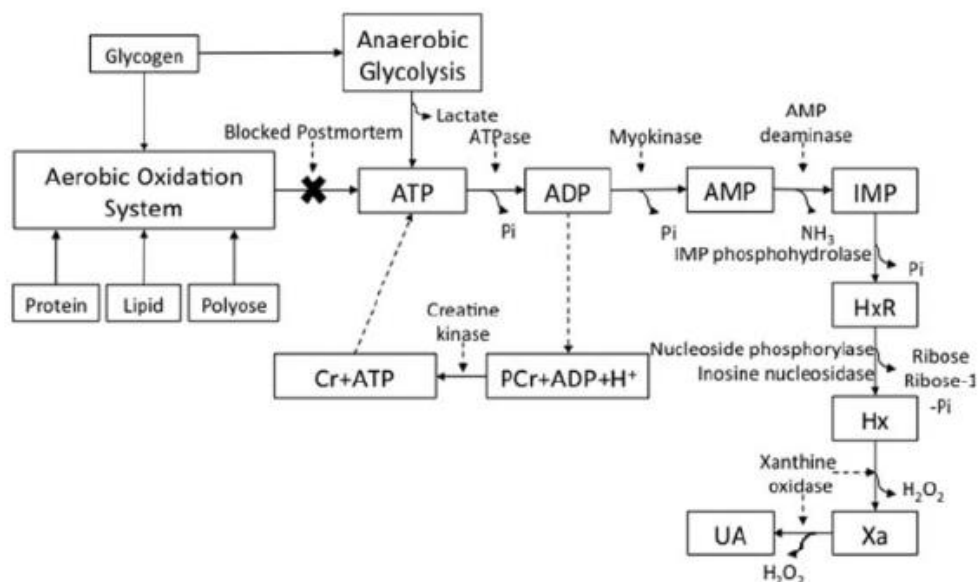
Forringelse er den prosessen der mat til slutt ikke kan konsumeres av mennesker. Dette oppfattes hovedsakelig som sensoriske forandringer som smak, lukt, utsende og tekstur. Disse forandringer kan skyldes en rekke ting som luft, fuktighet, lys, temperatur og mikrobiell vekst (Tanner, 2016). Det totale økonomiske tapet knyttet til matforringelse er noe ukjent, men det har store økonomiske tap. Det er estimert at ca. 25 % av alle mat som produseres kastes på grunn av mikrobiell forringelse (Petruzzi et al., 2017). Fisk er svært utsatt for forringelse noe som fører til en kort holdbarhet. Forringelsen av fisk skyldes hovedsakelig mikrobiell aktivitet, men dette varierer fra art til art. Blant annet vider foredling autolytiske prosesser, vanntap og oksidasjonsprosesser være med på å ende kvaliteten (Ryder, 2014).

Både pH, vannaktivitet, temperatur og pakkemetode påvirker hvilke mikroorganismer som er tilstede, deres vekst og aktivitet. Holdbarheten til fisk kan variere fra dager til måneder. Pakkemethoder som modifisert atmosfære pakking (MAP) eller vakuum og kjøletemperaturen påvirker hvilke mikroorganismer som vokser og deres metabolisme. For mengde oksygen tilstede selekterer for hvilke bakterier som kan vokse, oksygen påvirker også oksidasjonen i produktet (Comi, 2017)

pH brukes som et mål på surheten og alkalitet i en løsning på en logaritmisk skala. Alle mikroorganismer har et optimalt pH-område (Madigan et al., 2015). Derfor kan det å senke vannaktiviteten eller pH være med på å hemme vekst av mikroorganismer og dermed forbedre holdbarheten (Ghaly et al., 2010) pH er ikke alltid en god indikator for ferskhet eller forringelse. Siden pH kan variere mellom prøvene kan det gjøre det vanskelig å kalkulere ut fra en enkel verdi. Selv om noe forskning tyder på at pH kan brukes som en indikator på ferskhet (Boziaris, 2013). Vannbindingsevnen til musklene er avhengig av pH. For når pH er nære det iso-elektriske punktet (ca pH 5,5) er vannbindingsevne lav og musklene slipper vann. Dette skyldes at ved det iso-elektriske punktet (pI) er bindingen mellom protein-protein strekt og det er lite plass til å holde på vannet (Matak et al., 2015).

2.3.1. Autolytiske forandring

Den tidlige forandringen av fisken og ferskhet skyldes autolytiske forandringer. Enzymaktivitet kan blant annet påvirker til dårlig smak. Dette skyldes i alle hovedsak nedbrytes av adenosintrifosfat (ATP) denne nedbryting av er illustrert i figur 2



Figur 2 Nedbrytningsprosessen av ATP i fiskemuskel (Hong et al., 2017)

Avhengig av fiskeart brytes all ATP ned innen de første 24 timene etter dødstidspunktet (Ocaño-Higuera et al., 2009). Det er to muligheter for musklene å opprettholde ATP gjennom kreatin fosfat-veien og/eller anaerob glukose-vei. Nedbrytingen av ATP til inosin monofosfat (IMP) fører til den den ferske smaken i fisk og sjømat. IMP akkumuleres opp i mange fiskearter etter død, mens for krepsdyr er adenosin monofosfat (AMP) hovednukleotider etter død (Hong et al., 2017) Den videre nedbryting av IMP til inosin (HxR/In) og tilslutt Hyposantin (Hx) skjer saktere, dette skyldes enzymer, men kan også skyldes mikroorganismer som *Pseudomonas* spp. og *P.phosphoreum*. (MASSA et al., 2005) Hx blir som oftest ikke oppdaget før bakteriene de inneholder er 10^6 CFU/g (Hong et al., 2017). Mye hypoxantin og inosin i kjøttet fører til tap av ferskhet og bitter smak (Ocaño-Higuera et al., 2009). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) er en mye brukt metode for å undersøke nedbryting av ATP og beregningen av K-verdien for å vurdere ferskheten av mat (Cheng et al., 2015).

K-verdi blir brukt som en indikasjon på kjemisk ferskhet. K-verdi kalkuleres ut fra nedbryting av ATP komponentene. Det beregnes ut fra andelen HxR og Hx delt på summen av ATP og nedbrytelsesproduktene (Cheng et al., 2015).

$$K - verdi = \frac{In + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + In + Hx} * 100\%$$

En k-verdi på under 20% regnes som en meget fersk fisk, og k-verdi på over 60% er øvre grensen i det fleste land (Ocaño-Higuera et al., 2009). Nedbrytingskomponenten til ATP gir best resultatet før det skjer signifikant mikrobiologiske ødeleggelse. Det er derfor svakheter ved bruk av K-verdier som en indikator på ferskhet, siden den er avhengig av art, sesong, drapsmetode og behandling av fisken. (Hong et al., 2017). Undersøkelse utført på hummer og reker lagret på is i 72 timer antyder at K-verdi for freskhetsindikator på krepsdyr bør undersøkes nærmere (Mendes et al., 2001).

2.3.2. Lipid oksidasjon

Lipid oksidasjon er en viktig faktor som er med på å begrense holdbarheten til et produkt ved at det fører til sensoriske endringer som dårlig lukt og smak, men også fargeendringer.

Oksidasjonen kan også være helseskadelig for det kan dannes produkter som kan være giftige for mennesker (Embuscado, 2015) Lipider i mat er utsatt for oksidasjon noen som resulterer i tap av vitaminer og bioaktive forbindelser. Lipid oksidasjon kan skje gjennom enzymatisk eller ikke enzymatiske prosesser. Ikke enzymatiske oksidasjon deles inne i fotooksidasjon og autooksidasjon, og begge skjer ved tilstedeværelsen av oksygen. Enzymatisk oksidasjonen skjer lite i kjøtt og kjøttprodukter og er derfor ikke relevant her (Mariutti and Bragagnolo, 2017). Oksidasjonen kan øke med for eksempel varme, metaller og lys, men kan inhiberes ved bruk av antioksidanter. Ved lipid oksidasjon skjer det en kjede av reaksjoner som frigjør primære produkter i form av peroksider og hydroperoksider som videre bli oksidert til sekundære oksidasjonsprodukter som i hovedsak er aldehyder. Det dannes også tertiær oksidasjonsprodukter i form av kortkjedede syre (Gunstone, 2004)

Primære oksidasjonsprodukter kan måles ved hjelp av perioksidverdi (PV) er ofte uten lukt og smak. Mens de sekundære oksidasjonsproduktene gir oljen vond smak og lukt og måles i form av anisidintall (AV). Både de primære og sekundære oksidasjonsproduktene sammen med de frie radikalene er med på å ødelegge matvaren (Ghorbani Gorji et al., 2016). Det er derfor ønskelig å hindre lipid oksidasjonen i matvarer. Antioksidanter vil være med på å hemme utviklingen av oksidasjonen. Pakking av matvaren kan også være med på å minke oksidasjonen ved at den fungerer som en barriere (Barden and Decker, 2016).

2.3.3. Mikrobiell aktivitet

Bakterier er hovedårsaken til forringelser i proteinholdige matvarer som kjøtt, fjærkre, fisk, skalldyr og melk. Gjær og mugg kan også virke ødeleggende på mat, men disse vokser saktere enn bakterier (Petruzzi et al., 2017). Forringelsesfloraen til et produkt kommer fra den naturlige flora, men mikroorganismer kan overføres til maten gjennom krysskontaminering før og under prosessering fra luften, overflaten, maskiner og mennesker. Floraen til produktet vil ikke være det samme i starten som mot slutten av holdbarhetstiden (Petruzzi et al., 2017). I tillegg er det bare et fåtall av bakteriene i den mikrobielle floraen som har skyld i forringelsen. Disse mikroorganismer kalles ofte for spesifikke forringelsesorganismer (Alfaro and Hernandez, 2013).

Mikroorganismer assosiert med fiskeprodukter domineres av psychotrofe aerobe eller fakultativt anaerobe gram-negative bakterier, blant annet *Pseudomonas Shewanella*, *virbor* og *photobacterium*. Det er også blitt isolert gram-positive organismer i sjømat som *Bacillus*, *Clostridium*, *lactobacillus* og *Brocothrix* (Sivertsvik et al., 2002a). Disse type forringelsesbakterier er med på å bidra til uønsket lukt og smak. Det er derfor viktig å identifisere de spesifikke forringelsesbakteriene for å kunne bestemme holdbarheten (Alfaro and Hernandez, 2013). Studier utført på krabbe antyder at det er de spesifikke forringelsesbakterier som ødelegger krabben. For hel uoprosessert krabbe er det funnet *Shewanella putrefaciens* og *Pseudomonas spp*, mens for kokt kjølte krabber er *Clostridium* eller *Bacillus* sporedannende bakterier (Robson et al., 2007).

Pseudomonas er gram-negativ aerob bakterier, men noe arter kan vokse med tilstedeværelse av oksygen sammen med nitritt eller andre elektorakseptorer. Det er en mesofil bakterie som har et optimumsområde mellom 25-35 °C, selv om de fleste er psykotrofe kan vokse ved kjøletemperaturer som f.eks. *pseudomonas spp*. Optimum pH er over 5,8 alt under dette senker bakteriens veksten. *Pseudomonas* er ofte funnet som en del av floraen i lagret fisk og er en spesifikk forringelsesbakterie i marine og tropiske fisker. Veksten kan normalt hemmes ved å pakke i modifisert atmosfære (MAP) uten oksygen, men *Pseudomonas* og H₂S produserende bakterier har blitt funnet i fisk pakket i oksygen og i MAP (Andreani and Fasolato, 2017).

Shewanella er en H₂S produserende bakterie som er gram-negativ, der de fleste artene er psykrofile og halofile, og vokser helt ned til 4 °C (Satomi, 2014). *Shewanella* er en spesifikk forringelsesorganismen som ødelegger kjølt mat som sjømat produkter. Siden bakteriene er aerob og fakultativ anaerob er den funnet i pakker med og uten oksygen (Andreani and Fasolato, 2017). Den har evnen til å produsere sulfiter og H₂S, og i marine fiskearter redusere den TMAO til TMA som danner dårlig lukt (Satomi, 2014).

For å identifisere disse bakteriene er blant annet Long & Hammer medium mye brukt på sjømat (Alfaro and Hernandez, 2013). Kvaliteten og holdbarheten til fisk er ofte estimert ut fra totalt aerobt psykotrofisk kimtall som ikke bør overstige 10⁶ CFU/g for humant konsum. Når det totale aerobe psykotrofiske kimtallet er mellom 10⁷-10⁸ CFU/g vil dette være sensorisk merkbart på produktet (Broekaert et al., 2011).

En del fiskearter, krepsdyr og bløtdyr inneholder Trimetylaminoksid (TMAO) som øker vekst av mikroorganismer og aktivitet. Generelt har ferskvannsararter lavere innhold av TMAO enn saltvannsararter. TMAO omdannes til trimetylamin (TMA) når fisk og sjømat lagres, og det er denne forbindelsen som gir dårlig lukt til fisken spesielt i produkter over pH 6,5. Denne reduksjonen av TMAO skyldes hovedsakelig bakterier, men enkelte arter kan inneholde et enzym som bryter ned TMAO til dimetylamin (DMA) og formaldehyd. Bakterier som *Aeromonas*, de fleste *Enterobacteriaceae*, *Shewanella*, *Vibrio* og *Photobacterium* reduser TMAO til TMA. Denne reduksjonen av TMAO er ikke avhengig av oksygen og kan derfor skje i vakuum og modifisert atmosfære (Ryder, 2014).

2.4. Pakking i modifisert atmosfære

Det er et økende behov for at matvarer skal ha lenger holdbarhet, en måte å oppnå dette på er ved bruk av modifisert atmosfære pakking (MAP). MAP er endring av atmosfæren ved å fjerne eller erstatte atmosfæren som omgir produktet. Dette kan være vakuum der luften fjernes for emballasjen omslutter produktet eller det kan vær at luften erstatte med en gassblanding (McMillin, 2008). Gass sammensetningen bør tilpasses hvert enkel matvare og deres egenskaper for å oppnå optimale resultat av pakkingen (Zhang et al., 2015).

MAP kan være med på å forlenge holdbarheten til fisk og sjømat ved at det inhiberes mange mikroorganismer, men også gjør det lettere å transportere og distribuere. Det er stadig mer populært og bruke MAP til pakking av mat (Macé et al., 2013). Ved å pakke sjømat i MAP kan det være med på å forlenge holdbarheten med 1,5-2 ganger sammenlignet om de var bare pakket i vanlig luft. For fet sjømat bruker hovedsakelig CO₂ og N₂, men for sjømat med lavere fettinnhold brukes ofte det en kombinasjon av CO₂, N₂ og O₂ for å hindre vekst av anaerobe mikroorganismer (Zhang et al., 2015).

MAP kombinert med kjøling kan være med på å forlenge holdbarhet på næringsmidler, men den kan også være med å forandre ulike parameter i produktet. Derfor vil ikke alltid MAP alene fungere for å forlenge holdbarheten og det kan være nødvendig å kombinere det med andre metoder (Mastromatteo et al., 2010).

Karbondioksidgassen (CO₂) som er mest brukt i MAP, og hemmer mikroorganismer som mugg og anaerobe bakterier. CO₂ er mye brukt til pakking av fisk siden den kan inhibere veksten av forringelsesbakterier (Sivertsvik et al., 2002a). Den hemmer blant annet vekst av gram-negative bakterier som *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens* og *Pseudomonas fluorescens*, og gram-positive bakterier som *Brochothrix thermosphacta* og *Bacillus circulans*. Ikke alle forringelsesbakterier er sensitiv for CO₂, som for eksempel melkesyrebakterier (Bozariis, 2013). Effekten av den modifiserte atmosfæren på veksten av mikroorganismer er avgjøres ut fra hvor mye av CO₂ som er løst i produktet. Dette er avhengig av hvor mye fett, vann og trykket av CO₂. Hvordan CO₂ innvirker på bakterier veksten er kompleks, 4 mekanismer har blitt identifisert:

1. Endre cellemembranen funksjon for å ta opp næringsstoffer og absorpsjon.
2. Inhibering eller reduksjon av enzymer,
3. Trenger igjennom bakterier membranen og endre den intracellulære pH.
4. Endring av egenskapen til proteinet (Sivertsvik et al., 2002a).

Oksygen og Nitrogen benyttes også mye i pakking av næringsmidler. Nitrogen har ingen bevist effekt på mikroorganismer. Derfor brukes nitrogen hovedsakelig som en fyllgass sammen med de andre gassene for å opprettholde volumet i forpakningen (Zhang et al., 2015, Mastromatteo et al., 2010). Ved pakking av de fleste matvarer ønsker man ikke å bruke oksygen, den viker hemmer på aerobe mikroorganismer. O₂ er også ansvarlig for uønskede reaksjoner som oksidasjon (Mastromatteo et al., 2010). O₂ har noe ønskelig egenskaper og brukes derfor i pakking av matvarer. Det brukes blant annet til å pakke levende skalldyr, for dette øker overlevelsen og dermed holdbarheten. O₂ sammen med CO₂ har vist seg i å ha en effekt på mager fisk, for O₂ er med på å hemme nedbrytes av TMAO til TMA (Boziaris, 2013).

3. Material og Metoder

Forsøket består av to ulike delforsøk hvor hensikten er å teste mikrobielle aktivitet og kjemisk parameter på en blanding av hvitt og brunt krabbekjøtt av taskekrabbe. Lik mengde hvit og brunt krabbekjøtt blandes sammen. Blandingen i forsøk 1 tilsettes natriumacetat, sitronsyre og tørket brunalge alen eller i kombinasjon. De ulike gruppen pakkes i CO₂:N₂ (70:30).

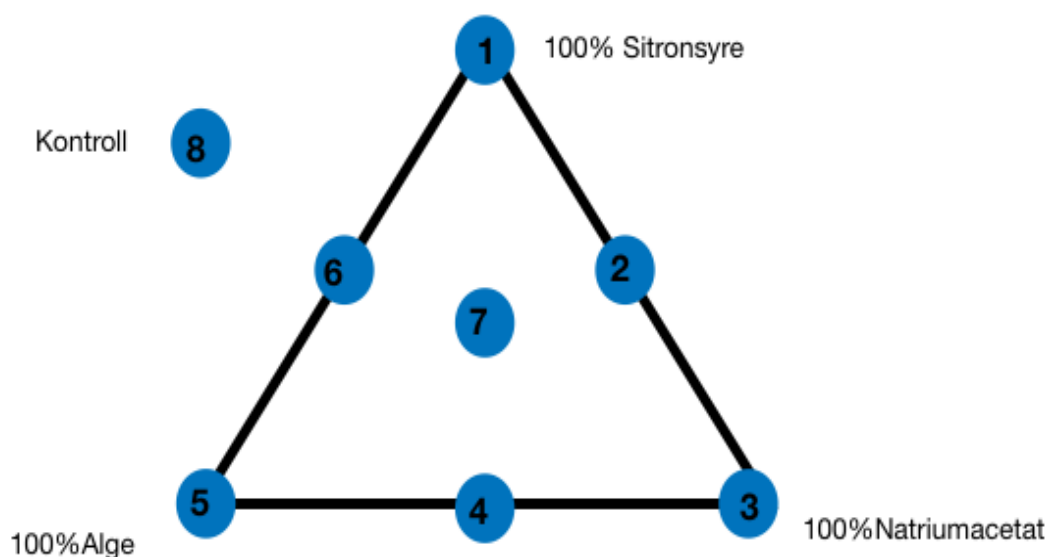
I forsøk 2 ble de beste to kombinasjonene fra forsøk 1 valgt ut fra den mikrobielle veksten. Blanding med sitronsyre og alge + sitronsyre ble valgt å pakkes i CO₂:N₂ (70:30) og i CO₂:O₂ (70:30) for å vurdere hvilken effekt oksygen har på krabbekjøttet sammen med tilsetningsstoffene.

3.1. Råstoff

Krabbekjøttet som benytte i dette forsøket består av en blanding fra flere individer som er fanget i område fra Nord-Troms og langs den norske kysten. Krabben kokes etter den er oppdelt i ulike deler ved 100 °C i sjøvann hentete fra 60 meter dyp. De ulike delen avkjøles også i sjøvann. Det brune kjøttet finner man i selve krabbeskjellet/kroppen og dette tas ut med skje av arbeider. Alt det brune kjøttet fra samme produksjons dag homogenisere ved å bruke av store miksere. Det hvite krabbekjøtt ekstraheres fra gangbeina og klør ved å klemme med en tommel som knuser beina og separer ut det hvite kjøttet. Det homogeniserte hvite og brune krabbekjøttet er pakket i plastbeger på 1 kg og fryst ned til -22 °C for forsøk 1. Det homogeniserte kjøttet brukt i forsøk 2 var platefryst hvitt kjøtt og brunt kjøtt. Råstoffet oppbevares videre i -22 °C under frakt fra Hitramat AS til Trondheim, og lagres ved samme temperatur i Trondheim. Krabbekjøttet ble lagt i kjøleskap (4°C) 24 timer før den pakkes i modifisert atmosfære slik at det er tint til forsøket starter.

3.2. Forsøk 1 -Effekten av tilsetningsstoffene

I forsøk 1 ble det testet ulike konsentrasjoner og blandinger av tre ulike tilsetningsstoffer (natriumacetat, brunalge, sitronsyre) for å se hvem og ved hvilken konsentrasjon/ blanding som ga best holdbarhet. Dette forsøks design er illustrert i figur 3. De tre ulike tilsetningsstoffene ble tilsatt i en blanding av like mengder hvitt krabbekjøtt og brunt krabbekjøtt. Krabbekjøttet ble blandet godt sammen med en skje, det brune kjøttet dominerer fargen til blandingen. Det ble blandet sammen tre kilogram brunt krabbekjøtt og tre kilogram hvitt krabbekjøtt, 3 kg brunt krabbekjøtt og 3 kg hvitt krabbekjøtt, denne blandingen ble så delt i 8 like deler på 650 gram. Blandingene ble delt i 8 like deler på 650 gram. De 650 gram med krabbekjøtt ble blandet med tilsetningsstoffene slik at det blir en konsentrasjon på 5% tilsetningsstoff i forhold til produkt ut fra tabell 1. Sitronsyre, natriumacetat og tørket alge tilsettes tørr i prøven, da alt finnes i pulver form. De ulike blandingene blandes godt før de pakkes 75 gram \pm 1 gram + en kontroll prøve i beger med CO₂:N₂ (70:30). Det benyttes en kontrollprøve for å ha et utgangspunkt og et sammenligningsgrunnlag for de andre prøvene. Pakkene lagres på 4 °C frem til uttaksdagene som er etter fire, syv, åtte, ni, ti, og elleve dager. Krabbekjøttet analyseres mikrobiologisk på Jernagar og Long & Hammer som gir en indikasjon på det totale kimtallet. Det ble også målt PH av alle prøvene, og prøven ble også fryst ned på -80°C slik at det senere kan tas kjemiske analyser som fettanalyse, HPLC og peroksidverdi.



Figur 3 Illustrasjon av forsøksdesignet som illustrer de ulike tilsetningsstoffene som tilsette krabbekjøttet. Der de ulike tallen 1-8 representerer de ulike tilsetningsstoffene. 1 100% sitronsyre, 2 50% sitronsyre +50% natriumacetat, 3 100% natriumacetat, 4 50% natriumacetat +50% alge, 5 100% alge, 6. 50% alge +sitronsyre, 7 33% alge, 33% sitronsyre, 33% natriumacetat og 8. kontrollprøven

Tabell 1 Mengde gram tilsatt sitronsyre, natriumacetat og tørket alge i hver av de ulike prøven

Prøve	Mengde Sitronsyre	Mengden Natriumacetat	Mengde Tørket alge
100 % Sitronsyre (S)	32,5 g		
100 % Natriumacetat (N)		32,5 g	
100 % Tørket alge (A)			32,5 g
50 % Sitronsyre 50 % Natriumacetat (SN)	16,25 g	16,25 g	
50% Tørket alge 50% sitronsyre (AS)	16,25 g		16,25 g
50% Tørket alge 50% Natriumacetat (AN)		16,25 g	16,25 g
33% Tørket alge, 33% Sitronsyre 33% Natriumacetat (ASN)	10,83 g	10,83 g	10,83 g

3.3. Forsøk 2 -effekt av ulike pakkemetoder

I Forsøk 2 ble det valgt ut de to blandingene av tilsetningsstoffene som ga best holdbarhet basert på hvilken prøve som viste lavest mikrobiell vekst. I denne delen av å forsøket testes effekten av O₂ sammenlignet med N₂. En blanding av krabbekjøttet tilsettes sitronsyre (S) og alger +sitronsyre (AS), det ble også laget en kontrollblanding for å ha et sammenligningsgrunnlag for de andre prøven. På grunnlag av lav mikrobiell vekst over 15 dager ble S og AS valgt å benyttes. Disse hadde også lav pH under hele lagringsperioden. Krabbekjøttet ble tilsatt tilsetningsstoffene slik at det oppnås en totalmengde på 2,5% (w/w) tilsetningsstoff i forhold til produkt i hver av blandingen .Krabbekjøttblandingen ble delt i tre like store deler à 1200 gram. Det ble tilsatt 30 gram sitronsyre noe som gav en total mengde på 2,5 % av tilsetning i forhold til produkt. Den andre ble tilsatt 18 gram tørket alge (1, 5 % tilsetning) og 12 g sitronsyre (1% tilsetning) noe som gir en total mengde på 2,5 % tilsetningsstoff. De tre ulike blandingene fordeles i beger på 75 gram ±1 gram der halvparten pakkes i CO₂:N₂ (70:30) og andre halvparten pakkes i CO₂:O₂ (70:30). Pakkene ble lagret ved 4 °C frem til de ulike uttaksdagene etter null, fire, åtte, ti, tolv, tretten, og fjorten dager . Det ble gjennomført mikrobiologiske analyser på jernagar og Long & Hammer som gir et bilde av totale kimtallet. Det ble også brukt pseudomonas agar og pH ble målt. Resten av prøven fryses ned til -80 °C for kjemiske analyser som perioksidtall, HPLC, og fettinnhold.

3.4. Tillaging av medier

3.4.1. Peptonvann

Det veies opp 1,0 gram nøytralisert bakteriologisk pepton (OXIOD LP0034) og 8,5 gram salt (NaCl) i en 1000 ml Schott flaske og det tilsettes 1000 ml destillert vann. Løsningen autoklaveres ved 121 °C i 15 min. Flasken avkjøles i romtemperatur før den settes i kjøleskap (for å unngå at flasken sprekker) frem til analysedagen. Det ble både laget 1000 ml og 500 ml flasker med peptonvann for analysene.

3.4.2. Jernagar

For å analysere totalt aerobt kimtall og forlengelsesbakterier benyttes Jernagar. Jernagar lages i henhold til (NMKL nr 184 2006). Den modifiserte metoden finnes i vedlegg 1 . Mediet har en inkubasjonstid på tre dager ved 22°C.

3.4.3. Long & Hammer

For å analysere psykrotroft totaltkim og spesifikke forringelsesbakterier benyttes Long & Hammer agar. Ettersom varmfølsomme forringelsebakterier vokser dårlig på Jernagar ble Long & Hammer agar også benyttet. Long & Hammer lages i henhold til (NMKL nr 184 2006) modifisert metode finnes i vedlegg 1. Mediet har en inkubasjonstid på fire dager for lysende kolonier og fem dager for psykrotroft totaltkim ved 15°C.

3.4.4. Pseudomonas agar

For å analysere om det finnes pseudomonas ssp i blandingen benyttes Pseudomonas agar. Pseudomonas agar lages i henhold til produsentens anvisninger. Det veies opp 24,2 gram Pseudomonas agar base (OXIOID CM0559) i 1000 ml Erlendmeyerkolbe og det tilsettes 500 ml destillert vann. Løsningen autoklaveres ved 121°C i 15 min og tempereres til 45°C i vannbad før Pseudomonas C-F-C supplementet (OXIOID SR0103E) tilsettes. Supplementet tilsettes 1 ml etanol og 1 ml sterilt vann. Petriskåler med vekstmedium oppbevares ved 11°C frem til bruk. 0,1 ml av den respektive prøven overføres til den respektive skålen. Mediet har en inkubasjonstid på 48 timer ved 25°C.

3.5. Analyseuttak

For hvert analyseuttak ble det tatt tre paralleller av hver prøve type. I forsøk 1 vil dette være totalt 24 prøver og for forsøk 2 er det totalt 18 prøver. Alle prøvene analyseres på Long & Hammer og Jernagar. Pseudomonas agar ble kun benyttet for forsøk 2.

3.5.1. Innveing og fortynning

10 gram \pm 0,5 gram krabbekjøtt veies opp sammen med 90 gram \pm 5 gram peptonvann i en Seward stomacherpose. Blandingen homogeniseres i Seward Stomacher 400 circulator i 1 minutt, og 230 revolutions per minute (RPM). Av denne blandingen lages det en tifoldfortynning fra 10^{-1} til 10^{-8} avhengig av analysedagen for hver av prøvene (se tabell 2). En tifoldfortynning lages ved at 10 ml av løsningen tilføres et tomt sentrifugerør som vil være -1 fortynning. 1 ml av dette røret føres over i et rør med 9 ml peptonvann, og dette gjøres videre til ønsket fortynningsgrad.

3.5.2. Platespreding og inkubering

Hver av prøvene sås ut på de ulike mediene med ulike fortynninger avhengig av prøvedag. Det ble brukt platespredning for Long & Hammer og Pseudomonas, og innstøping for Jernagar. Arbeidet utføres ved bruk av aseptisk teknikk ved at utstyret, flaskemunninger og røpninger brennes av med gassbrenner. Alle overflater som kan komme i kontakt med utstyret sprayes med 70% etanol, mens engangsutstyr ble bløtlagt i 96% etanol. Det benyttes også hansker. Etter utsåing inkuberes prøvene ved den oppgitte lagringstiden og temperatur for de ulike mediene (se tabell 2).

Tabell 2 Inkubasjonstid, inkubasjons temperatur og fortynningsgrad som ble benytte for de ulike medien

Medium	Inkubasjonstid	Temperatur	Fortynning
Long & Hammer	4/ 6 Døgn	15°C	10^{-2} - 10^{-7}
Jernagar	72 timer	22°C	10^{-1} - 10^{-8}
Pseudomonas	48 timer	25 °C	10^{-1} - 10^{-4}

3.5.3. Avlesning

Mediene som er brukt i forsøket har ulike lagringstider, samt temperatur (se tabell 3). Etter angitt lagringstid for hver av mediene ble antall synlige kolonier telt. Alt over 250 kolonier regnes som overgrodd. Kimtall (CFU/g) ble beregnet og standardavvik for alle parallellene der det var mulig.

Tabell 3 Oversikt over medier og utseende til kolonien på de ulike mediene

Medium	Utseende
Long & Hammer	Psykrotrofe totalkim Lysende kolonier kan indikere <i>P.phosphoreum</i>
Jernagar	Total aerobt kimtall Svarte kolonier er hydrogensulfid produserende bakterier
Pseudomonas	Kolonier sette under UV-lys kan indikere <i>Pseudomonas</i> spp. Rosa/brune kolonier kan indiker <i>Aeromonas</i> spp.

3.6. Kjemiske analyser

3.6.1. ATP analyse med High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

For å undersøke metabolismen til krabben ble HPLC brukt for å se på nedbrytningsproduktet til ATP. For å preparere analysen ble veid opp veide det opp Ca 0,6 gram frosset prøve som overføres til sentrifugerør. Hvert av rørene tilsettes 5 ml perklorsyre (HClO_4 , 0,42 M) og homogeniseres i to minutter med ULTRA-TURRAX® T25 basic 1300 RPM Videre tilsettes den homogeniserte løsningen 1,5 ml lut (KOH 1M) som ristes før sentrifugering i 10 min. (Kubota 1700 Kjølesentrifuge 12000 rpm 4C). Prøvene filtreres i engangsrør ved bruk av 10 ml sprøyter og filter på 0,45 μm . Ca. 1 ml av den filtrerte løsningen overføres til et HPLC glass for analyse. Det ble benyttet tre paralleller for hver prøve for prøvedag 0,4, 8 og 10 for begge av forsøkene. Prøven ble analysert med kolonne Poroshell 120 (EC-C18 3,0 x 100mm porestørrelse 2,7 μm pluss Poroshell 120 3,0 x 5 mm forkolonne Aligent Technologies) med en flow på 1 ml/min

Creatin, ATP og ADP ble detektert på 210 nano meter (nm) og AMP, Imp, In, HX ved 260 nm. Der den mobile fasen bestod av kaliumhydrogenfosfatbuffer (KH_2PO_4 , 0,215 M) og tetrabutylammoniumhydrogensulfatbuffer (TBAHS, 0,0023 M) løst i acetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, 3,5 %). pH ble justert til 6,25 ved tilsats av KOH (0,5 M).

3.6.2. pH

Det ble målt pH for alle prøvene ved hvert prøveuttak. pH-meter (Hach HQ40d multi) som ble brukt for hele analysen ble kalibrert før bruk. Etter prøveuttak ble resten av prøvematerialet lagt i små zip-poser og i kjøleskap frem til siste prøve var analysert. Prøven ble oppbevart i romtemperatur i noen minutter før målingen slik at prøven ikke skulle være for kald. Alle prøvene ble målt pH i ved at pH-elektroden has i prøven inne i posen. pH ble målt for forsøk 1 på forsøksdag 0, 7, 8, 9, 10, 11 og 15. Det ble ikke målt pH for dag 4. For Forsøk 2 ble pH målt på forsøksdag 0,4,8,10,13 og 14. Det ble ikke målt på for dag 12.

3.6.3. Gassmålinger

Gassinnholdet i hver av pakkene ble målt i starten av hver analysedag for å undersøke gassinnholdet i forpakningen. Dette ble utført ved hjelp av PBI Dansesor checkMate 9900 den leser av gassinnholdet av O₂ og CO₂ dette oppgis i %. For å sikre rett gassforhold i pakningene ,ble det foretatt kontrollmålinger ved pakking. I forsøk 1 ble det ikke brukt gummi septum ved måling av gass, men dette ble benyttet i forsøk 2. Gummi septum benyttes for å sikre en mer nøyaktig måling.

3.6.4. Tørking av brunalge

Brunalgen måtte tørkes før bruk og dette ble utført ved frysetørking. Algen ble tatt opp fra -80°C og lagt i romtemperatur i ca.1 time slik at det var mulig å dele algen opp i mindre biter. Det ble tatt hensyn til at det er svært viktig at algen fortsatt er frossen før tørking. Algen fordeles på brettene til frysetørkeren som var dekket med aluminiumsfolie. Brettene ble satt inn i tørkebeholderen, og satt på etter produsentens anvisninger. Algen tørkes i tre døgn for å sørge for at det var helt tørket, deretter pakket i vakuum og lagret på kjøll frem til bruk. Algen skulle tilsettes krabbekjøttet, men før tilsetting ble algen malt til et fint pulver ved bruk av mørtel og kjøkkenmaskin. Algen i pulverform, ble overført til sterile sentrifugerør og lagret ved -80 °C frem til bruk.

3.6.5. Vanninnhold

Det ble målt vanninnhold/tørrestoff på råstoffet fra dag 0 for å gi et bilde på % vanninnholdet i produktet. Dette gjøres ved at ca. 5 gram prøve veies nøyaktig i aluminiumsbeger tørket i varmeskap ved 105 °C i 24 timer. Så veies prøven på nytt. % vanninnhold ble brukt for å kunne beregne hvor mye prøve som skal veies opp for å gjennomføre Bligh and Dyer metoden.

Det ble brukt tre paralleller per prøve. Vanninnholdet beregnes ut fra følgende formel:

$$\text{Vanninnhold}(\%) = \frac{\text{Våtvekt (g)} - \text{Tørrvekt(g)}}{\text{Våtvekt (g)}} * 100$$

$$\text{Våtvekt(g)} = \text{aliminumsbeger} + \text{prøve før tøking}$$

$$\text{Tørrvekt (g)} = \text{aliminumsbeger} + \text{prøve etter tørkinge}$$

3.6.6. Fett % etter Bligh and Dyer-metoden

For ekstraherer fett slik at peroksidveriden kan bestemme og finn fettprosenten til krabbe. Dette gjøre i henhold til Bligh and Dyer metode fra 1959 (Bligh and Dyer, 1959) . Modifisert metode er beskrevet i vedlegg 1 Fettprosent og aske innholdet beregnes :

$$100\% - \text{vanninnholdet} - \text{protein} = \text{fett} + \text{aske}$$

3.6.7. Peroksidverdi

For å få et mål på hvor harsk prøvene er ble det analysert peroksidverdi for fettprøven på prøvedag 0,4,8 og 10 for forsøk 1 og to. Metoden ble utført ut fra (Kompendium for skoleåret 2002/2003, 2003), modifisert metode er beskrevet i vedlegg 1.

3.6.8. Protein

For å finne mengden protein i prøvene ble det brukt Kjeldahl-metoden. Det er en metode som bestemmer nitrogen-innholdet i organiske materialer og ut fra dette kan proteininnholdet beregnes. 1 gram prøver veies opp i hvert rør med nitrogenfritt papir. To av prøvene er blanke og har nitrogenfritt papir og to rør med 0,2 gram ammoniumsulfat som blindprøve. Alle rørene tilsette to Kjeldahl tabletter og 15 ml svovelsyrer. Stativet med prøverørene settes inn Buchi kjeldigester K-449, hvor prøven varmes opp for å frigjøre nitrogenet som ammoniumsulfat. Det ble sørget for at apparatet brukte metoden som er egnet for kjøtt og fisk. Denne oppvarmingen tar ca. 2 timer. Prøvestativet settes i BUCHI KjeldSampler K-376. Vekten av alle prøvene og deres plassering skrives inn i KjeldMaster K-375. Prøvene vil da automatisk tilsettes natronlut (NaOH) som gjør at ammoniumsulfat til ammoniakk. Det skjer videre en titrering der borsyre tilsettes. Alt skjer automatisk og det tar ca. 15 minutter per prøve. Før denne analysedelen starter er det viktig å sørge for at det er nok borsyre, natronlut og vann på tanken koblet til maskinen og tømme avfallsdunken.

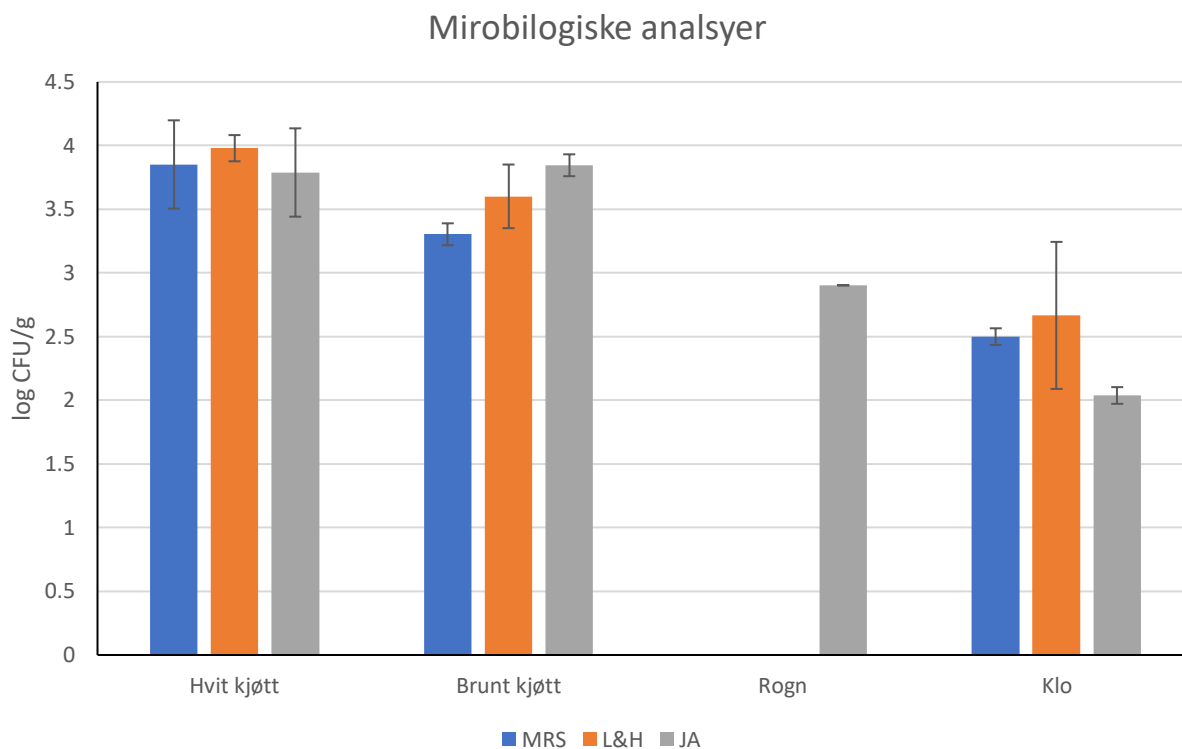
3.7. Statistikk

Statistiske analyser av resultatene ble utført i SPSS(IBM SPSS Statistics). Resultatene ble analysert med univariant anova i form av general linear model (GLM) og post hoc test i form av Duncan. Det signifikante nivået er på $p < 0,05$ altså kan man si det med 95% sikkerhet . For korrelasjonsanalyser ble bivariat , person tow-tailed corralation. Der r-verdien forklare denne korrelasjon. En korrelasjon på $< 0,4$ regnes som en lite korrelasjon, $0,4-0,7$ regnes som en middels korrelasjon og $> 0,7$ regnes som en sterk korrelasjon. Alle resultater er vist som et gjennomsnitt av tre paralleller.

4. Resultat

4.1. Råstoff

For å undersøke egenskapen til råstoffets ulike komponenter. Ble det utført analyser for å undersøke den mikrobielle veksten, vanninnhold og proteininnhold på dag null. Figur 4 viser mikrobiologiske vekst for de ulike råstoffkomponenten på MRS-Agar (MRS), Long & Hammer agar (L&H) og Jernagar (JA). Det ble observert størst vekst av mikroorganisme i det hvite kjøttet på L&H med en verdi 3,9 log CFU /g. Det ble ikke observert vekst på melkesyrebakterier (MRS) og psykrotrofe bakterier (L&H) for rogn. Det ble funnet en korrelasjon mellom veksten på de ulike mediene der MRS og JA ($r=0,692$), ($P<0,001$), L&H ($r=0,968$) ($p<0,001$) og JA og L&H ($r=0,698$) ($p<0,001$)



Figur 4 Mikrobiologiske undersøkelse av krabbe råstoffet (hvitt kjøtt, brunt kjøtt, rogn og klo) på MRS-agar (MRS), Long & Hammer agar (L&H) og Jernagar (JA). Dataene viser den gjennomsnitte log CFU/g \pm standardavviket

4.1.1. Kjemisk sammensetning av råstoffet

Tabell 4 viser den kjemiske sammensetningen til råstoffet. Ask og fettinnhold ble beregnet ut fra følgen formel: $100\% - \text{Vanninnhold} - \text{Protein} = \text{fett} + \text{aske}$ Ved bruk av GLM forklart med Ducan sammenligningstest ($p < 0,01$), ble det funnet signifikante forskjeller mellom gruppen for vanninnhold og protein ($p < 0,01$) som vist i tabell 4.

Tabell 4 Kjemiske sammensetningen (%) av krabbe råstoffet. Dataene er forklart med gjennomsnitt \pm standardavvik.¹

	Vanninnhold (%)	Protein (%)	aske + fett (%) beregnet
Hvitt kjøtt	51,7 \pm 0,4 ^a	13,9 \pm 3,8 ^c	34,4
Brunt kjøtt	43,2 \pm 0,5 ^c	17,4 \pm 2,1 ^b	39,4
Klo	48,5 \pm 0,4 ^b	27,7 \pm 0,6 ^a	38,5
Rogn	33,8 \pm 0,3 ^d	19,1 \pm 1,5 ^b	32,5

4.2. Forsøk 1- Effekten av tilsetningsstoffene

4.2.1. Kjemisk sammensetning

Tabell 5 viser den kjemiske sammensetningen for krabbeblandingen for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på analysedag null. Det ble funnet signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene på vanninnholdet ($p < 0,01$) som vist i tabell 5

Tabell 5 Kjemiske sammensetningen for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K) på analysedag null.²

Grupper	Vanninnholdet (%)	Protein (%)	Fett (%)
S	29,0 \pm 2,8 ^a	18,0 \pm 2,8	7,6 \pm 0,5
A	28,6 \pm 1,5 ^a	15,6 \pm 1,5	7,7 \pm 0,9
N	23,5 \pm 0,3 ^c	15,9 \pm 0,3	6,7 \pm 0,4
SN	27,0 \pm 0,2 ^b	16,1 \pm 0,2	7,1 \pm 0,7
AN	27,7 \pm 0,05 ^{ab}	15,6 \pm 0,1	6,6 \pm 0,3
AS	27,5 \pm 0,05 ^{ab}	15,1 \pm 0,05	7,4 \pm 0,4
ASN	28,0 \pm 0,4 ^{ab}	15,4 \pm 0,4	6,5 \pm 0,4
K	24,3 \pm 0,2 ^c	16,9 \pm 0,2	7,5 \pm 0,1

¹ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). I radene med bokstaver indikerer disse signifikante forskjeller, der det ikke er bokstaver er det ingen signifikante forskjeller.

² Dataen er forklart av gjennomsnittet i % \pm standardavviket for de ulike blandingene. Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest. I hver kolonne indikerer bokstavene signifikante forskjeller mellom gruppen ($p < 0,001$), der det ikke er bokstaver er det ingen signifikante forskjeller ($p > 0,05$)

4.2.2. Gassmålinger

Tabell 6 viser hoved effekten av gassmålingen \pm standardavvik for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre(S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på de reseptive analysedagen . Den fulle målingen finnes i vedlegg 2 . Det ble funnet signifikante forskjeller mellom gruppen som vist i tabell 6

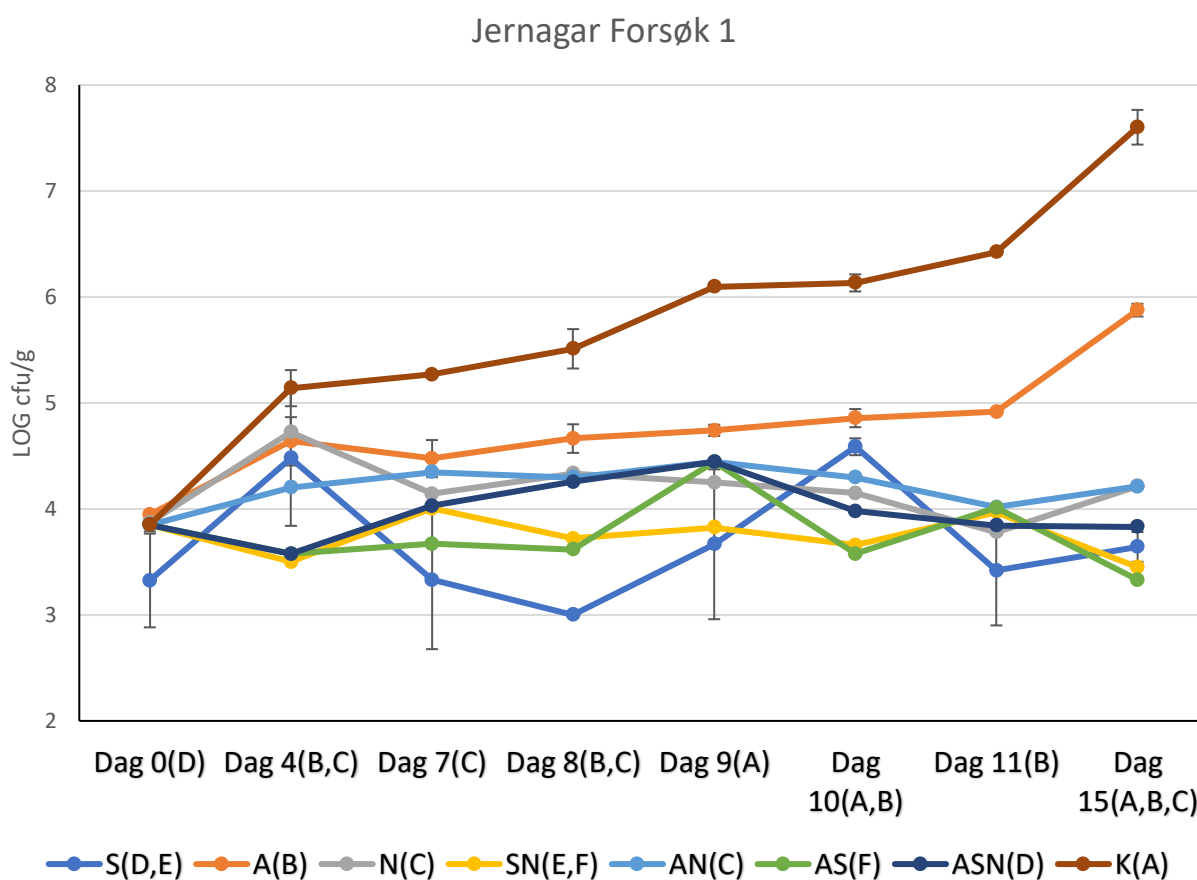
Tabell 6 Hovedeffekten av gassmålingen for de ulike tilsetningsstoffene ;sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K) på de ulike analysedagen. Dataene viser et gjennomsnittet av alle målingen \pm standardavviket. ³

Grupper	CO ₂	O ₂	N ₂
S	54,6 \pm 3,2a	0,8 \pm 0,7	44,6 \pm 2,5b
N	30,7 \pm 5,0b	3,1 \pm 4,1	66,2 \pm 1,5a
A	30,8 \pm 8,4b	3,8 \pm 3,7	65,4 \pm 4,6a
SN	54,6 \pm 2,2a	0,8 \pm 0,5	44,6 \pm 1,8b
AN	29,6 \pm 8,7b	3,9 \pm 4,3	66,6 \pm 4,4a
AS	50,3 \pm 9,7a	1,9 \pm 2,2	47,8 \pm 7,4b
ASN	52,0 \pm 10,0a	1,4 \pm 1,9	46,6 \pm 8,1b
K	32,0 \pm 5,6b	2,7 \pm 2,3	65,3 \pm 3,3a
P-verdi	0,001	0,238	0,001

³ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest(p<0,001). I hver kolonne indikerer bokstaver signifikante forskjeller, der det ikke er bokstaver er det ingen signifikante forskjeller.

4.2.3. Totalt aerobt kimtall

Figur 5 viser utviklingen av det totale aerobe kimtallet som for tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på de reseptive analysedagen. Prøve K oversteg 10^6 CFU/g mellom åtte og ni dagers lagring (4 °C). Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest. (figur 5) Her ser man at gruppe K har signifikant størst mikrobiologisk vekst av aerobe bakterier

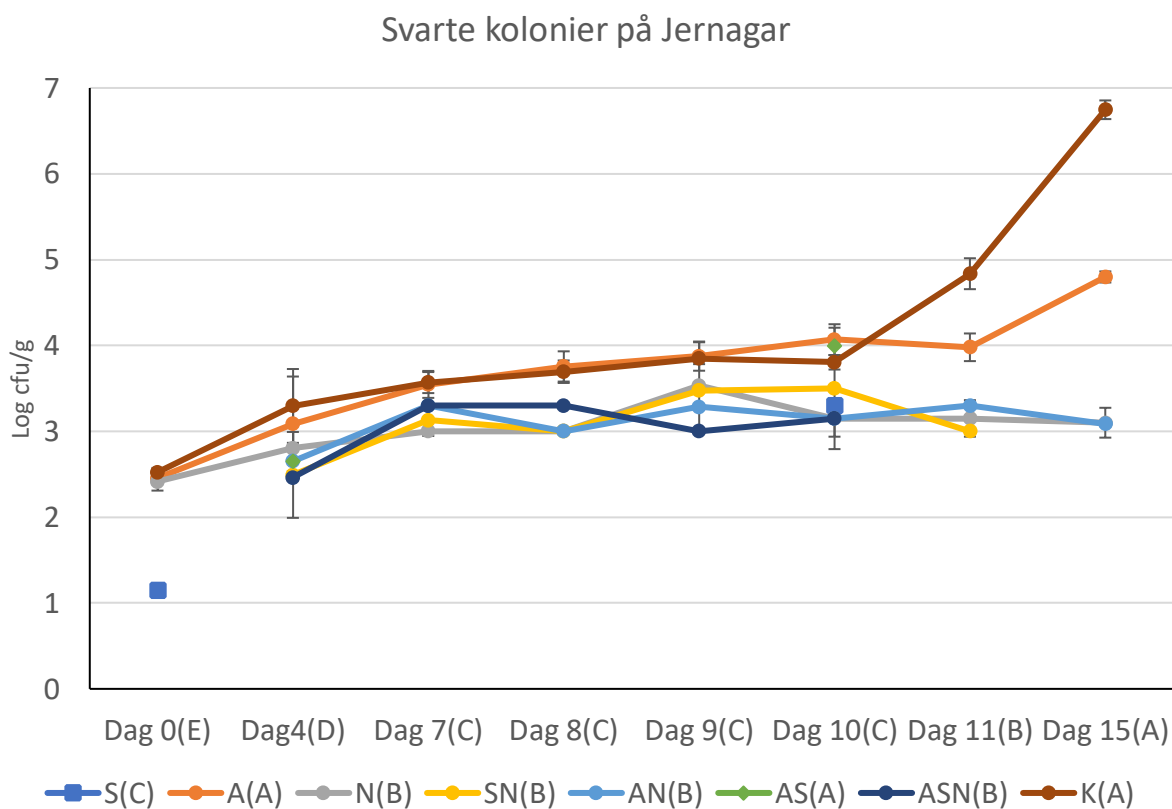


Figur 5 Vekstkurve for total aerob kimtall på jernagar. for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K). Dataene viser den gjennomsnittlig log CFU/g \pm standardavvik ⁴

⁴ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller ($p < 0,001$).

4.2.4. H₂S produserende bakterier

Figur 6 viser H₂S produserende bakterier (svarte kolonier på JA) for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på de reseptive analysedagene. For gruppe S ble det kun funnet svarte kolonier på dag null og ti, og for gruppe AS ble det kun funnet svart kolonier på dag fire og ti. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest. (figur 6) Der gruppene AS, K og A har de signifikant største andelene av svarte kolonier.

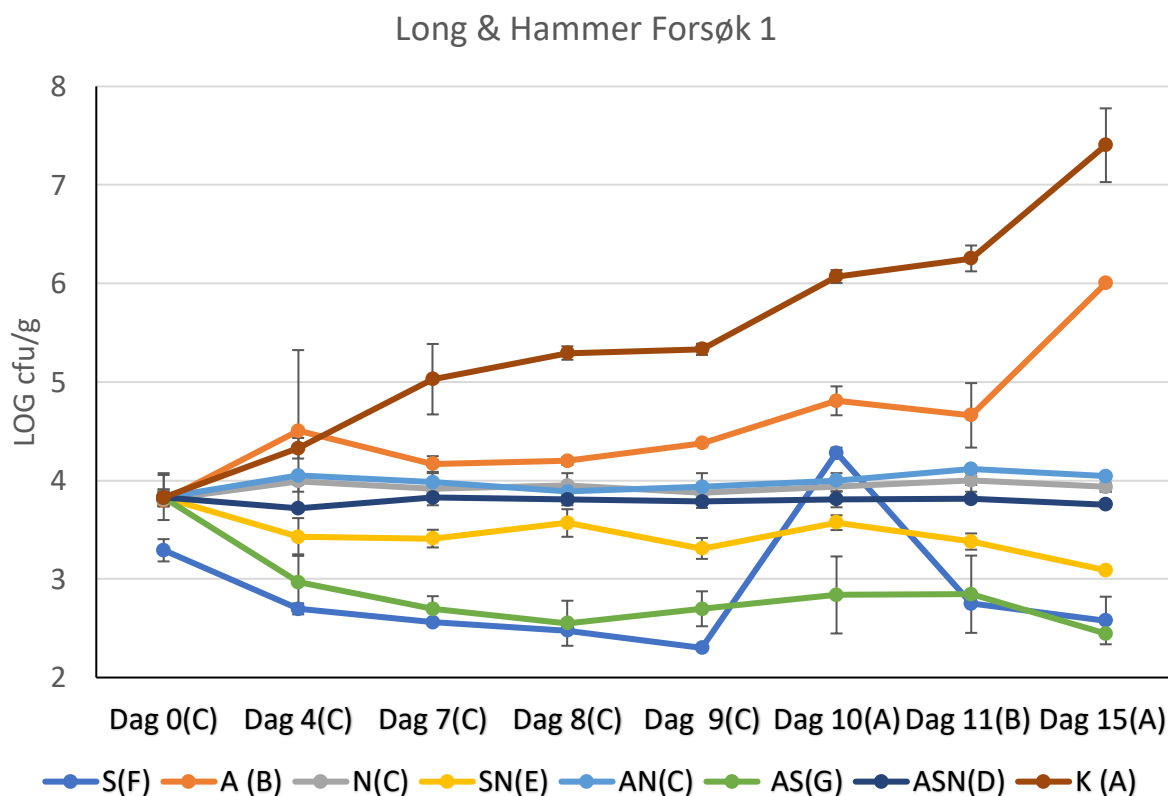


Figur 6 Svarte kolonier på jernagar for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K). Dataene viser den gjennomsnittlig log CFU/g \pm standardavvik.⁵

⁵ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,05$). De ulike bokstaven indikere signifikante forskjeller ($p < 0,001$)

4.2.5. Totalt psykrotroft kimtall

Veksten av psykrotroft kimtall (L&H) er vist i figur 7 for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på de reseptive analysedagene. Den kan også selektere for *photobacterium* og *vibrio* ved at disse forekommer som lysende kolonier. I dette forsøket ble det ikke funnet noe lysende kolonier. Kontrollprøven (K) overstiger 10^6 CFU/g mellom ni og ti dagers lagring (4 °C), mens Algeprøven (A) når 10^6 CFU/g etter 15 dagers lagring (4 °C). Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 7) Gruppen K har signifikant størst mikrobiologiske vekst av psykrotroft bakterier.

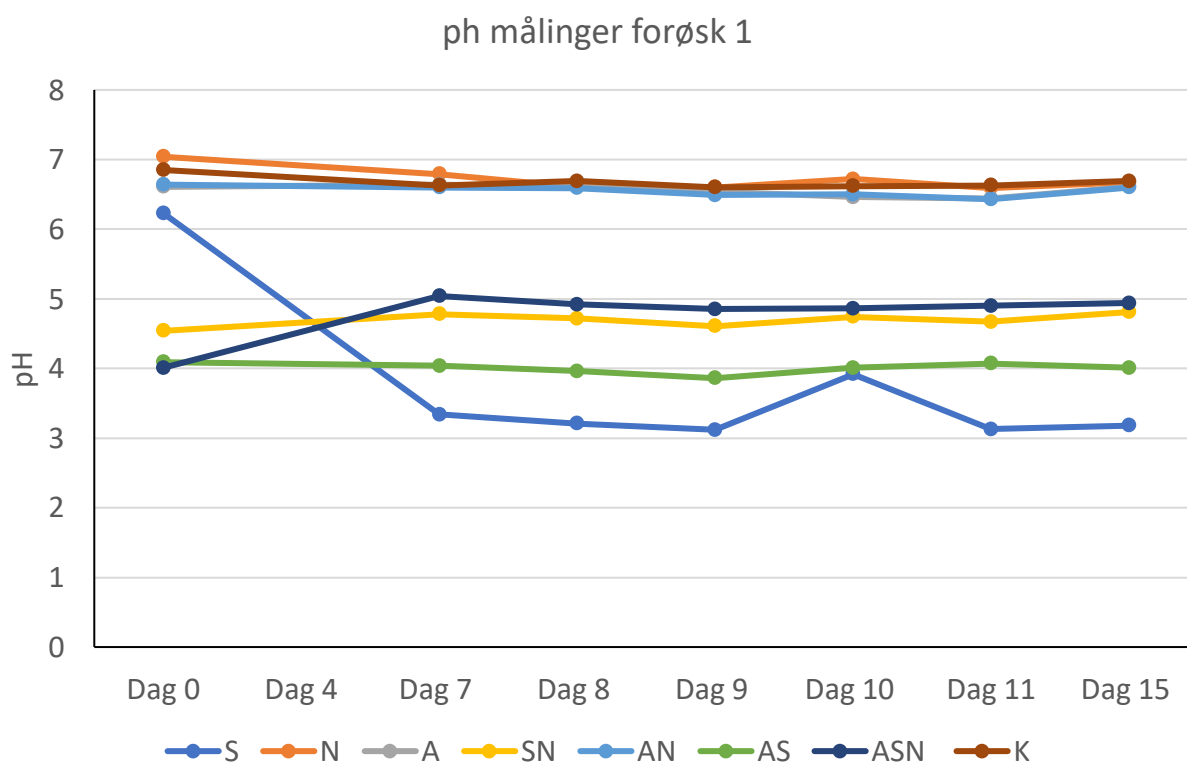


Figur 7 Vekstkurve for totalt psykrotroft kimtall på Long & Hammer fra de ulike tilsetningene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K). Dataene viser den gjennomsnittlig log CFU/g \pm standardavvik ⁶.

⁶ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,05$). De ulike bokstaven indikere signifikante forskjeller ($p < 0,001$) mellom de ulike gruppene

4.2.6. PH

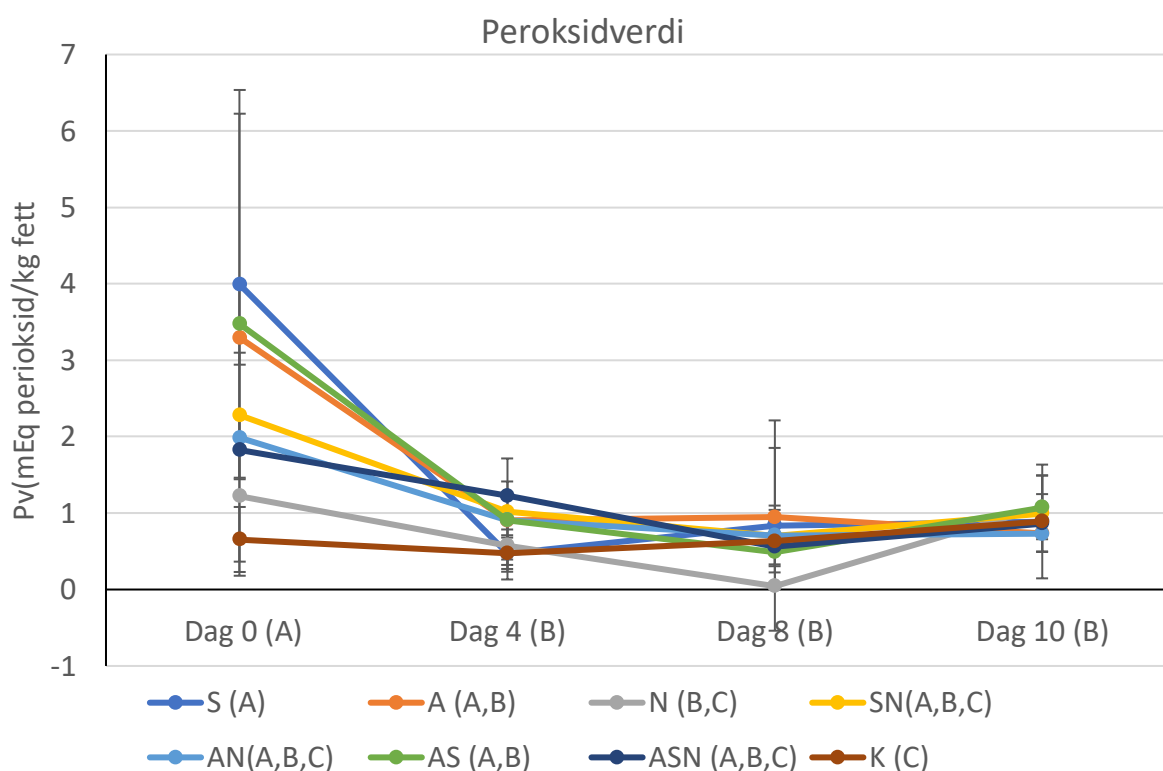
Tabell 8 viser utviklingen av pH i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på de reseptive analysedagene. Gruppen som var tilsatt sitronsyre (S) ble funnet til å ha laves pH (3,12 på dag ni). PH-verdien holder seg generelt gjemt under hele forøket. Det ble funnet signifikat korrelasjon ($p=0,001$) mellom bakterie veksten på JA ($r=0,465$)($p<0,001$), L&H ($r=0,679$)($p<0,001$) og pH.



Figur 8 pH utviklingen i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K).

4.2.7. Dannelse av peroksider

Figur 9 viser de primære oksidasjonsproduktene i prøven i form av peroksidverdine (PV) for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) de respektive analysedagene. Peroksidverdien starter på topp ved dag null med høyeste verdi på 3,98 og avslutter på 1. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p > 0,05$) og forskjellen mellom dagen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest. ($p < 0,001$) (figur 9).



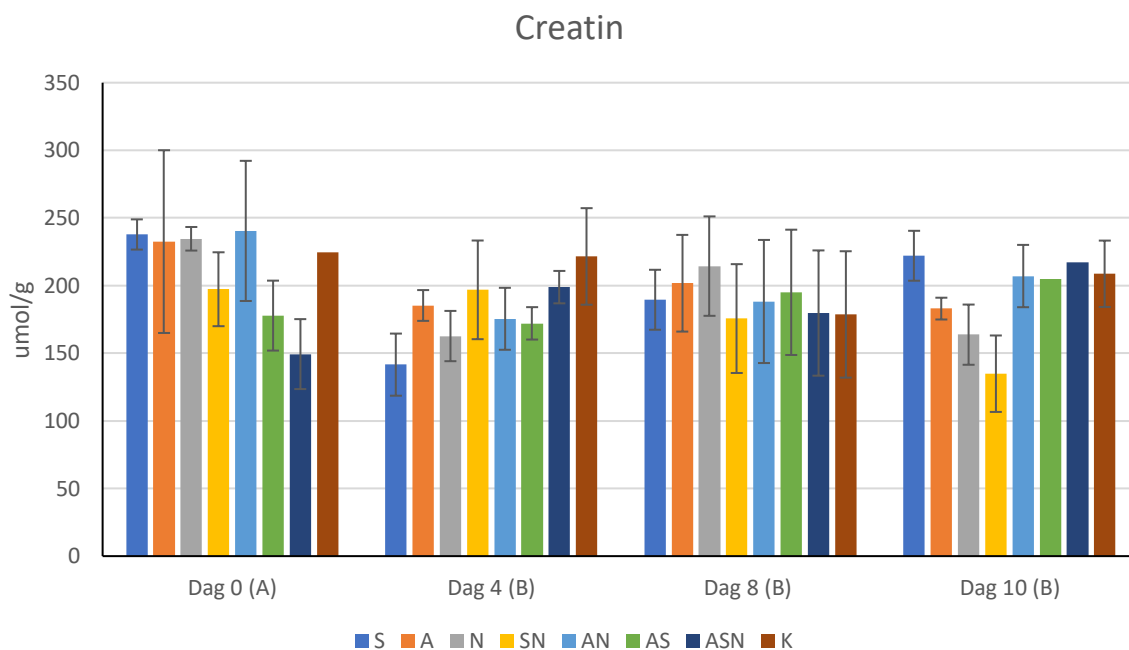
Figur 9 Forandring i peroksidverdien (PV) i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K) for analysedag 0, 4,8 og 10. Dataene viser et gjennomsnitt mEq peroksid/kg fett \pm standardavviket for hver av blandingen.⁷

⁷ Det ble funnet signifikante forskjeller med general linear modell (GLM) som er forklart med Duncan ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikere signifikante forskjeller ($p < 0,001$)

4.2.8. Nedbrytningsproduktene til ATP

Det ble oppdaget lavt innhold av ADP på dag null for alle prøvene. Det ble kun oppdaget ADP i prøven tilsatt sitronsyre (S) på dag fire. Fullt resultat finnes i vedlegg 3.

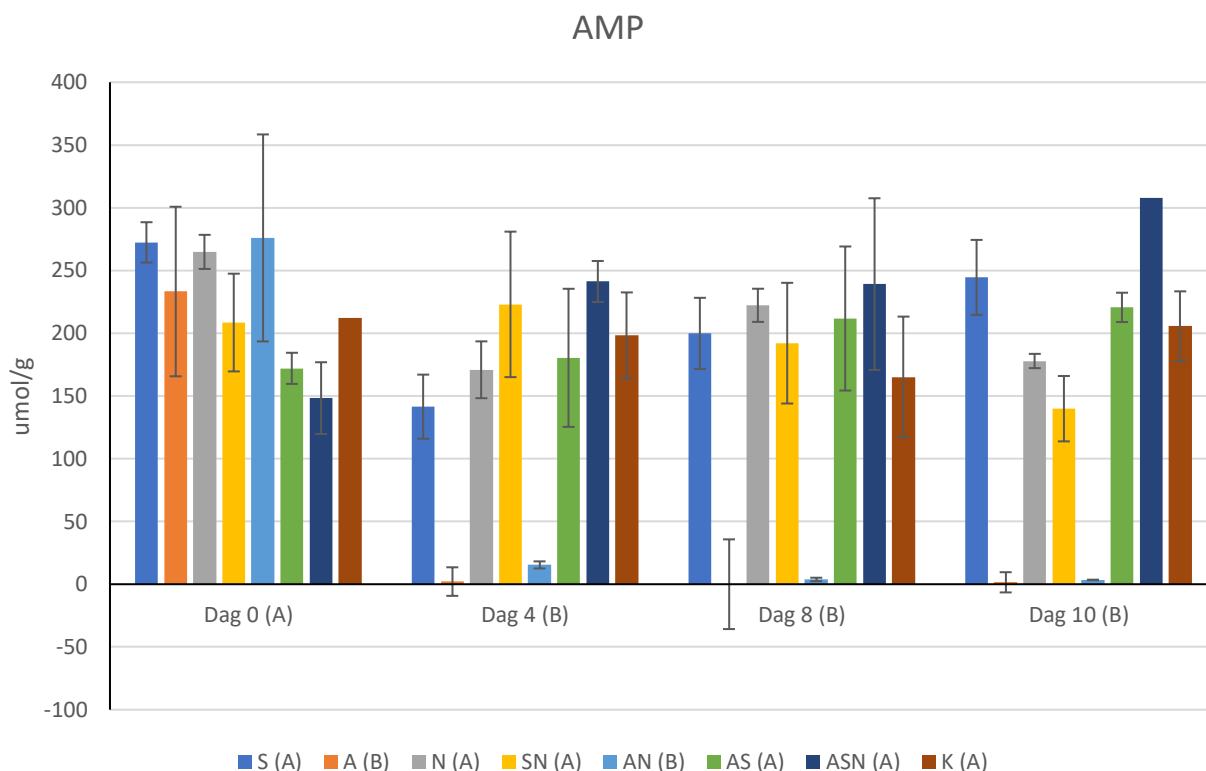
Figur 10 viser utviklingen av $\mu\text{mol/g}$ creatin for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på analysedag null, fire, åtte og ti. Der kontrollprøven (K) har den høyest gjennomsnittsverdien på $205 \mu\text{mol/g}$ creatin og der den høyest verdien er $240 \mu\text{mol/g}$ på dag 0 for alge + natriumacetat (AN). Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p > 0,05$) og forskjellen mellom dagene ($p < 0,05$) forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,05$) (figur 10)



Figur 10 Utvikling av Creatin i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K) på analysedag 0,4, 8 og 10. Dataene viser den gjennomsnittlig utvikling $\mu\text{mol/g} \pm$ standardavvik⁸

⁸ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,05$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller. Der det ikke er noe bokstaver er det ingen signifikante forskjeller.

Figur 11 viser utviklingen av $\mu\text{mol/g}$ AMP for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på analysedag null, fire, åtte og ti. Der den høyeste verdien etter 10 dager er på $307 \mu\text{mol/g}$ for prøven ASN og den har også den høyeste gjennomsnittlige veksten under hele forsøket på $219 \mu\text{mol/g}$. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 11)

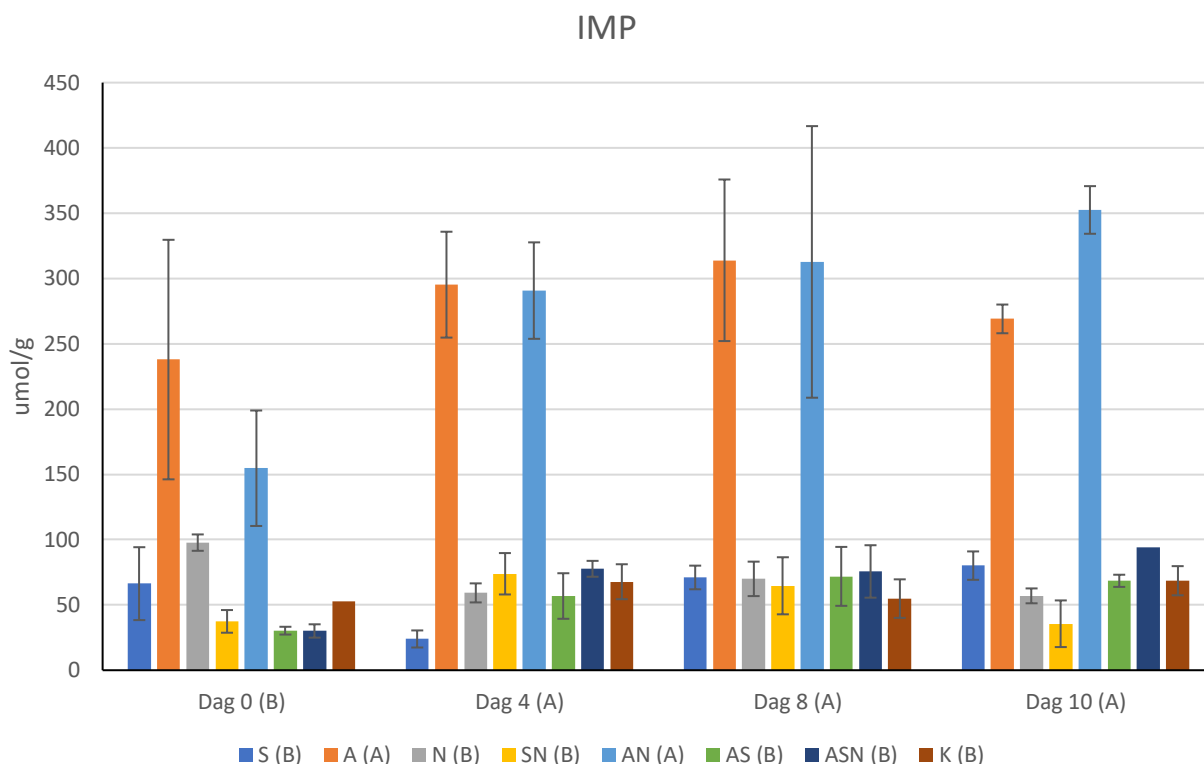


Figur 11 Utvikling av AMP i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K) på analyse 0, 4,8 og 10. Dataene viser den gjennomsnittlig utvikling $\mu\text{mol/g} \pm \text{standardavvik}$.⁹

⁹ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller. Der det ikke er noe bokstaver er det ingen signifikante forskjeller.

Figur 12 viser utviklingen av $\mu\text{mol/g}$ IMP for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på analysedag null, fire, åtte og ti. Der den høyeste verdien er på dag 10 på $352 \mu\text{mol/g}$ for AN.

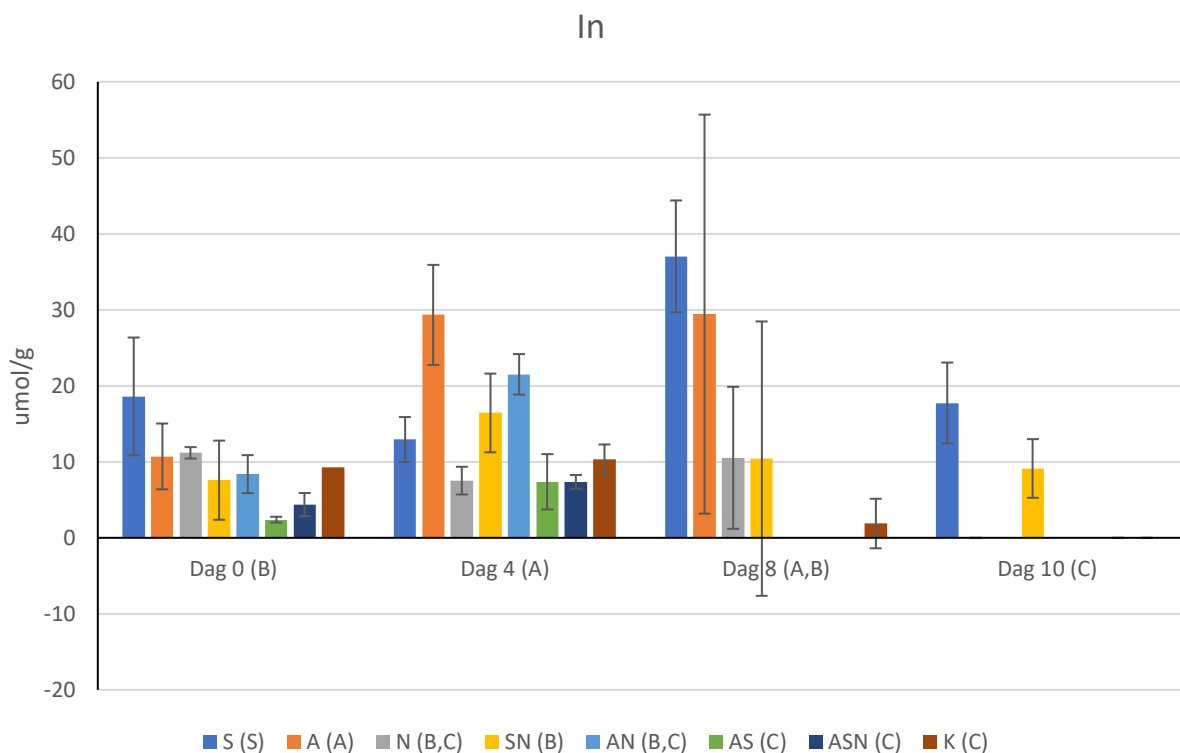
Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 12) Der A og AN har signifikant høyest innhold av IMP.



Figur 12 Utvikling av IMP i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll (K) på analysedag 0,4,8 og 10. Dataene viser den gjennomsnittlig utvikling $\mu\text{mol/g} \pm \text{standardavvik}^{10}$.

¹⁰ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). Der det er ulike bokstavene indikerer disse signifikante forskjeller. Der det ikke er noen bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

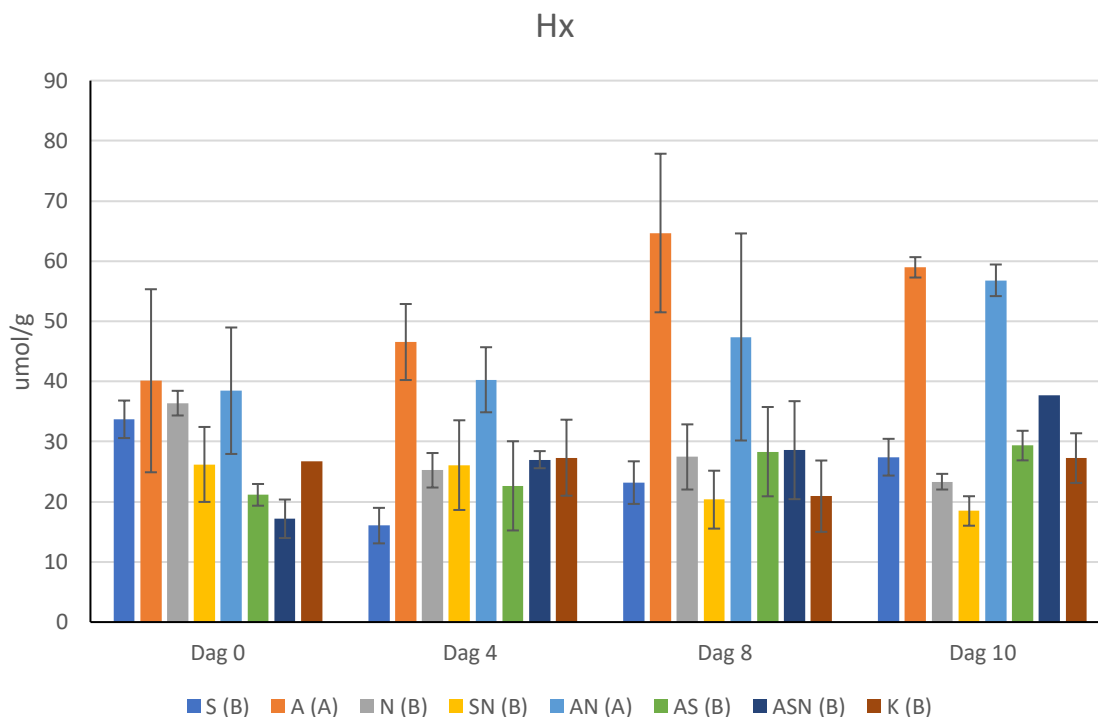
Figur 13 viser utviklingen av $\mu\text{mol/g}$ In for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på analysedag null, fire, åtte og ti. In ble funnet i alle prøve på dag null og fire. For krabbe tilsatt sitronsyre (S) og sitronsyre +natriumacetat (SN) det også funnet på dag ti. Den høyest verdien er $37 \mu\text{mol/g}$ på dag åtte for S. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 13) Der gruppe S og A har signifikant høyeste innhold av In.



Figur 13 Utvikling av In i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll(K) på analysedag 0,4,8 og 10. Dataene viser den gjennomsnittlig utvikling $\mu\text{mol/g} \pm$ standardavvik. ¹¹

¹¹ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller. Der det ikke er noe bokstaver er det ingen signifikante forskjeller.

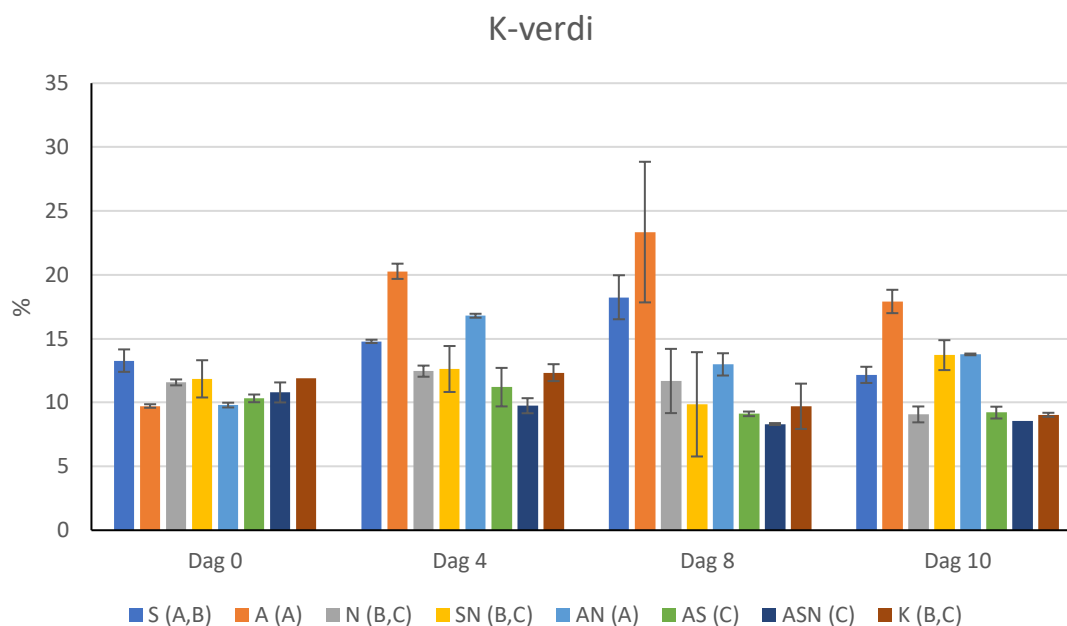
Figur 14 viser utviklingen av $\mu\text{mol/g}$ Hx for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll(K) på analysedag null, fire, åtte og ti. Alge (A) har den høyeste verdien på $64 \mu\text{mol/g}$ på dag åtte. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,05$). (figur 14). Gruppe AN og A har signifikat høyest innhold av Hx.



Figur 14 Utvikling av Hx i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ Natriumacetatumacetat(ASN) og kontroll(K) på analysedag 0,4,8 og 10. Dataene viser ett gjennomsnittlig utvikling $\mu\text{mol/g} \pm$ standardavvik.¹².

¹² Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,05$). De ulike bokstavene indikere den signifikante forskjeller, mens der det ikke er noe bokstaver, er det ingen signifikante forskjeller

K-verdi beregnes ut fra nedbrytningsproduktene til ATP som er vist i figur 15 for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) på analysedag null, fire, åtte og ti. A skiller seg ut med høyest % (23%) på dag åtte. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 15)



Figur 15 Utvikling av K-verdien (%) i krabbekjøttet for de ulike tilsetningsstoffene; sitronsyre(S), alge(A), natriumacetat(N), sitronsyre+ natriumacetat(AN), alge+ natriumacetat(AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat(ASN) og kontroll(K) på analysedag 0,4,8 og 10. Dataene viser den gjennomsnittlig utvikling % \pm standardavvik. ¹³

Hoved effekten av alle parameterne for de ulike tilsetningsstoffene sitronsyre (S), alge (A), natriumacetat (N), sitronsyre+ natriumacetat (AN), alge+ natriumacetat (AN), alge+ sitronsyre (AS), alge+ sitronsyre+ natriumacetat (ASN) og kontroll (K) er vist i vedlegg 4.

¹³ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller, der det ikke er noe bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

4.3. Forsøk 2 – Effekt av pakkemetode

4.3.1. Kjemiske sammensetning

Tabell 7 viser den kjemiske sammensetningen for de ulike tilsetningsstoffene kontroll (K) sitronsyrer (S) og alge + sitronsyre (AS) på dag null. Der det ble funnet signifikant forskjeller i fettprosent ($p < 0,05$), vanninnholdet ($p < 0,001$) som vist i tabell 7 Det ble ikke funnet noe signifikante forskjeller i protein innholdet ($p = 0,206$)

Tabell 7 Kjemisk sammensetning for ;kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på analysedag null. Dataene viser et gjennomsnittet (%) ± standardavvik. ¹⁴.

Grupper	Vanninnhold (%)	Protein (%)	Fett (%)
K	24,2 ±0,2 ^b	16,4 ±0,04	7,4 ±1,2 ^b
S	25,7 ±0,2 ^a	15,9 ±0,5	7,2 ±0,3 ^b
AS	25,8 ±0,3 ^a	16,3 ±0,3	11,4 ±0,9 ^a

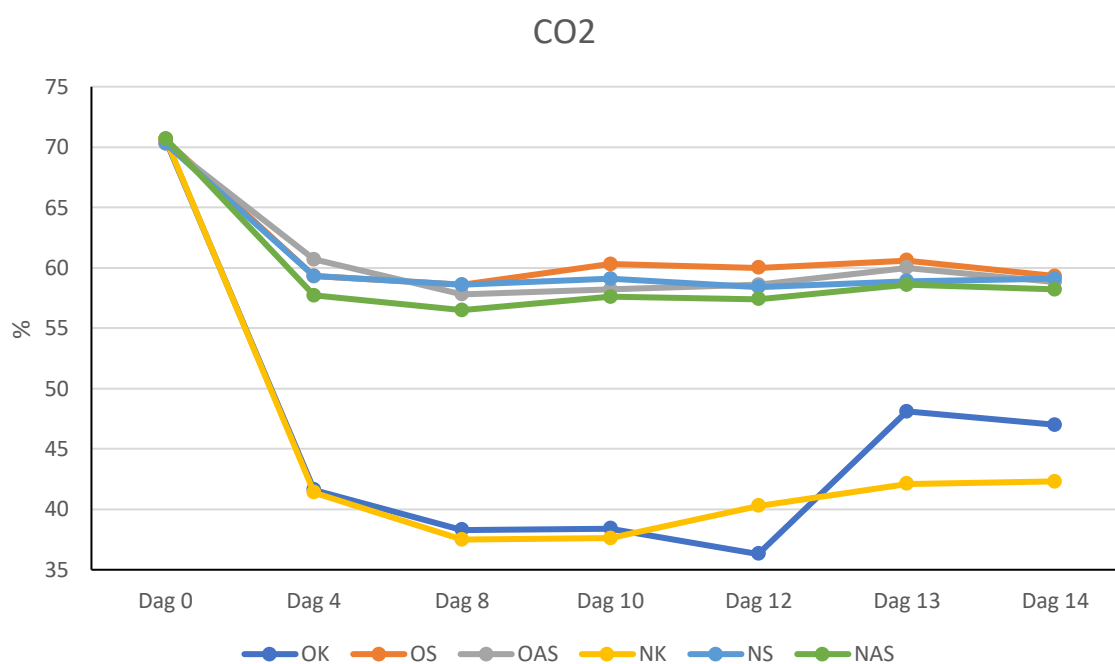
4.3.2. Gassmålinger

Tabell 8 viser hoved effekten av gass-sammensetting ± standardavvik for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de reseptive analysedagene. For komplet måling se vedlegg 2. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (tabell 8) Det ble funnet ulikheten i konsentrasjoner av CO₂, N₂ og O₂ for kontrollprøven som vist i Figur 16,17 og 18.

¹⁴ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest Der bokstaver i hver rekke indikere signifikante forskjeller mellom gruppene ($p < 0,05$), der det ikke er bokstaver er de ingen signifikante forskjeller

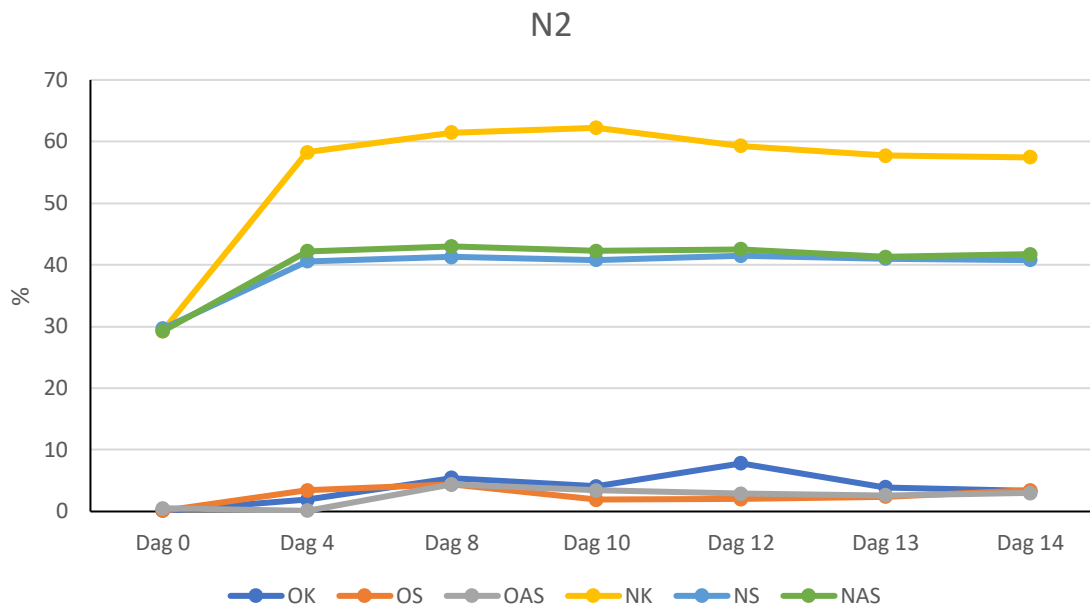
Tabell 8 Hovedeffekten av gassmålingen for ; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataene visert et gjennomsnittet av alle målingen ± standardavviket.¹⁵

Grupper	CO ₂	O ₂	N ₂
OK	41,6 ±4,9 ^b	54,0 ±4,0 ^a	4,4 ±2,0 ^c
OS	59,7 ±0,7 ^a	37,4 ±0,4 ^b	2,9 ±1,0 ^c
OAS	59,0 ±1,1 ^a	38,3 ±0,6 ^b	2,7 ±1,4 ^c
NK	40,2 ±2,2 ^b	0,4 ±0,3 ^c	59,4 ±2,0 ^a
NS	58,9 ±0,3 ^a	0,1 ±0,0 ^c	41,0 ±0,3 ^b
NAS	57,7 ±0,7 ^a	0,2 ±0,2 ^c	42,2 ±0,6 ^b
P-verdi	0,001	0,001	0,001

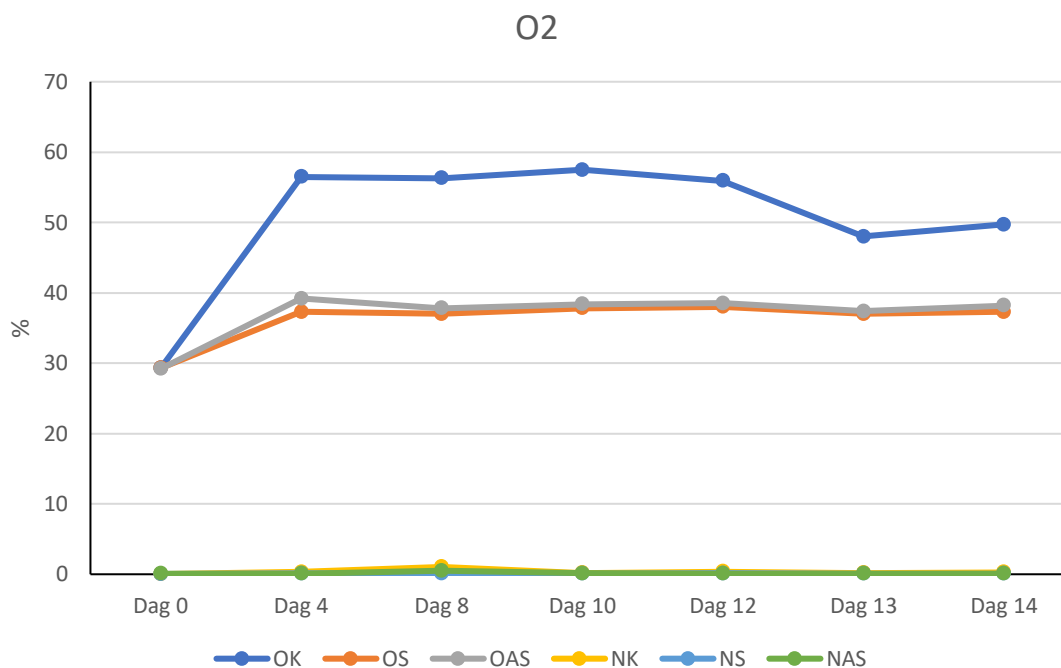


Figur 16 Utvikling av CO₂ for; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene

¹⁵ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest (p<0,001). I hver rad indiker bokstaven signifikante forskjeller mellom gruppen, der det ikke er bokstaver er det ingen signifikante forskjeller.



Figur 17 Utvikling av N₂ for; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene

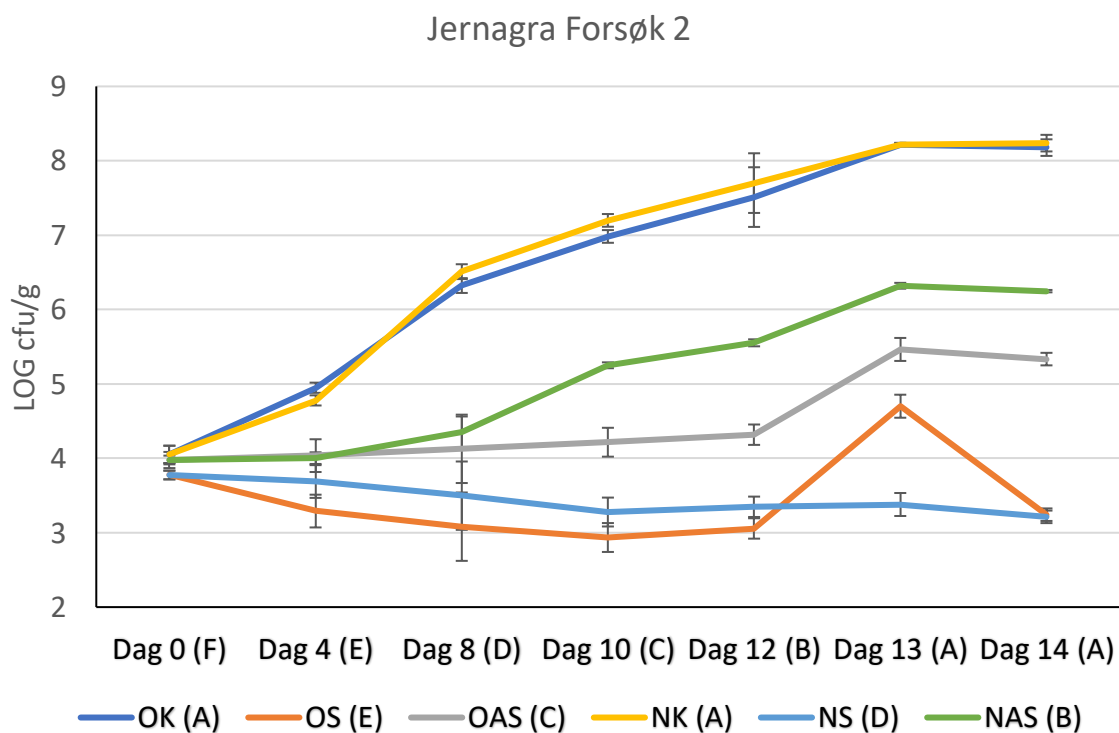


Figur 18 Utvikling av O₂ for ; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene

4.3.3. Totalt aerobt kimtall

Figur 19 viser utviklingen av det totale aerobe kimtallet (på JA) kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de reseptive analysedagene. Det både OK og NK overstiger 10⁶ CFU/g mellom fire og åtte dagers lagring (4 °C). NAS oversiger 10⁶ CFU/g mellom 12 og 13 dagers lagring (4 °C). Det er lite vekst for OS og NS gjennom hele perioden. Det ble funnet korrelasjon mellom JA og L&H (r=0,900)(p<0,001) og presutive Pseudomonas (r=0,898)(p<0,001). Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen (p<0,001) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest (p<0,001).(figur 19)

Der gruppe NK og OK har signifikant større vekst av aerobe bakterier.

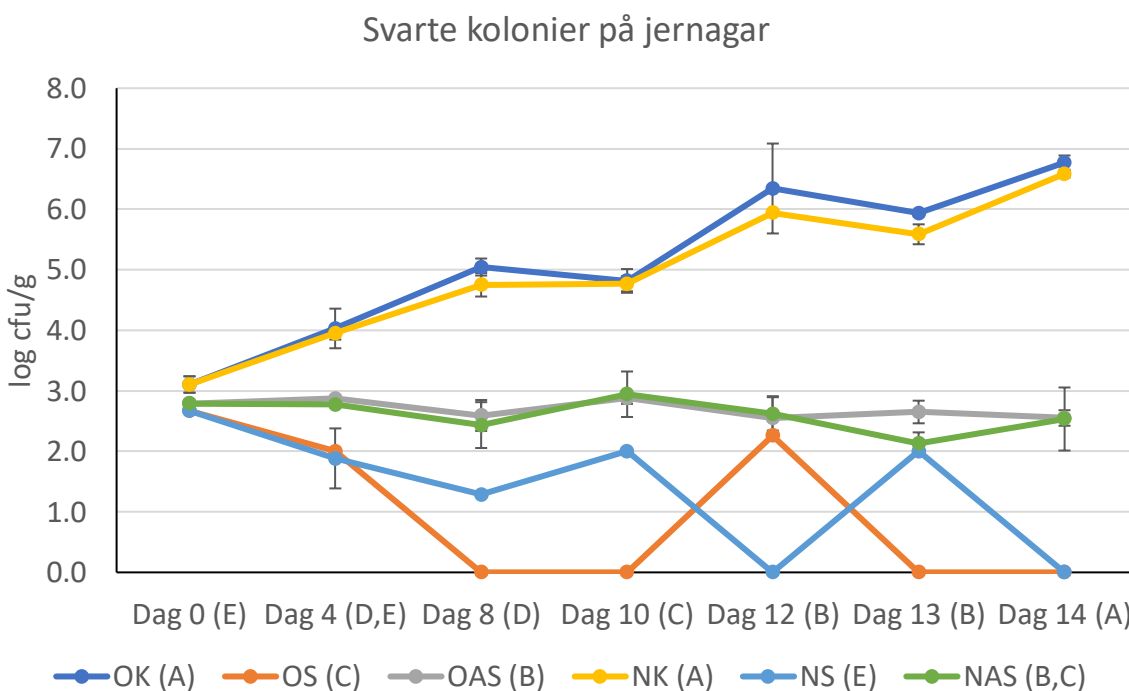


Figur 19 Vekstekruver for totale aerobt kimtall på jernagar for; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagen. Dataene viser den gjennomsnittlig log CFU/g ± standardavvik.¹⁶

¹⁶ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest (p<0,001). De ulike bokstavene indikere signifikante forskjeller, der det ikke er noe bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

4.3.4. H₂S produserende bakterier

Figur 20 viser H₂S produserende bakterier (svarte kolonier på JA) kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de reseptive analysedagene. For OS og NS ble det funnet sporadisk og lite vekst der kolin antallet var under 15 for alle prøvene. For enkelte dager ble det ikke funnet noen svarte kolonier. Hovedvekten av H₂S produserende bakterie ble funnet i kontrollprøven OK og NK der den stiger fra log 3,1 CFU/g på dag 0 til 6,6 log CFU/g etter 14 dagers lagring (4 °C). Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen (p<0,001) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest (p<0,001).(figur 20) Der gruppe OK og NK har signifikat høyere andel av svarte kolonier.

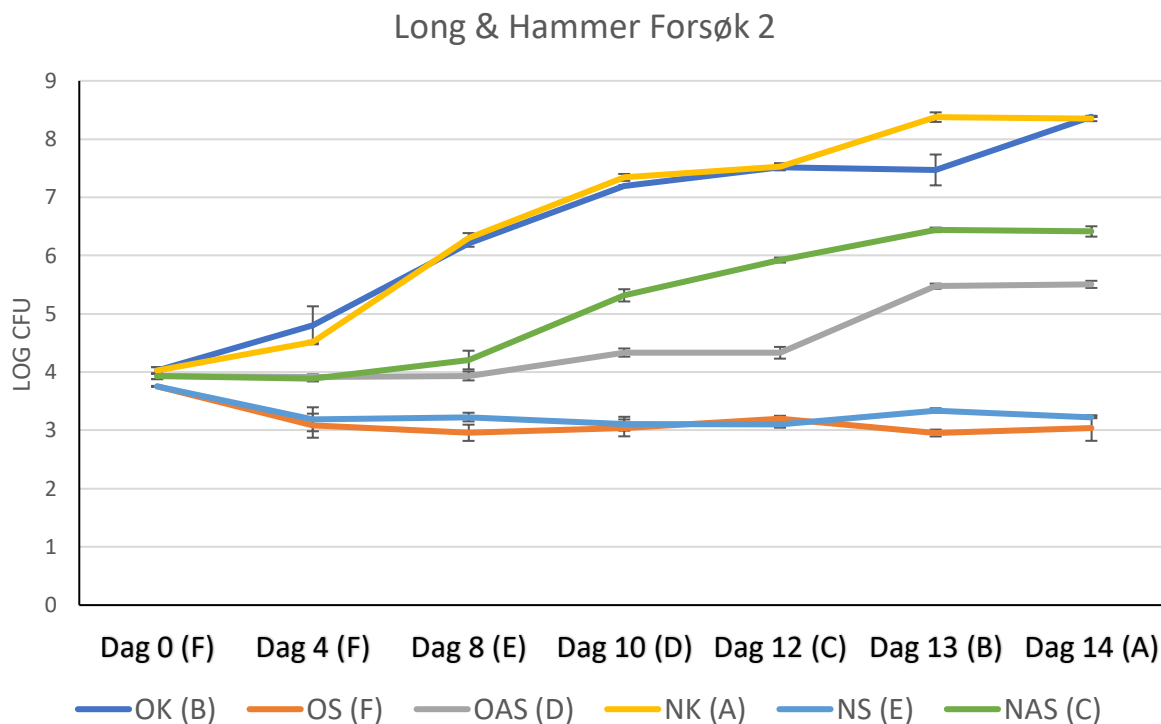


Figur 20 Vekstkurven for H₂S produserende bakterier (svarte kolonier på jernagar) for; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataene viser den gjennomsnitt log CFU/g ± standardavvik.¹⁷

¹⁷ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest (p<0,001). De ulike bokstavene indikere signifikante forskjeller, der det ikke er noe bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

4.3.5. Totalt psykrotroft kimtall

Figur 21 viser veksten psykrotroft kimtall (vekt på L&H) for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de reseptive analysedagen. Den kan også selektert for *photobaterium* og *virbor* ved at disse forekommer som lysende kolonier. I dette forsøket ble det ikke funnet .Der kontrollprøven pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK) eller CO₂:O₂ (70:30) (OK) er over 10⁶ CFU/g etter åtte dager. Det ble funnet korrelasjon mellom L&H og JA(r=0,990)(p<0,001) og mellom L&H og presumptive Pseudomonas (r=0,875) (p<0,001). Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen (p<0,001) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest (p<0,001).(figur 21) Der gruppe NK har signifikant høyest vekst av psykrotroftkrotofe bakterier.

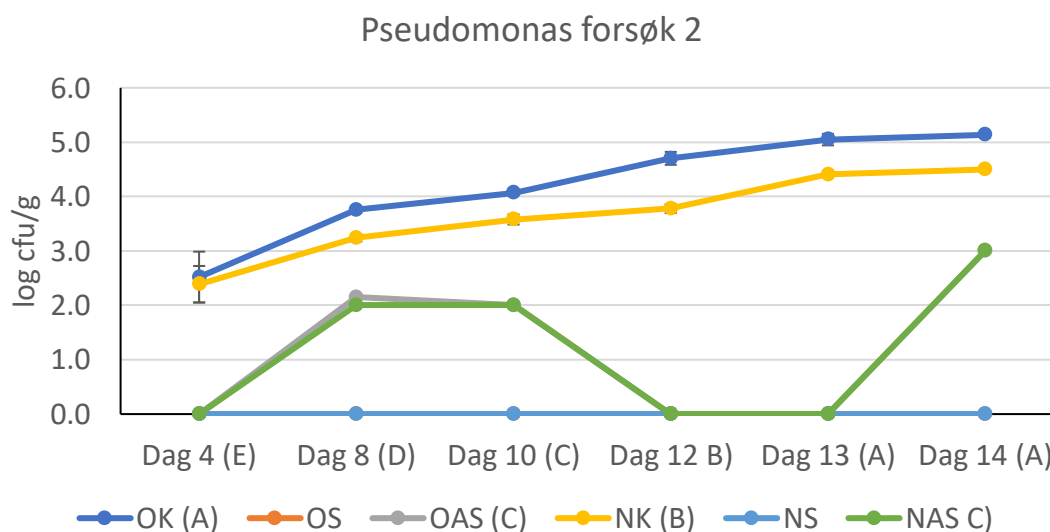


Figur 21 vekstkurver for psykrotroftkotoft kimtall på Long & Hammer for; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataene viser den gjennomsnitt log CFU/g ± standardavvik.¹⁸

¹⁸ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest (p<0,001). De ulike bokstavene indikere signifikante forskjeller, der det ikke er noenbokstaver er det ingen signifikante forskjeller

4.3.6. Vekstkurve presumtiv Pseudomonas

Figur 22 viser utviklingen av presumtiv Pseudomonas for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de reseptive analysedagene. Det ble ikke funnet noen kolonier på dag null. For OAS og NAS ble det det kun oppdaget på dag åtte, ti og fjorten. Det var ingen vekst for gruppen OS eller NS. Det ble funnet korrelasjons mellom presumtiv pseudomonas og L&H ($r=0,875$) ($p<0,001$) og presumtiv pseudomons og JA($r=0,898$) ($p<0,001$). Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p<0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p<0,001$). (figur 22) På pseudomonas agar kan det forekomme fluoriserende bakterier som kan være en indikasjon på *pseudomonas spp.* I dette forsøket ble det oppdaget fluoriserende kolonier for OK, NK og OAS. Det kan også forkomme rosa kolonier på agaren noe som kan være en indikasjon på *aeromonas spp* noe som kun ble oppdaget for gruppen NK. Disse resultatene er vist i vedlegg



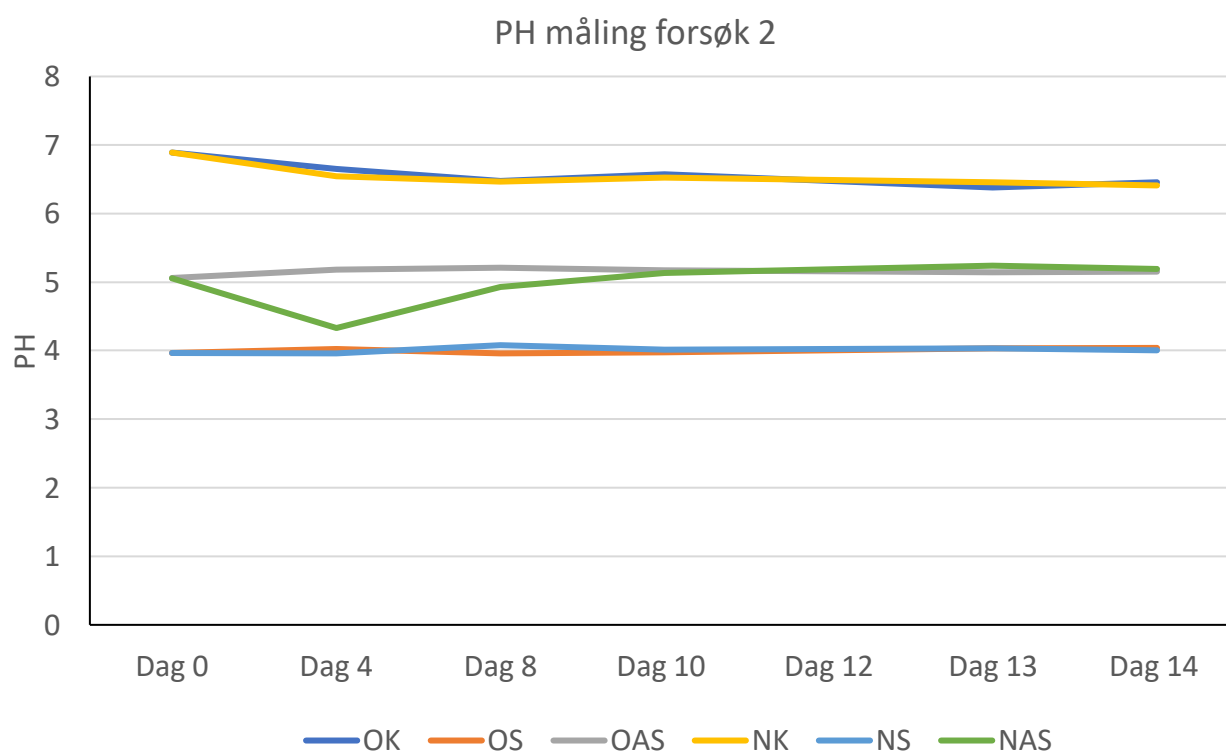
5

Figur 22 Vekstkurver for psesumtive pseudomonas for; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataene viser den gjennomsnitt log CFU/g ± standardavvik.¹⁹

¹⁹ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p<0,001$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller, der det ikke er noe bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

4.3.7. PH

Figur 23 viser pH utviklingen for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de reseptive analysedagene. Der de ulike blandingene holder jevn pH gjennom hele lagringstiden. Kontroller har en pH på ca 6, Alge +sitronsyre har en pH på ca 5 og sitronsyre har en pH på ca 4. Det ble funnet en korrelasjon mellom vekst på JA (r=0,729) (p<0,001) og L&H(r=0,722)(p<0,001) og pH. En negativ korrelasjon mellom pH og presumptive pseudomonas (r=-0,703) (p<0,001).

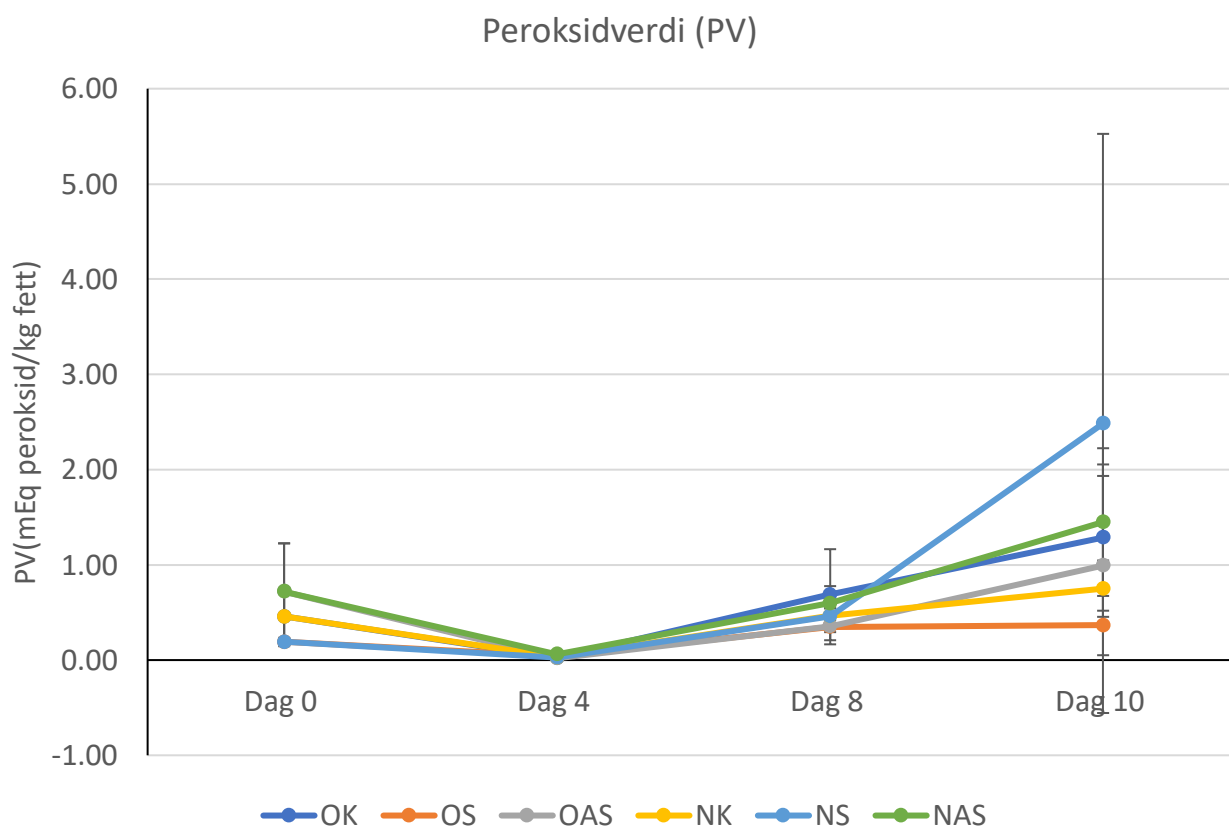


Figur 23 pH utviklingen i krabbekjøttet for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene.

4.3.8. Dannelse av peroksider

Figur 24 viser det primære oksidasjonsproduktet i prøven i form av peroksidverdi (PV) for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de representative analysedagene.

Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p > 0,05$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p > 0,05$). (figur 24)

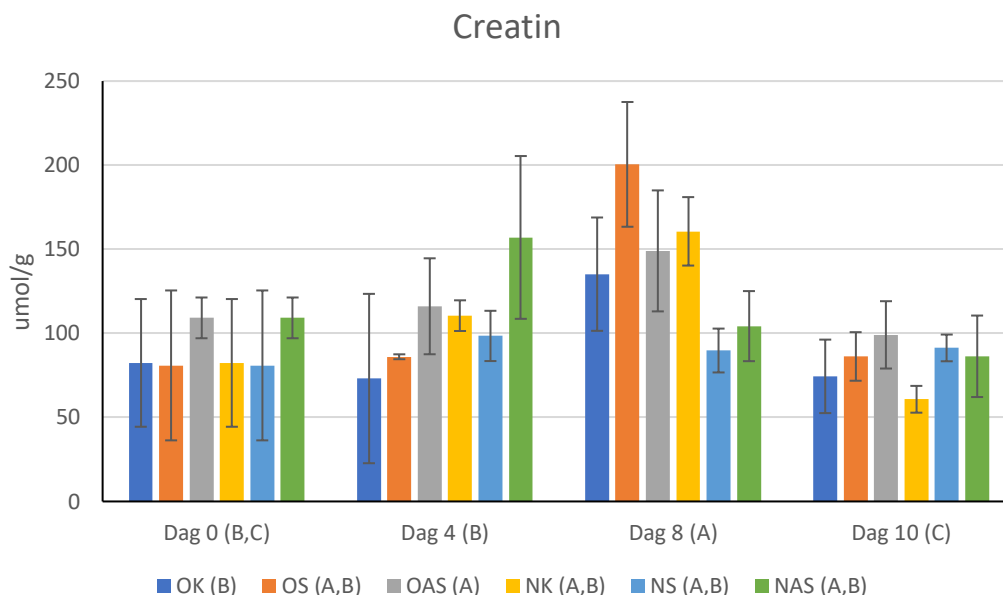


Figur 24 Forandring i peroksidverdien (PV) i krabbekjøttet for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataene viser den gjennomsnitt mEq peroksid/ kg fett ± standardavviket.

4.3.9. Nedbrytningsproduktet av ATP

Det ble oppdaget lavt innhold av ADP på dag ti for alle prøvene. Det ble kun oppdaget ADP på dag åtte for kontrollprøvene pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK). Fullt resultat finnes i vedlegg 3.

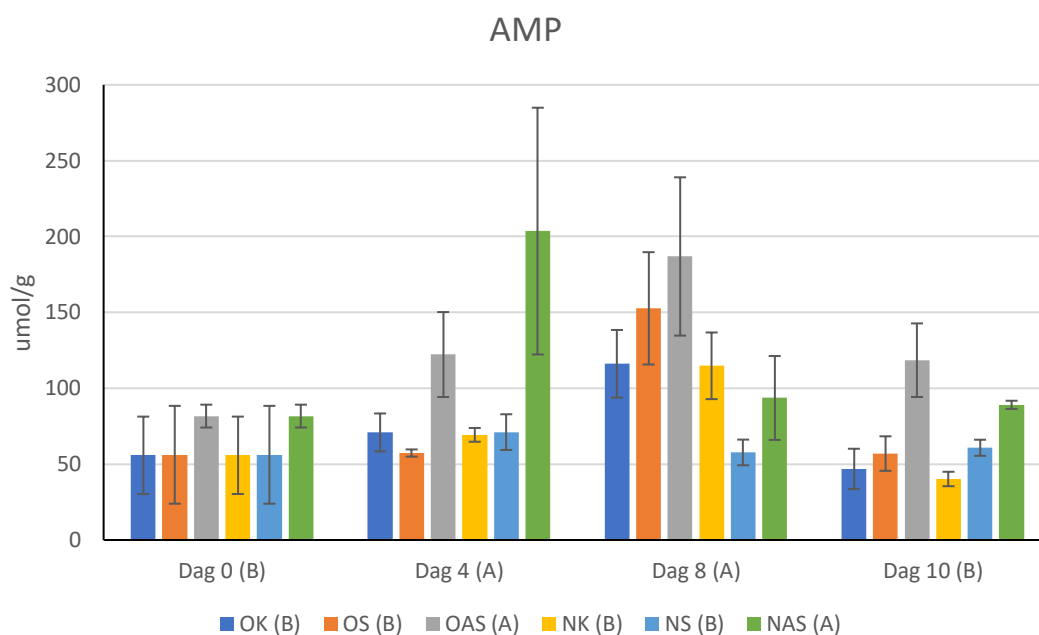
Figur 25 viser utvikling av $\mu\text{mol/g}$ creatin for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på analysedag null, fire, åtte og ti. Der den høyest verdien for OS er på 200 $\mu\text{mol/g}$ creatin på dag åtte. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p > 0,05$) og forskjellen mellom dagen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 25)



Figur 25 utvikling av $\mu\text{mol/g}$ creatin for; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataene viser den gjennomsnittlige utvikling $\mu\text{mol/g} \pm \text{standardavvik}$.²⁰

²⁰ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller. Der det ikke er noe bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

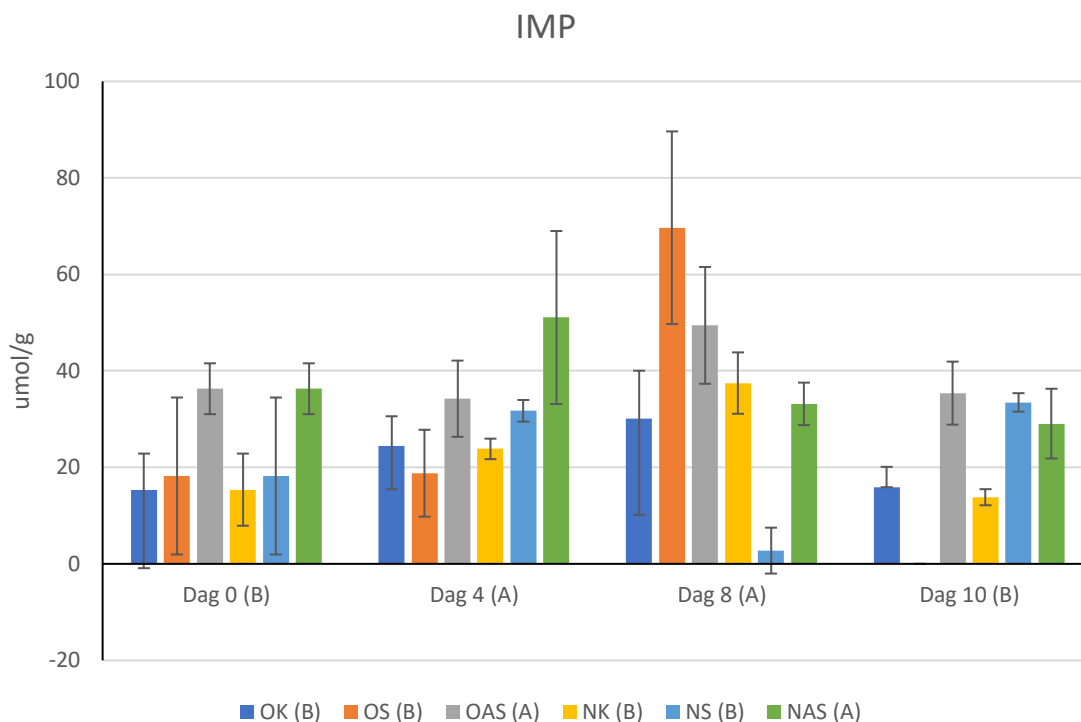
Figur 26 viser utvikling av $\mu\text{mol/g}$ AMP for kontrollprøven pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OK) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OAS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NS) på analysedag null, fire, åtte og ti. Der den høyeste verdien for NAS er på 201 $\mu\text{mol/g}$ på dag fire. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 26)



Figur 26 utvikling av $\mu\text{mol/g}$ AMP for; kontrollprøven pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OK) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OAS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataene vise den gjennomsnittlig utvikling $\mu\text{mol/g} \pm$ standardavvik. ²¹

²¹ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller. Der det ikke er noen bokstaver er det ingen signifikante forskjeller.

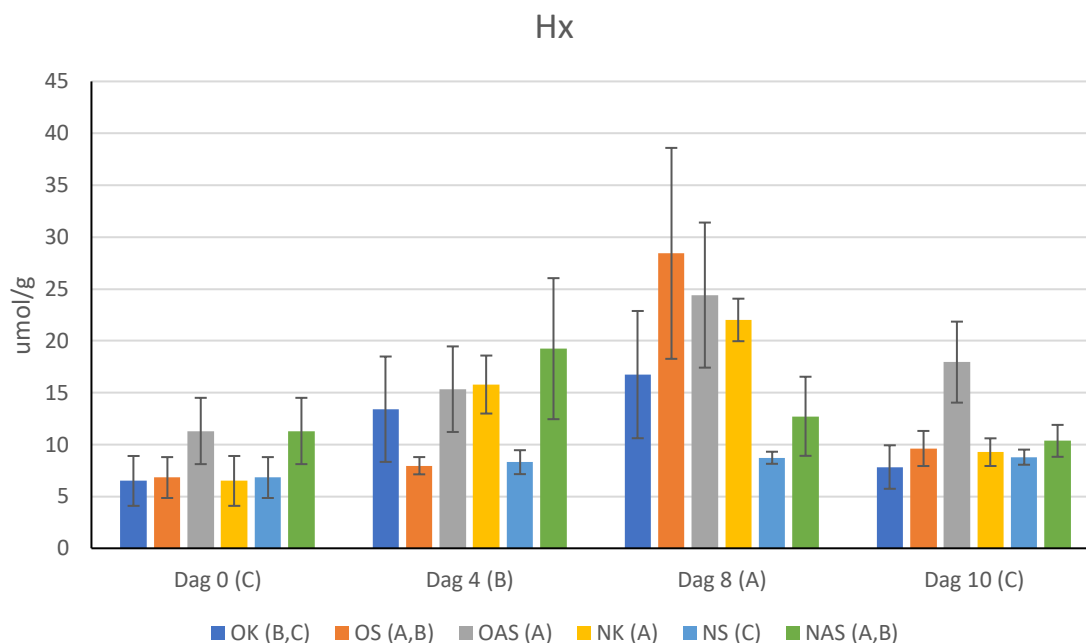
Figur 27 viser utvikling av $\mu\text{mol/g}$ IMP for kontrollprøven pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OK) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OAS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NS) på analysedag null, fire, åtte og ti. Der det høyest verdi på 69 $\mu\text{mol/g}$ for OS på dag åtte. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 27)



Figur 27 Utvikling av $\mu\text{mol/g}$ IMP for; kontrollprøven pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OK) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OAS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataene viset den gjennomsnittlig utvikling $\mu\text{mol/g} \pm$ standardavvik.²²

²² Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikerer signifikante forskjeller. Der det ikke er noen bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

Figur 28 viser utvikling av $\mu\text{mol/g}$ Hx for kontrollprøven pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OK) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OAS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NS) på analyse dag null, fire, åtte og ti. Der det er høyest verdi på 28 $\mu\text{mol/g}$ for OS på dag åtte. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen ($p < 0,001$) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). (figur 28)

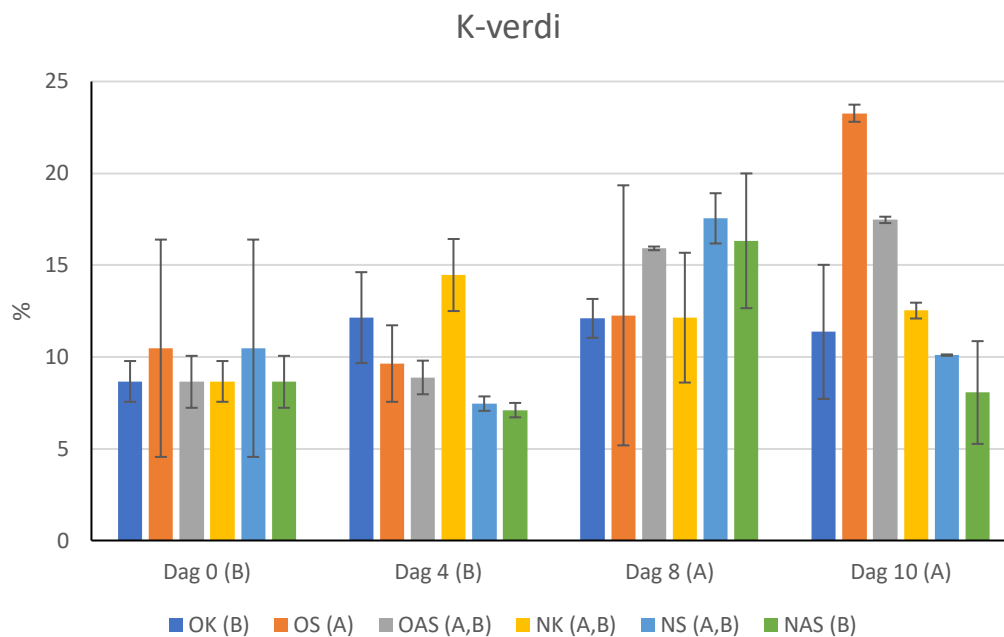


Figur 28 utvikling av $\mu\text{mol/g}$ Hx for ; kontrollprøven pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OK) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OAS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (70:30) (OS) eller pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) (NS) på de ulike analysedagene. Dataen viser den gjennomsnittlige utvikling $\mu\text{mol/g} \pm$ standardavvik. ²³

²³ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest ($p < 0,001$). De ulike bokstavene indikere signifikante forskjeller. Der det ikke er noen bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

4.3.10. K-verdi

K-verdi bregnes ut fra nedbrytningsproduktene til ATP som er vist i figur 29 for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) på analyse dag null, fire, åtte og ti. Der OS skiller seg ut på dag ti med høyest verdi på 23%. Den signifikante forskjellene mellom de ulike gruppen (p<0,05) er forklart ved bruk av GLM med Duncan sammenligningstest (p<0,001).(figur 29)



Figur 29 Utvikling av K-verdien (%) i krabbekjøttet for; kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS)) på de ulike analysedagene. Dataene vise den gjennomsnittlig % ± standardavvik ²⁴

Hovedeffekten av alle parameter for kontrollprøven pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NK), 1,5 % (w/w) alge + 1% (w/w) sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OAS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NAS), 2,5% sitronsyre pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OS) eller pakket i CO₂:N₂ (70:30) (NS) er vist i vedlegg 4.

²⁴ Det ble funnet signifikante forskjeller ved bruk av (GML) med Duncan sammenligningstest (p<0,001). De ulike bokstavene indikere signifikante forskjeller. Der det ikke er noen bokstaver er det ingen signifikante forskjeller

5. Diskusjon

5.1. Råstoffet

Hitramat produserer ulike krabbeprodukter, men ut fra ønsker fra dem ble det valg å ta utgangspunkt i et av deres produkter i form av fylt krabbeskjell. Dette produktet består av hvit krabbekjøtt og brunt krabbekjøtt pakket i et krabbeskjell. Krabbekjøttet toppes med en krabbeklo og litt rogn før alt pakkes i plastbeger og pakkes i MAP (CO₂:N₂ (70:30)). Alt dette arbeidet skjer manuelt og her kan det være stor fare for kontaminering fra mennesker, dette aspektet ble ikke vurdert i denne oppgaven, men det kan være en medvirkende faktor for dårlig holdbarhet. Der resultatet av de mikrobiologiske undersøkelsen av melkesyrebakterie (vis på MRS-agar), totalt aerob kimtall (vekst på jernagar) og total psykrotroftkotofe kimtall (vekst på Long & Hammer) vis er at generelt var høyere vekst i det brune kjøttet og det hvite kjøttet. Det ble også funnet korrelasjon mellom gruppen som tyder på at de har noe av den samme lik vekstenkurve, der MRS og L&H hadde best korrelasjon ($r=0,986$)($p<0,001$). Det ble valgt å fokusere på den brune og hvite-krabbekjøtt på grunn den mikrobiologisk veksten og at det er den største andelen av det fylte krabbeskjellet. For å få et utgangspunkt av råmaterialer ble mikrobiologiske undersøkelser og det ble sett på den kjemisk sammensetningen av vanninnhold og protein. På grunnlag av at resultatene av fettprosenten ikke ble registrert ble aske + fettinnholdet beregnet. Ut fra tidligere forsøk utført av Maulvault et al. (2012) utført på kokt muskel og brunt krabbekjøtt ble det funnet et høyere vanninnhold sammenlignet med dette forsøket, men protein innholdet er relativt likt. Selv om i dette forsøket var det store standardavvik spesielt for protein da det var en del problemer knyttet til denne analysen.

Krabbekjøttet som ble brukt var ulike for forsøkene, der forsøk 1 var det pakket i beger på 1 kg, mens i forsøk 2 var kjøttet platefrost i store vakumposer. Dette kan ha vært med på å skape ulikheter mellom krabbekjøttet i de to forsøkene. Krabbekjøttet består av blandinger av ulike krabber som kan være fanget på ulike steder i fra Helgeland i nord og møre kysten i vest, som gjør at de kan ha en ulike flora fra start. Denne ulikheten i fangstområde gjør at det er lite sporbarhet og det ikke lite kontroll på råstoffet. Da blant annet fangstområdet, fangstmetoden og frakte tid til fabrikk kan påvirke kvaliteten til krabbekjøttet. Denne ulikheten i floraen er noe som veksten av mikroorganismer på JA for kontrollprøve (K) viser.

For forsøk 2 vokser fra 4,05 log CFU/g til 8,2 log CFU/g etter 14 dagers lagring (4 °C), mens for forsøk 1 vokser den fra 3,8 log CFU/g til 7,6 log CFU/g etter 15 dagers lagring (4 °C)

For begge forsøkene ble det gjennomført kjemiske analyser i form av fett, protein og vanninnhold og mikrobiologiske analyser på de ulike komponenten av råmaterialer. Dette ble utført får å kunne se om det kunne bestemme utgangspunktet i prøven da dette er lite kjent.. Den kjemiske sammensetningen er lik relativt for kontrollprøven i begge forsøkene som tyder på at blandingen av hvitt- og bruntkrabbekjøtt inneholder ca. 24% vann, 16% protein og 7,4 % fett. Tidligere forsøk gjennomført av Maulvault et al. (2012) vise noe like resultater for fett og protein, men et høyere vanninnhold. Da dette forsøket var utført på muskel og brunt krabbekjøtt er det ikke helt sammenlignbart, men det gir en indikasjon på antatt innhold.

5.2. Forsøk 1 - Effekten av tilsetningsstoffene

Resultatene av de mikrobiologiske analysene på Jernagar (JA) viser at det kun er kontrollprøven (K) som når 10^6 CFU/g i løpet av lagringsperioden mellom åtte og ni dagers lagring (4 °C). Det psykrotroft kimtallet for gruppe K overstiger 10^6 CFU/g mellom ni og ti dagers lagring (4 °C). Den mikrobielle aktiviteten bør ikke overstige 10^6 CFU/g, resultater over dette er ikke egnet for human konsum (Broekaert et al., 2011) Blandingens tilsatt tørket alge (A) når 6 log CFU/g etter 15 dagers lagring (4 °C) på JA og Long & Hammer (L&H). Ved å se på vekstkurven til både JA og L&H så er det hovedsakelig på kontrollprøven og algeprøven som visuelt har noen vekst av mikroorganismer, da de andre prøvene har lite økning i veksten under hele lagringen. Den høye mikrobielle veksten var forvente for kontrollprøven, da den fra undersøkelser gjennomført av Hitramat AS, viser at den har en holdbarhet på åtte dager, noe som stemmer med funnen utført i dette forsøket .Dette tyder på at bruk av tørket alge har en effekt på å minke den mikrobielle veksten. På grunn av at prøven var lagret over 4 °C i løpet av lagringsperioden kan ikke holdbarheten fastsettes, men resultatene gir indikasjon på effekten av tilsetningsstoffene.

Prøven som inneholder tørket alge, natriumacetat eller en kombinasjon av disse, senker den mikrobielle aktiviteten uten at den senker pH. Dette kan tyde på at det er andre komponenter i disse stoffene som virker antimikrobielt på produktet. Blant annet inneholder alger polyfonere som tidligere har vist seg å antimirkobielle effekt (Eom et al., 2012).

Bruk av sitronsyre senker den mikrobielle veksten ved å senke pH'en i prøven. Årsaken til det lave veksten kan være at få bakterier trives ved lav pH. Ved å se på den mikrobiologiske

veksten kan det tyde på at pH rundt 4 hemmer utviklingen av bakterier betydelig. Ved å se på korrelasjonen mellom pH og den mikrobielle veksten på JA ($r=0,465$) ($p<0,001$) og L&H ($r=0,679$) ($p<0,001$) er det en viss korrelasjon. Dette kan tyde på at det er en viss sammenheng mellom pH og vekst av mikroorganismer. For å undersøke om det er noe likhet i den mikrobielle veksten ble det målt korrelasjon mellom JA og L&H ($r=0,828$) ($p<0,001$).

Det ble observert under prøvetakingen at prøven som var tilsatt sitronsyre slapp væske under lagringsperioden. Dette ble ikke testet, men dette bør undersøkes i videre studier.

Væskeslipp kan skyldes den lave pH-verdien i disse produktene, da lav pH kan forårsake væskeslipp på grunn av at cellen er rundt pI og ikke klare å holde på vannet. Alle prøvene som er tilsatt tørket alge, ble observert til å få en grønnlig farge noe som kan virke sensorisk negativ på forbrukerne- Dette bør undersøkes nærmere i videre arbeid. Den grønne fargen kan skyldes at det ble brukt tørket alge i pulver form som har en grønnlig farge.

Ved veksten av H₂S produserende bakterier (svarte kolonier på JA) så hemmes dette av tilstedeværelsen av sitronsyre. Der krabben tilsatt 5 % (w/w) sitronsyre i forhold til produkt kun har sporadisk vekst ved dag null og dag ti. Den lave veksten av H₂S produserende kan skyldes den lave pH. For både natriumacetat (Yesudhasan et al., 2014) og sitronsyre (Schirmer et al., 2009) har tidligere vist seg å ha effekt på å hemme veksten av H₂S produserende bakterier, noe som kan ha bidratt til den lave og sporadiske veksten. En vanlig H₂S produserende bakterie funnet i sjømat er *Shewanella* (Andreani and Fasolato, 2017) og er den er også funnet i krabbe (Robson et al., 2007).

For å støtte opp under de mikrobiologiske analysene ble det også gjennomført kjemiske analyser i form nedbrytningsproduktet til ATP og peroksidverdi(PV). Prøven starter på alt fra 3,9 til 0,6 mEq periosider /kg fett for Sitronsyre (S) og Kontroll (K). Dette antyder det at det ikke er noe oksidasjon i krabben. Dette støttes opp av tidligere forsøk gjennomført av Anacleto et al. (2011) på cancer pegasue (taksekrabbe) som viser PV etter 13 dager på mellom 4-7 mEq peroksi/kg fett, noe som støtter opp under at utviklingen av periosider i krabbe er under den aksepterte verdien på 20 mEq /kg fett og under verdien 5 mEq/kg fett som regnes som ikke oksider olje. Dette kan skyldes at krepsdyr, som krabbe, inneholder karatnioder som astaxanthin, som er et antioksidant, kan være med å hindre oksidasjon (Brown et al., 2017). Dette bør undersøkes nærmere. Det kan også være gunstig å undersøke for sekundære oksidasjonsprodukter ved bruk av for eksempel anisidin verdi

Det er utført ingen, eller svært lite forskning på metabolismen til taskekrabbe (cancer pegasus), noe som gjør det vanskelig å vurdere resultatene av nedbrytningsproduktene til ATP i prøvene. Undersøkelsen utført på metabolisme til krepsdyr er hovedsaklig utført på hummer og reker. Der Mendes et al. (2001) har funnet ut at for krepsdyr AMP hovedkomponenten, mens for fisk er dette IMP. I dette forsøket ble det funnet et høyer innhold av AMP sammenlignet med IMP i alle prøven, med unntaka av prøven som er tilsatt Alge (A) og Alge + natriumacetat (AN). Disse har høyere innhold av IMP enn AMP gjennom hele lagringen. Disse er også signifikant forskjellig fra de andre gruppene ($p < 0,05$). Noe som tyder på at tørket alge påvirker denne nedbrytningsprosessen.

Det samme gjelder for Hyposantin (Hx) der A og AN skiller seg ut fra de andre med høyest vekst og de er signifikat forskjellig fra de andre gruppene ($p < 0,01$). På grunn av det lave innholdet av Hx i kontrollprøven (K) kan dette tyde på at den ikke er påvirket av den mikrobielle veksten siden K har størst vekst av mikroorganismer gjennom hele forsøket. Teorien tilsier også at Hx ikke skal være tilstede før antall bakterier når over 10^6 CFU/g muskel (Hong et al., 2017) noe som ikke er tilfelle her. Dette tyder på at det er autolytiske enzymer som katalyserer denne reaksjonen i produktet. Hx bidrar til dårlig lukt og smak i produktet og er mye brukt som ferskhetsindikator (Mendes et al., 2001).

Resultatet av nedbrytningsproduktet av ATP tyder på at blandingen med tørket alge (A) skiller seg ut på de fleste områder. Dette kan tyde på at det å tilsette tørket alge i krabben gjør noe med krabbens metabolisme. På grunn av den manglende kunnskapen om metabolismen til krabben, er det vanskelig å vurdere resultatene av denne analysen. Basert på de store standardavvikene i analysene er det derimot vanskelig å konkludere noe basert på disse resultatene. Dette bør derfor undersøkes videre.

Ut fra nedbrytningsproduktet av ATP beregnes K-verdien. I dette forsøket var den høyeste verdien for Alge (A) på 23% på dag åtte. Kontrollprøven har høyest verdi etter fire dager på 12 %. Denne lave verdien kan tyde på at K-verdien ikke er en god indikator på ferskhet for krabbe. K-verdien er noe lav for alle prøvene sammenlignet med analyser utført på reker som var lagret i åtte dager der k-verdien er oppe i 40%. (Li et al., 2017). Da K-verdien hovedsakelig er brukt til å vurdere ferskhet til fisk, før den mikrobielle veksten blir for høy (over 10^6 CFU/g) (Hong et al., 2017). Forsking gjennomført av Mendes et al. (2001) utført på hummer og reker tyder på at krepsdyr ikke har lik metabolisme som fisk og det kreves mer forskning for å bruke K-verdien som en ferskhetsindikator.

5.3. Forsøk 2- Effekt av pakkemetode

Et utvalg av de undersøkte gruppene ble videre brukt for å undersøke gas miksens betydning for produktets holdbarhet og kvalitet. Kontrollprøvene både pakket i CO₂:O₂ (70:30) (OK) og CO₂:N₂ (70:30) (NK) er over grensen på 10⁶ CFU/g som er grensen for humant konsum etter åtte dagers lagring (4 °C) både for aerobe bakterie (vekst på JA) og psykrotrofe bakterier (vekst på L&H) (Broekaert et al., 2011) . Disse funnene stemmer med forsøk utført av Hitramat AS som antyder at krabbekjøtt pakket i MAP(CO₂:N₂ (70:30)) har en holdbarhet på åtte dagers lagring (4 °C). Krabben pakket i CO₂:N₂ (70:30) blandet med alge + sitronsyre (NAS) passerer 10⁶ CFU/g mellom 12 og 13 dagers lagring (4 °C) både for JA og L&H.. Denne signifikant lavere veksten for gruppe OAS og NAS sammenlignet med kontrollprøven kan indikere at det å bruke alge + sitronsyre er med på å senke den mikrobielle aktivitet, noe som igjen forlenger holdbarheten. Det ble funnet signifikante høyere vekst av mikroorganismer for gruppen NAS enn for OAS gjennom lagringen, noe som kan tyde på at at det å pakke i CO₂:O₂ (70:30) kan minke veksten av mikroorganismer. Tidligere forsøk utført på torsk (Johnsen, 2016) og reker (López-Caballero et al., 2002) har vist at bruk av oksygen er med på å forlenge holdbarheten til produktet i kombinasjon med CO₂. Ved å se på vekstkurven til OAS og NAS er det først etter åtte dager det er mulig å skille disse prøven. På grunn av den høye veksten av mikroorganismer på dag åtte for kontrollprøven er det ikke mulig å se denne effekten. Krabben tilsatt sitronsyre når 10³ i løpet av hele lagringsperioden på 14 dager, dette kan skyldes den lave pH-verdien (pH=4) som skyldes sitronsyrer. Da mange mikroorganismer ikke trives ved så lav pH. Noe gjør det vanskelig å se en klar effekt av å pakke i CO₂:N₂ (70:30), selv om det ble funnet signifikante forskjeller mellom prøven på JA og L&H. En mulig negativ effekt av den lave pH-verdien var at det ble observert endel væskeslipp i disse prøven i løpet hele lagringsperioden. Den lave pH-verdien kan føre til at musklene slipper vann på grunn av den lave vannbindingsevnen (Matak et al., 2015).

H₂S produserende bakterier i form av svarte kolonier ble funnet i alle prøven. I prøven tilsatt sitronsyre (S) ble det kun funnet svarte kolonier, sporadisk og i små mengder. Dette kan tyde på disse ikke trives ved lav pH. OK og NK har den største andelen med svarte kolonier (OK 6,8 log CFU/g)(NK 6,6 log CFU/g) etter 14 dagers lagring (4 °C). Det er lavere vekst for OAS og NAS der koloniantallet er under 15 kolonier per plate fra og med dag åtte noe som gir et lavt kimtall på 2,5 log CFU/g etter 14 dager for begge prøvetypene. Den lave veksten av H₂S produserende kan skyldes den lave pH. For både natriumacetat (Yesudhasan et al., 2014) og sitronsyrer (Schirmer et al., 2009) har tidligere vist seg å ha effekt på å hemme

veksten av H₂S produserende bakterier, noe som kan ha bidratt til den lav og sporadiske veksten. En vanlig H₂S produserende bakterie funnet i sjømat er *shewanella* (Andreani and Fasolato, 2017). Denne bakterien er også funnet i krabbe (Robson et al., 2007).

For forsøk 2 ble det også testet for presumtiv *pseudomonas* siden den trives i miljø med oksygen. Selv om *pseudomonas* trives best med oksygen, er den funnet i MAP pakker uten oksygen (Andreani and Fasolato, 2017). Noe som vi ser i denne oppgaven da det både er vekst av presumtive *pseudomonas* for gruppe OK og NK. Det er signifikant høyere vekst av presumtive *pseudomonas* for OK. Dette kan tyde på at det er noe bedre vekst med tilgang på oksygen. På *Pseudomonas* agaren kan det forekomme fluoriserende kolonier som kan være en indikasjon på *pseudomonas* spp og rosa kolonier som kan indikere på *aeromonas* spp. Det ble detektert fluoriserende kolonier for gruppe OK, og NK. For gruppen NK ble det også detektert rosa kolonier noe som kan være en indikasjon på *aeromonas* spp. Dette kan skyldes at *aeromonas* spp vokser i kjøleromtemperaturer uten oksygen tilstede (Batra et al., 2016). Sporadisk vekst på under to kolonier per plate for OAS og NAS etter 14 dagers lagring (4 °C). På grunn av det lave pH i prøven tilsatt sitronsyre er det ingen vekst siden *pseudomonas* har et pH optimum på 5,8 (Andreani and Fasolato, 2017).

Ved å se på korrelasjonen mellom den mikrobiologiske veksten på JA, L&H og *pseudomonas* ser man om de har noe likheter i vekstkurver som kan være en indikasjon på likheter i vekstkurven. Korrelasjonen mellom JA og L&H ($r=0,990$) indikerer at disse har en svært lik vekstkurven. Det samme gjelder for JA og *pseudomonas* ($r=0,898$) og L&H og *pseudomonas* ($r=0,875$).

Ved å se på gass-sammensetting i prøven skjer det en endring i kontrollprøven som har ukjent årsak. Kontrollprøven skiller seg ut ved at CO₂ innholdet er lavere enn i de andre prøvene, mens for N₂ og O₂ er innholdet høyere. Forskning gjort på pakking av torsk har vist at CO₂ kan produseres i pakningen når natriumkarbonat og sitronsyre er tilstede (Sivertsvik et al., 2002b). Noe som kan være grunnen til at prøvene tilsatt sitronsyre har et høyere innhold av CO₂, da dette dannes i pakken. Mens i kontrollprøven er CO₂ løst i produktet og dermed blir innholdet av CO₂ lavere. Årsaken til høyere N₂ og O₂ innhold er fortsatt ukjent.

For å støtte opp under de mikrobiologiske analysene ble det også gjennomført kjemiske analyser i form av nedbrytningsproduktet til ATP og peroksidverdi (PV). PV i krabben er lav

etter 14 dager der den høyeste verdien er 2,5mEq peroksid/kg fett for prøve OK. Denne lave verdien kan tyde på at det skjer lite oksidasjon i krabben. Det samme ble funnet i forsøk 1 og støttes opp av tidligere forsøk gjennomført av Anacleto et al. (2011) på cancer pagurus (taskekrabbe). Den lave PV kan skyldes at krepsdyr som krabbe inneholder karotenoider som astaxanthin som er et antioksidant som kan være med å hindre oksidasjon. (Brown et al., 2017) Noe som bør undersøkes nærmere. Det kan også være gunstig å undersøke for sekundære oksidasjonsprodukter ved bruk av for eksempel anisidin verdi.

Det er utført svært lite forskning på metabolismen til taskekrabbe (cancer pegasus), noe som gjør det vanskelig å vurdere resultatene av nedbrytningsproduktene til ATP i prøvene. Undersøkelsen utført på metabolisme til krepsdyr er hovedsakelig utført på hummer og reker. Der Mendes et al (2001) har funnet ut at for krepsdyr AMP hovedkomponenten, mens for fisk er dette IMP. Noe som stemmer med dette forsøket da alle prøvene har høyere innhold av AMP. Hx bidrar til dårlig lukt og smak i produktet og er mye brukt som ferskhetsindikator (Mendes et al., 2001). Teorien tilsier også at Hx ikke skal være tilstede før antall bakterier når over 10^6 CFU/g muskel (Hong et al., 2017). Dette er ikke tilfelle her. Da det er funnet Hx i prøven allerede fra dag 0. Dette tyder på at det er autolytiske enzymer som katalyserer denne reaksjonen i produktet.

Ved å på se at det gjennomsnittlige innholdet av nedbrytningsproduktene til ATP skiller gruppen OAS med det høyeste innholdet for de fleste parameter med unntak av ADP. Dette kan tyde på at tilsetningsstoffene påvirker nedbrytningsprosessen . På grunn av den manglende kunnskapen om metabolismen til krabben, er det vanskelig å vurdere resultatene av denne analysen. Basert på de store standardavvikene i analysene er det derimot vanskelig å konkludere noe basert på disse resultatene. Dette bør derfor undersøkes videre.

Den høyeste K-verdien er på 23% for OS etter ti dager. Selv om verdiene er lave ble det funnet signifikante forskjeller mellom gruppen på ($p < 0,05$) der NAS og OK er forskjellig fra OS. K-verdiene er noe lav for alle prøven sammenlignet med analyser utført på reker som var lagret i 8 dager der K-verdien er oppe i 40%. (Li et al., 2017). Denne lave verdien kan tyde på at k-verdien ikke er en god indikator på ferskhet for krabbe. Da K-verdien hovedsakelig er brukt til å vurdere ferskhet til fisk, før den mikrobielle veksten blir for høy (over 10^6 CFU/g) (Hong et al., 2017) (Hong et al., 2017). Forsking utført av Mendes et al (2001) på hummer og reker tyder på at krepsdyr ikke har lik metabolisme som fisk og det kreves mer forskning for å bruke k-verdien som en ferskhetsindikator.

5.4. Sammenligning av forsøk 1 og forsøk 2

Når resultatene fra forsøk 1 og 2 pakket i likt ($\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30)) sammenlignes er den mikrobiellvekst høyere for forsøk 2 enn i forsøk 1 allerede fra start. Dette kan skyldes at det brukt råmateriale med ulike pakkedato og pakkemetode noe som kan føre til at det har ulik flora fra start. Krabben har også et stort fangst område.

I forsøk 2 ble det valgt å gå ned til 2,5 % tilsetningsstoff i forhold til råmateriale, noe som også kan ha ført til en større vekst av mikroorganismer. I forsøk 1, ble det brukt 5% tilsetningsstoff av den totale vekten. Det ved å ha valgt å bruke sitronsyre (S) og alge + sitronsyre (AS) i forsøk 2 på grunn av den lav mikrobiologiske vekst. Ved å se den mikrobielle veksten i begge forsøkene er det kontrollprøven (K) som har høyest vekst og den når 10^6 CFU/g etter åtte dager lagring (4°C). Både i forsøk 1 og forsøk 2 når tilsetningsstoffene denne øvre grensen på 10^6 CFU/g i løpet av lagringsperioden. For forsøk 1 gjelder dette prøven tilsatt alge (A) etter 15 dagers lagring (4°C). For forsøk 2 gjelder dette prøven tilsatt AS pakket i $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (70:30) etter 13 dagers lagring (4°C). Prøven som inneholder AS har betydelig lavere vekst i forsøk 1 der veksten er under 10^4 CFU/g under hele lagrings perioden, mens for forsøk 2 er NAS over 10^6 CFU/g etter 13 dagers lagring (4°C). Dette kan skyldes noe høyere pH (ca pH 5) for forsøk 2 og pH er nede på ca 4 for forsøk 1. Denne endringen i pH skyldes endring i mengde sitronsyrer tilsatt, der for forsøk 2 er brukt 1%(w/w). Prøven tilsatt sitronsyre (S) har liten endring i veksten, som tyder på at 2 % sitronsyre har lik effekt som 5% sitronsyrer. Denne lave mikrobiologiske veksten kan være knyttet til den lave pH da i forsøk 2 (pH=4). Dette resultatet tyder på at et pH rundt 4 senker den mikrobiologiske veksten, og bakterier floraen i krabben ikke trives i dette miljøet.

Ved å nedbrytningsproduktet av ATP er det store forskjeller mellom forsøkene. Der det gjennomsnittlig innholdet av nedbrytningsproduktene var høyere for forsøk 1. Med unntak av ADP der det gjennomsnittlig innholdet er høyere for forsøk 2. ADP er oppdaget på dag null, for forsøk 1, mens det er funnet på dag åtte og ti for forsøk 2. Grunnen til dette er uklare på grunn av manglende forskning og trenger flere undersøkelser for å bekrefte dette resultatet. Ulikheten mellom forsøkene kan skyldes ulikhet i råstoffet i blant annet fangstområde, fangstmetode, pakkemetode og pakkedato. Alt dette kan være medfører til ulik flora i krabbekjøttet, Det er behov for mer forskning på dette område for å kunne konkludere med noe.

5.5. Svakheter i analysene

Ved gjennomførelsen av de ulike metoden ble det begått en del feil og det oppsto noe problemer med utstyret. Som for blant annet pH-målingen som ble gjennomført ved hver analyse dag, med unntak for dag 4 ved forsøk 1 og dag 12 ved forsøk 2. Dette skyldes problem med pH-meter. pH-metret var noe ustabil og dette kan ha gitt unøyaktige målinger. Samme pH- meter ble brukt under hele forsøket for å ha samme grunnlag for målingene. Det ble også opplevd en del problemer knyttet til Kjeldahl-apparat som benyttes til å finne proteininnholdet. Disse problemene var hovedsakelig knyttet til pH. Dette kan blant annet skyldes pH elektrodens plassering, men også pH i borsyren siden denne ikke ble kontrollert for hver gang. Dette kan være grunnen til de ustabile resultatene og store standardavvik. Analysen ble gjennomført flere ganger for å begrense det.

Ved utførelsen av Bling and Dyer og perioksidverdien (PV), var det viktig at prøven ikke ble for varm. Når fett er ekstrahert med Bling and Dyer, er det viktig at den ikke blir varm, og nedkjøles raskt for å hindre oksidasjon siden rent fett er ekstra utsatt for dette. Den rene olje ble benytte for å bestemme perioksidverdien i krabben. Nøyaktigheten av analysen er derimot noe usikker og resultatene varierer ut fra variasjoner i prosedyren.

For å vite mer om metabolisme til krabben, ble det undersøkte nedbrytningsproduktene til ATP. Det er utført ingen, eller svært lite forskning på metabolismen til taskekrabbe (cancer pegasus), noe som gjør det vanskelig å vurdere resultatene av nedbrytningsproduktene til ATP i prøvene. Undersøkelsen utført på metabolisme til krepsdyr er hovedsaklig utført på hummer og reker Det kan også være lett å mistolke resultatet, da det er vanskelig å skille stoffene fra hverandre. Det ble funnet sporadisk innhold av ATP i noen av prøven til om med dag 10. Dette kan tyde på en feiltolkning av resultatene, og ble derfor valg å ikke ta med dette.

For å sikre at gassinnholdet er stabilt i pakningen, ble gassinnholdet målt for hver forsøksdag. For forsøk 1 ble det ikke brukt gummi septum noe som kan ha unøyaktig gassmålingen da det kan komme inne oksygen fra omgivelsen under målingen. Målingen skjer ved at en nål stikker ned i pakken om denne nåle stikker skjefte gir det unøyaktige resultater. På grunn av unøyaktige resultatet i forsøk 1 ble det valgt å bruke gummi septum i forsøk 2. Dette septum settes på plastfilmen, slik at ikke luft fra omgivelsen kommer inn i pakningen. Dette gav en mer nøyaktig avlesing for forsøk 2.

6. Konklusjon

Basert på resultatene kan det konkluderes med at alle tilsetningsstoffene og de ulike blandingene ga økt holdbarhet til det MAP pakkede taskekrabbeproduktet. Tilsetning av sitronsyre ble videre funnet å hemme mikrobiologisk vekst basert på å sneke pH i produktet, noe som førte til et synlig tap av væske fra produktet. Det kan videre konkluderes med at tilsats av tørket alge og natriumacetat har god hemmende effekt på den mikrobielle veksten. Den antimikrobielle effekten hos tørket alge og natriumacetat skyldes andre effekter enn senket pH. Det å bruke tørket alge som et tilsetningsstoff ga prøven en noe grønnaktig farge, noe som kan virke negativ for forbrukeren. Det konkluderes derfor at det bør utføres en videre studie der betydningen av produktets farge blir undersøkt.

I oppgavens del 2 kan en konkludere med at krabbeproduktet pakket i CO₂:O₂ (70:30) har en positiv effekt på mikrobiell vekst og dermed vil forlenge produktets holdbarhet sammenlignet med å pakke produktet i CO₂:N₂ (70:30).

Basert på en samlet vurdering av forsøk 1 og 2 kan det konkluderes med at det er et potensiale i å bruke ulike tilsetningsstoffer for å forlenge holdbarheten til det undersøkte krabbeproduktet. Av de undersøkte tilsetningsstoffene vil det være hensiktsmessig å benytte natriumacetat eller tørket alge i kombinasjon med MAP (CO₂:O₂, 70:30). Det er derimot en usikkerhet knyttet til om forbrukeren vil akseptere et produkt med et svakt grønnskjær. Dette bør undersøkes i et videre arbeid der også smak bør vurderes.

7. Videre arbeid

Forsøkene bør gjentas for å sikre resultatene, og for å kunne si med større sikkerhet at tilsetningsstoffene fungerer. Det bør også testes å bruke ulike mengde av alle tilsetningsstoff for å se effekten av dette. Det kan være hensiktsmessig å pakke alle de ulike kombinasjonene av tilsetningsstoffene fra forsøk 1 i CO₂:O₂ (70:30), for å se om dette har noe effekt. Slik som resultatene i forsøk 2 viser .

Det bør gjennomføres sensoriske analyser for å vurder hvordan de ulike tilsetningsstoffene påvirker de sensoriske egenskapene til krabben. Siden det å benytte tørket alge i prøven påvirk fargen på produktet og dette bør derfor undersøke nærmere Det bør også vurder om det å bruke av de ulike tilsetningsstoffene påvirke smaken på produktet, da bland annet sitronsyre senker pH i produktet å dette kan påvirke smaken.

For å gjøre dette grundig, bør det gjennomføres en beskrivende test med et trent panel og videre kan det gjøres en CATA-test på forbrukere. Dette vil gi en full beskrivelse av krabbe tilsatt de ulike tilsetningsstoffene og hvordan det påvirker smak, utsende og lukt. Siden det å benytte tørket alge i prøven påvirk fargen på produktet og dette bør derfor undersøke nærmere gjennom sensoriske tester. Det bør også vurder om det å bruke tilsetningsstoffene

Det bør gjøres analyse på taskekrabbe for blant annet dens metabolisme siden dette er lite kjent og resultatene i dette forsøket var noe uklare med store standardavvik.

Andre analyser som bør ha vært gjennomført krabben er fargeanalyser, vanntapet, anisidin verdi og vannaktivitet, da det er utført lite forsikring på kokt krabbe og den holdbarheten. Dette bør spesielt gjøres for bruk av tilsetningsstoff siden dette ikke er utført på denne type krabbe.

Referanseliste

- ALFARO, B. & HERNANDEZ, I. 2013. Evolution of the indigenous microbiota in modified atmosphere packaged Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) identified by conventional and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 117-123.
- ANACLETO, P., TEIXEIRA, B., MARQUES, P., PEDRO, S., NUNES, M. L. & MARQUES, A. 2011. Shelf-life of cooked edible crab (*Cancer pagurus*) stored under refrigerated conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1376-1382.
- ANDREANI, N. A. & FASOLATO, L. 2017. Chapter 2 - Pseudomonas and Related Genera. *The Microbiological Quality of Food*. Woodhead Publishing.
- BARDEN, L. & DECKER, E. A. 2016. Lipid Oxidation in Low-moisture Food: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2467-2482.
- BATRA, P., MATHUR, P. & MISRA, M. C. 2016. *Aeromonas* spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, 8, 1-4.
- 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.
- BOU, R., CLARET, A., STAMATAKIS, A., MARTÍNEZ, B. & GUERRERO, L. 2017. Quality changes and shelf-life extension of ready-to-eat fish patties by adding encapsulated citric acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 5352-5360.
- BOZIARIS, I. S. 2013. *Seafood processing: technology, quality and safety*, John Wiley & Sons.
- BROEKAERT, K., HEYNDRIKX, M., HERMAN, L., DEVLIEGHERE, F. & VLAEMYNCK, G. 2011. Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiology*, 28, 1162-1169.
- BROWN, D. R., GOUGH, L. A., DEB, S. K., SPARKS, S. A. & MCNAUGHTON, L. R. 2017. Astaxanthin in Exercise Metabolism, Performance and Recovery: A Review. *Frontiers in Nutrition*, 4, 76.
- CAROCHO, M., MORALES, P. & FERREIRA, I. C. F. R. 2018. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107-120.

- CHENG, J.-H., SUN, D.-W., PU, H. & ZHU, Z. 2015. Development of hyperspectral imaging coupled with chemometric analysis to monitor K value for evaluation of chemical spoilage in fish fillets. *Food Chemistry*, 185, 245-253.
- COMI, G. 2017. Chapter 8 - Spoilage of Meat and Fish. *The Microbiological Quality of Food*. Woodhead Publishing.
- EMBUSCADO, M. E. 2015. 11 - Herbs and spices as antioxidants for food preservation A2 - Shahidi, Fereidoon. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Woodhead Publishing.
- EOM, S.-H., KIM, Y.-M. & KIM, S.-K. 2012. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3251-3255.
- FRANTZEN, S., DUINKER, A., SANDEN, M. & MÅGE, A. 2018. Kadmianalyser i produkter av taskekrabbe kjøpt inn i 2016. Havforskningsinstituttet
- GHALY, A. E., DAVE, D., BUDGE, S. & BROOKS, M. 2010. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques. *American Journal of Applied Sciences*, 7, 859.
- GHORBANI GORJI, S., SMYTH, H. E., SHARMA, M. & FITZGERALD, M. 2016. Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 88-102.
- GUNSTONE, F. D. 2004. The chemistry of oils and fats. *Sources, Composition, Properties and Uses*. Great Britain: Blackwell Publishing Ltd. 345p.
- GUPTA, S. & ABU-GHANNAM, N. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 315-326.
- HANDÅ, A., FORBORD, S., BROCH, O. J., RICHARDSEN, R., SKJERMO, J. & REITAN, K. I. 2009. Dyrking og anvendelse av tare, med spesiell fokus på bioenergi i nordområdene. *Sintef report SFH80 A*, 92036.
- HAVFORSKNINGSINSTITUTTET. 2008 *Taskekrabbe* [Online]. Havforskningsinstituttet: Havforskningsinstituttet. Available: <https://www.imr.no/temasider/skalldyr/taskekrabbe/nb-no> [Accessed 01.05.2018].
- 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.
- IBRAHIM SALLAM, K. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18, 566-575.

- JOHNSEN, O. 2016. *Fersk torsk bør pakkes med høyoksygen* [Online]. Forkning.no: Nofima. Available: <https://forskning.no/fisk-forbruk/2016/02/fersk-torsk-bor-pakkes-med-hoyoksygen> [Accessed 12.05.2018].
- KIRTIL, E. & OZTOP, M. H. 2016. Controlled and Modified Atmosphere Packaging. *Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- KOMPENDIUM FOR SKOLEÅRET 2002/2003, I. V. H. 2003. PEROKSIDTALL VED FERROTHIOCYANATMETODEN. *Laboratorieoppgaver i generell-, organisk- og næringsmiddelkemi, næringsmiddelteknologi og mikrobiologi for 1. klasse*,. Hist.
- LI, D., ZHANG, L., SONG, S., WANG, Z., KONG, C. & LUO, Y. 2017. The role of microorganisms in the degradation of adenosine triphosphate (ATP) in chill-stored common carp (*Cyprinus carpio*) fillets. *Food Chemistry*, 224, 347-352.
- LIAO, W.-R., LIN, J.-Y., SHIEH, W.-Y., JENG, W.-L. & HUANG, R. 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 433-439.
- LIU, F., ANTONIOU, J., LI, Y., MA, J. & ZHONG, F. 2015. Effect of sodium acetate and drying temperature on physicochemical and thermomechanical properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 45, 140-149.
- LÓPEZ-CABALLERO, M., GONÇALVES, A. & NUNES, M. 2002. Effect of CO₂/O₂-containing modified atmospheres on packed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *European Food Research and Technology*, 214, 192-197.
- MACÉ, S., JOFFRAUD, J.-J., CARDINAL, M., MALCHEVA, M., CORNET, J., LALANNE, V., CHEVALIER, F., SÉROT, T., PILET, M.-F. & DOUSSET, X. 2013. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 227-238.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BROCK, T. D., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H. & STAHL, D. A. 2015. *Brock biology of microorganisms*, Harlow, Pearson.
- MARIUTTI, L. R. B. & BRAGAGNOLO, N. 2017. Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. *Food Research International*, 94, 90-100.

- MASSA, A. E., PALACIOS, D. L., PAREDI, M. E. & CRUPKIN, M. 2005. POSTMORTEM CHANGES IN QUALITY INDICES OF ICE-STORED FLOUNDER (*PARALICHTHYS PATAGONICUS*). *Journal of Food Biochemistry*, 29, 570-590.
- MASTROMATTEO, M., CONTE, A. & DEL NOBILE, M. A. 2010. Combined Use of Modified Atmosphere Packaging and Natural Compounds for Food Preservation. *Food Engineering Reviews*, 2, 28-38.
- MATAK, K. E., TAHERGORABI, R. & JACZYNSKI, J. 2015. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. *Food Research International*, 77, 697-703.
- MATINFORMASJONSFORSKRIFTEN 2014, siste endre 2017. Forskrift om matinformasjon til forbrukerne (matinformasjonsforskriften). *In: LANDBRUKS- OG MATDEPARTEMENTET, N.-O. F., HELSE- OG OMSORGSDEPARTEMENTET (ed.)*. Lovdata.no.
- MATTILSYNET. 2012. *Tilsetningstoffer* [Online]. mattilsynet.no. Available: https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/tilsatte_stoffer/tilsetningsstoffer/ [Accessed 25.09.2017].
- MATTILSYNET. 2013. *Godkjenning av tilsetningsstoffer* [Online]. mattilsynet.no: Mattilsynet. Available: https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/tilsatte_stoffer/tilsetningsstoffer/godkjenning_av_tilsetningsstoffer.11241 [Accessed 02.12.2017].
- MATTILSYNET. 2014. *Tilsetningsstoff eller teknisk hjelpestoff - hva er forskjellen?* [Online]. Mattilsynet.no: Mattilsynet. Available: https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/tilsatte_stoffer/tilsetningsstoffer/tilsetningsstoff_eller_teknisk_hjelpestoff_hva_er_forskjellen.12848 [Accessed 05.03.2018].
- MAULVAULT, A. L., ANACLETO, P., LOURENÇO, H. M., CARVALHO, M. L., NUNES, M. L. & MARQUES, A. 2012. Nutritional quality and safety of cooked edible crab (*Cancer pagurus*). *Food Chemistry*, 133, 277-283.
- MCMILLIN, K. W. 2008. Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, 80, 43-65.
- MEDINA, J. V. & VARGAS, D. A. 2012. *Citric Acid : Synthesis, Properties and Applications*, New York, Nova Science Publishers, Inc.

- MENDES, R., QUINTA, R. & NUNES, M. L. 2001. Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast. *European Food Research and Technology*, 212, 141-146.
- NMKL NR 184 , N. M. F. N. 2006. Kimtal og spesifikke fordærvelsesbakterie i fisk og fiskevarer.
- OCAÑO-HIGUERA, V. M., MARQUEZ-RÍOS, E., CANIZALES-DÁVILA, M., CASTILLO-YÁÑEZ, F. J., PACHECO-AGUILAR, R., LUGO-SÁNCHEZ, M. E., GARCÍA-OROZCO, K. D. & GRACIANO-VERDUGO, A. Z. 2009. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chemistry*, 116, 933-938.
- PETRUZZI, L., CORBO, M. R., SINIGAGLIA, M. & BEVILACQUA, A. 2017. Chapter 1 - Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals. *The Microbiological Quality of Food*. Woodhead Publishing.
- QIU, X., CHEN, S., LIU, G. & YANG, Q. 2014. Quality enhancement in the Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) fillets stored at 4°C by chitosan coating incorporated with citric acid or licorice extract. *Food Chemistry*, 162, 156-160.
- ROBSON, A. A., KELLY, M. S. & LATCHFORD, J. W. 2007. Effect of temperature on the spoilage rate of whole, unprocessed crabs: *Carcinus maenas*, *Necora puber* and *Cancer pagurus*. *Food Microbiology*, 24, 419-424.
- 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.
- RYDER, J., KARUNASAGAR, I. & ABABOUCHE, L., EDS. 2014. Assessment and management of seafood safety and quality: current practices and emerging issues. Rome, FAO: FAO.
- SATOMI, M. 2014. The Family Shewanellaceae. *The Prokaryotes*. Springer.
- SCHIRMER, B. C., HEIBERG, R., EIE, T., MØRETRØ, T., MAUGESTEN, T., CARLEHØG, M. & LANGSRUD, S. 2009. A novel packaging method with a dissolving CO₂ headspace combined with organic acids prolongs the shelf life of fresh salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 154-160.
- SIVERTSVIK, M., JEKSRUD, W. K. & ROSNES, J. T. 2002a. 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. & BERGSLIEN, H. 2002b. Modified atmosphere packaging. *Minimal processing technologies in the food industry*, 61-86.
- SKJERMO, J., FORBORD, S., STEINHOVDEN, K. & HANDÅ, A. 2014. Tilrettelegging for dyrking av butare i Trøndelag.
- SKJERMO, J., STEINHOVDEN, K., KVALØYSÆTER, C., HAARSTADSTRAND, H., SVENNING, S. & HANDÅ, A. 2015. Mat fra dyrket tare: Produksjon av norsk "wakame" fra butare- Sluttrapport i kvalifiseringsprosjekt finansiert av RFF Midt-Norge.
- TANNER, D. 2016. Impacts of Storage on Food Quality. *Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- WOLL, A. K. 2005. *Taskekrabbe*, Møreforking Ålesund, Møreforking Ålesund.
- YESUDHASON, P., LALITHA, K. V., GOPAL, T. K. S. & RAVISHANKAR, C. N. 2014. Retention of shelf life and microbial quality of seer fish stored in modified atmosphere packaging and sodium acetate pretreatment. *Food Packaging and Shelf Life*, 1, 123-130.
- YILMAZ, S., UNAL, F., AKSOY, H., YUZBASIOGLU, D. & CELIK, M. 2008. Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on allium chromosomes. *Fresen Environ Bull*, 17, 1029-37.
- ZHANG, M., MENG, X., BHANDARI, B., FANG, Z. & CHEN, H. 2015. Recent Application of Modified Atmosphere Packaging (MAP) in Fresh and Fresh-Cut Foods. *Food Reviews International*, 31, 172-193.

Jernagar

1. Det veies opp 17,44 gram Jernagar base uten L-cystenin (OXIOID CM0964) i 500 ml Schottflakser og det tilsettes 400 ml destillert vann.
2. Løsningen autoklaveres ved 121°C i 15 min. Flasken avkjøles i romtemperatur før den settes i kjøleskap (for å unngå at flasken sprekker) frem til analysedagen.
3. Før bruk dampes mediet opp for å sikre at alt er smeltet og settes i vannbad for å avkjøles ned til 45°C for det kan tilsettes 3,2 ml L-cystein (sluttkonsentrasjon 0,04%).
4. L-cystein tillages ved at 2 gram L-cystein pulver blandes i 40 ml destillert vann, som sterilfiltreres (0,2 µm) ved bruk av 10 ml sprøyter.
5. 1,0 ml av det respektive prøven overføres til petriskåler og agarer helles over og alt blandes ved bruk av åttetall bevegelser. Det bli påført et tynt topplag med jernagar tilsatt L-cystein etter at det første laget har stivnet

Long & Hammer

1. De ulike komponenten veies opp i en Erlendmeyerkolbe på 1000 ml og det tilsettes 600 ml destillert vann.
 - • 12 g peptose-pepton No 3
 - • 9 g agar
 - • 24 g gelatin,
 - • 0,6 g K₂HPO₄ ,
 - • 6,0 g NaCl
2. Mediet varmes for å løse opp pulveret i vannet før løsningen autoklaveres ved 121°C i 15 min.
3. Mediet tempereres til 45°C før det tilsettes 1,5 ml Fe(III)NH₄Citrat løsning (sluttkonsentrasjon 0,025%) .
4. Fe(III)NH₄Citrat løsning tillages ved at 0,6 g Fe(III)NH₄Citrat og tilsettes 60 ml destillert vann. Løsningen steriliseres ved bruk av sterilfilter (0,2 µm)
5. . Petriskåler med vekstmedium oppbevares ved 11 °C frem til bruk. 0,1 ml av den respektive prøven overføres til den respektive skålen

Kjemiske metoder

Fett

Ved oppveining av prøvemengde må det tas hensyn til vanninnholdet. Det veies ut en prøvemengde som utgjøre 1 cm³ vann. Dette ble beregnet ut fra tørrvekten til de ulike prøvene.

1. Prøven veies opp i sentrifugerør og vekten noteres ned. Det ble laget tre paralleller per prøve.

2. Hvert av rørene tilsettes 3 ml ionebyttet vann, 10 ml metanol og 5 ml kloroform. Prøvene homogeniseres i 1 minutt ved bruk av en ULTRA-TURRAX® op 9500.
3. Tilsett deretter 5 ml kloroform og homogeniseres i 20 sekunder.
4. Tilsett 5 ml ionebyttet vann og homogeniseres i 20 sekunder.
5. Prøvende sentrifugeres i 10 min. ved 7000 RPM ved 4°C.
6. Etter sentrifugering er det tre faser: vann, fast form og kloroform. Ved bruk av en pasteur-pipette overføres kloroformfasen til reagensrør.
7. 1 ml av kloroformfasen pipetteres over i forhåndsveid kimaxrør. Kimaxrørene settes til avdamping ved bruk av nitrogen i ca. 15 minutter før rørende veies på nytt og fett % beregnes.
8. Den resterende oljen dampes av i ca. 10-15 minutter slik at all kloroformen er dampet av. Prøvene oppbevares i -80°C frysen frem til analyse av peroksidverdi.

Formel for berging av % fett:

$$\%fett = \frac{\text{rør med fett}(g) - \text{rør uten fett} * \text{kloroform tilsatt}}{\text{Prøve}(g) - \text{klorofom uttak}} * 100$$

Peroksidverdi

Tillaging av løsningsene

3,7 % HCl: 100 mL 37 % (kons.) HCl Fortynn til 1 L med ionebyttet vann

Jern(II)klorid i 3,7 % HCl: 200 mg Fe(II)Cl₂·x4H₂O Fortynn til 50 mL med 3,7% HCl

Jern(III)klorid i 3,7 % HCl: 48,4 mg Fe(III)Cl₃·x6H₂O Fortynn til 100 mL med 3,7 % HCl

30% vandig ammoniumthiocyanat: 7,5 g NH₄SCN Fortynn til 25 mL med ionebyttet vann

Alle løsninger ble oppbevart i kjøleskap , og de har holdbarhet på Max en uke.

1. Det ble laget en standardkurve for hver dag. Stigningstallet for standardkurve brukes for å beregne peroksidverdi (PV) . Standardkurven lages ved at en serie med reagensrørmerkes 1 til 5 og tilsettes 10 ml etanol og 200 µl isooktan. Rørene tilsettes der etter Fe(III)-løsning og 3,7 % HCl ut fra tabell X

Rør nr.	Volum Fe(III)løsning (μl)	Volum HCl (μl)
1	0	200
2	50	150
3	100	100
4	150	50
5	200	0

- 200 μl ammoniumthiocyanat tilsettes i et og et rør og blandes i 15 sekunder med vortexmikser. Absorbansen måles av etter 3 minutter fra ammoniumthiocyanat er tilsatt. **Tiden er svært viktig.** Absorpsjonen måles med spektrofotometer ved 500nm. Etanol brukes for å nullstille spektrofotometret.
- Oljeprøven fortynnes i 2 ml isooktan og ca 20 mg olje. Vekten noteres nøyaktig ned. Alle prøvene oppbevares på is dekket med svart tøyestykke. For å unngå lys som gir mer harskt produkt.
- 10 ml etanol, 200 μl oljeprøve med isooktan, 200 μl Fe(II)-løsningen has i kimax-rør. Det lages også blankprøve ved at 200 μl isooktan tilsette i stedet for oljeprøve-løsningen.
- 200 μl ammoniumthiocyanat tilsettes i et og et rør og blandes i 15 sekunder med vortexmikser. Absorbansen måles av etter 3 minutter fra ammoniumthiocyanat er tilsatt. Det måles max fem prøver av gangen slik at alle prøvene skal måles etter 3 minutter. Tiden er svært viktig.

Peroksidverdi (pv) beregnes ut fra følgende formel:

$$\text{mengde prøve}(g) = \text{mengde innveid olje}(g) * \frac{200 \mu\text{l}}{\text{isooktan tilsatt prøven}(\mu\text{l})}$$

$$PV(\text{mEq peroksid}/\text{kg fett}) = \frac{(\text{Abs prøve} - \text{Abs blind}) * \text{stignisdtallt til standarkruve}}{55,84 * 2 * \text{mengde prøve}(g)}$$

Gassmålinger forsøk 1

S	Co2	O2	N2
Dag 0	70,3	0,034	29,666
Dag 4	58,3	0,189	41,511
Dag 7	49,8	2,15	48,05
Dag 8	55,9	0,727	43,373
Dag 9	53,7	0,993	45,307
Dag 10	56,7	0,204	43,096
Dag 11	51	1,09	47,91
Dag 15	56,8	0,102	43,098

N	Co2	O2	N2
Dag 0	70,3	0,018	29,682
Dag 4	34,1	1,03	64,87
Dag 7	35,5	0,139	64,361
Dag 8	32,2	1,49	66,31
Dag 9	33,6	1,61	64,79
Dag 10	20,6	12,1	67,3
Dag 11	29,8	3,16	67,04
Dag 15	29,4	2,21	68,39

A	Co2	O2	N2
Dag 0	69,9	0,096	30,004
Dag 4	34,9	1,73	63,37
Dag 7	33,2	2,63	64,17
Dag 8	28,5	5,08	66,42
Dag 9	34,9	1,89	63,21
Dag 10	13,1	11,7	75,2
Dag 11	32,7	2,63	64,67
Dag 15	38,4	0,802	60,798

K	Co2	O2	N2
Dag 0	69,1	0,091	30,809
Dag 4	33,9	1,56	64,54
Dag 7	38,1	0,651	61,249
Dag 8	31,6	2,77	65,63
Dag 9	31,4	2,97	65,63
Dag 10	36,1	0,946	62,954
Dag 11	20,6	7,49	71,91
Dag 15	32,3	2,44	65,26

SN	Co2	O2	N2
Dag 0	70,4	0,027	29,573
Dag 4	54,5	0,564	44,936
Dag 7	54,5	0,564	44,936
Dag 8	55,3	1,17	43,53
Dag 9	58,1	0,12	41,78
Dag 10	53,6	1,17	45,23
Dag 11	50,7	1,73	47,57
Dag 15	55,4	0,613	43,987

AN	Co2	O2	N2
Dag 0	70,4	0,039	29,561
Dag 4	36,1	1,09	62,81
Dag 7	36,8	0,673	62,527
Dag 8	32,3	2,35	65,35
Dag 9	36,8	0,288	62,912
Dag 10	17,4	10	72,6
Dag 11	17,4	10	72,6
Dag 15	30,2	2,64	67,16

AS	Co2	O2	N2
Dag 0	69,7	0,022	30,278
Dag 4	48,2	2,75	49,05
Dag 7	56	0,656	43,344
Dag 8	54,9	0,642	44,458
Dag 9	56	0,545	43,455
Dag 10	55,2	0,775	44,025
Dag 11	52,2	1,37	46,43
Dag 15	29,3	6,53	64,17

ASN	Co2	O2	N2
Dag 0	70,1	0,051	29,849
Dag 4	56,5	0,446	43,054
Dag 7	54,1	1,23	44,67
Dag 8	56,7	0,581	42,719
Dag 9	55,4	0,657	43,943
Dag 10	56,7	0,504	42,796
Dag 11	55,3	0,643	44,057
Dag 15	29,5	5,6	64,9

OK	CO2	O2	N2
Dag 0	70,6	29,3	0,1
Dag 4	41,6	56,5	1,9
Dag 8	38,3	56,3	5,4
Dag 10	38,4	57,5	4,1
Dag 12	36,3	55,9	7,8
Dag 13	48,1	48	3,9
Dag 14	47	49,7	3,3

OS	CO2	O2	N2
Dag 0	70,6	29,3	0,1
Dag 4	59,3	37,3	3,4
Dag 8	58,6	37	4,4
Dag 10	60,3	37,8	1,9
Dag 12	60	38	2
Dag 13	60,6	37	2,4
Dag 14	59,3	37,3	3,4

OAS	CO2	O2	N2
Dag 0	70,3	29,2	0,5
Dag 4	60,7	39,2	0,1
Dag 8	57,8	37,8	4,4
Dag 10	58,2	38,4	3,4
Dag 12	58,6	38,5	2,9
Dag 13	60	37,4	2,6
Dag 14	58,8	38,2	3

NK	CO2	O2	N2
Dag 0	70,7	0,028	29,272
Dag 4	41,4	0,328	58,272
Dag 8	37,5	1,039	61,461
Dag 10	37,6	0,17	62,23
Dag 12	40,3	0,385	59,315
Dag 13	42,1	0,172	57,728
Dag 14	42,3	0,262	57,438

NS	CO2	O2	N2
Dag 0	70,3	0,042	29,658
Dag 4	59,3	0,133	40,567
Dag 8	58,6	0,11	41,29
Dag 10	59,1	0,092	40,808
Dag 12	58,4	0,119	41,481
Dag 13	58,9	0,103	40,997
Dag 14	59,1	0,091	40,809

NAS	CO2	O2	N2
Dag 0	70,7	0,066	29,234
Dag 4	57,7	0,073	42,227
Dag 8	56,5	0,508	42,992
Dag 10	57,6	0,145	42,255
Dag 12	57,4	0,091	42,509
Dag 13	58,6	0,096	41,304
Dag 14	58,2	0,103	41,697

ADP forsøk 1

ADP	K	A (B,C)	N (A,B)	S (D)	AN (C)	AS (C)	SN (A)	ASN (A,B, C)
Dag 0 (B)	1,96	1,83±0,77	1,00±0,87	2,34±0,32	2,03±0,54	2,00±0,11	0,68±0,59	1,10±0,16
Dag 4 (A)				1,33±0,23				
Dag 8 (A)								
Dag 10 (A)								

ADP forsøk 2

ADP	OK	OS	OAS	NK	NS	NAS
Dag 0						
Dag 4						
Dag 8		68,18±16,05	5,01±1,94	33,88±17,57	24,26±3,04	5,96±5,62
Dag 10	20,15±5,73	24,48±4,98	1,81±0,63	17,20±1,57	25,80±2,27	11,05±16,27

Hovedeffekt forsøk 1

Parameter	70% CO ₂ + 30% N ₂								P-verdi				
	S	A	N	SN	AN	AS	ASN	K	P-modell	P-alge	P-natriumcatet	P-sitronsyre	P-dag
JA log CFU/g	3,92	4,77	4,18	3,73	4,26	3,62	3,98	5,73	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
JA svarte log CFU/g	1,86	3,73	3	3,02	3,06	4,04	2,92	4,04	0,001	0,649	0,001	0,141	0,001
L&H log CFU/g	2,93	4,56	3,92	3,39	4	2,72	3,78	5,44	0,001	0,002	0,009	0,001	0,001
Creatin	197,7	200,6	193,9	176,2	197,95	187,39	180,83	205,15	0,009	0,89	0,16	0,062	0,029
ADP	0,92	0,45	0,25	0,17	0,51	0,49	0,33	0,19	0,001	0,715	0,001	0,503	0,001
AMP	214,5	59,21	209	190,9	74,59	196,18	219,4	191,92	0,001	0,001	0,202	0,001	0,001
IMP	60,35	279	70,96	52,88	269	56,87	64,44	62,62	0,001	0,001	0,867	0,001	0,002
In	21,58	17,37	7,31	10,89	7,47	2,44	3,52	4,57	0,001	0,015	0,004	0,955	0,001
Hx	25,08	52,57	28,1	22,77	67,36	25,36	25,59	25,32	0,012	0,005	0,482	0,004	0,219
K-verdi	14,61	17,81	11,19	12,01	16,8	9,96	9,51	10,51	0,001	0,189	0,361	0,011	0,301

Hovedeffekt forsøk 2

Parameter	70% CO ₂ + 30% O ₂			70% CO ₂ + 30% N ₂			P-verdi				
	K	S	AS	K	S	AS	P model	P gass	P alge	P sitronsyre	P dag
JA log CFU/g	6,6	3,22	4,49	6,67	3,45	5,1	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
JA svarte log CFU/g	5,15	2,45	2,69	4,95	1,95	2,62	0,001	0,013	0,001	0,001	0,001
L&H log CFU/g	6,51	3,15	4,48	6,63	3,28	5,16	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Pseudomoas log CFU/g	4,21		2,33	3,64		2,33	0,001	0,001			0,001
Creatin	91,26	113,4	129,1	103,6	90,1	114,19	0,001	0,847	0,093	0,605	0,001
ADP	5,03	23,16	1,69	12,17	12,51	4,25	0,001	0,213	0,001	0,001	0,001
AMP	65,76	80,79	128,1	70,03	61,45	116,99	0,001	0,361	0,001	0,687	0,001
IMP	21,47	26,66	39,15	22,62	21,54	37,39	0,001	0,626	0,001	0,447	0,001
In	0,71	7,24	8,53	0,89	3,49	3,23	0,001	0,03	0,623	0,005	0,001
Hx	11,12	13,21	17,18	13,88	8,16	13,41	0,001	0,102	0,001	0,175	0,001
K-verdi	11,06	13,91	12,29	11,95	11,39	10,03	0,001	0,09	0,136	0,172	0,001

Fluoriserende kolonier og rosa kolonier på pseudomonas agar

OK	Dag 4-1	Dag 4-2	Dag 4-3	Dag 8-1	Dag 8-2	Dag 8-2	Dag 10-1	Dag 12-1	Dag 12-3	Dag 13-1	Dag 13-2	Dag 14-2
-2	1	1	2	5	7	2						
-3							1	1	2		2	2
-4										1		

NK	Dag 4-2	Dag 8-1	Dag 8-2	Dag 8-2	Dag 10-1	Dag 10-2	Dag 13-1	Dag 13-2	Dag 14-2	Dag 14-3
-2	1	2+ 3 rosa	1	3						
-3	1				3 rosa	1 + 1 rosa	1	2	3 rosa	5 rosa

OAS	Dag 8-1	Dag 8-2	Dag 10-2	Dag 14-3
-1				
-2	1	1	1	
-3				1