

Hanna Østvik

Bioaktive komponenter fra butare (*Alaria esculenta*) som ingrediens i aktiv emballasje for økt holdbarhet og mattrygghet i modifisert atmosfærepakket laks (*Salmo salar* L.)

Masteroppgave i Mat og teknologi

Veileder: Jørgen Lerfall

Mai 2020

Hanna Østvik

**Bioaktive komponenter fra butare
(*Alaria esculenta*) som ingrediens i aktiv
emballasje for økt holdbarhet og
mattrygghet i modifisert
atmosfærepakket laks (*Salmo salar* L.)**

Masteroppgave i Mat og teknologi
Veileder: Jørgen Lerfall
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Sammendrag

I denne masteroppgaven skulle det undersøkes om bioaktive komponenter fra butare (*Alaria esculenta*) kunne benyttes som ingrediens i en aktiv emballaseløsning for økt holdbarhet og mattrygghet i et filetprodukt av Atlantisk laks (*Salmo salar L.*). Videre skulle en optimal blansjeringsmetode utarbeides basert på minst mulig denaturering av de bioaktive komponentene; polyfenoler og fucoxanthin. I tillegg ble butarens totale antioksidantkapasitet vurdert. Butaren ble blansjert i ulike tid og temperaturregimer etterfulgt av frysetørking. Det ble laget butarekstrakter med etanol og vann (1:1). Folin-Ciocalteu metoden ble benyttet i undersøkelse av butarekstraktets totale polyfenolinnhold. HPLC ble benyttet for deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin, og DPPH-metoden ble benyttet for undersøkelse av butarekstraktenes antioksidantkapasitet. For å undersøke butarekstraktets potensielle effekt i en aktiv emballaseløsning ble det utført et lagringsforsøk på 21 dager hvor laksefilet (80 g) ble pakket i modifisert atmosfære og oppbevart i 4 °C med og uten absorbenter tilsatt butarekstrakt. Fremgangsmåten benyttet for vurdering av butareabsorbentens antimikrobielle effekt ble basert på observasjon av mikrobiologisk vekst på fire ulike vekstmedium; Brilliance Listeria for *Listeria innocua*, Long & Hammer for aerobe kimtall, Pseudomonas agar base for *Pseudomonas* og de Man, Rogose og Sharpe agar (MRS) for melkesyrebakterier. For å evaluere effekten på *L. innocua* ble et inokulum inokulert på overside og underside av laksefiletene i forkant av lagringsforsøket. *L. innocua* ble benyttet for å vurdere vekst av det virulente næringsmiddelbårne patogenet *Listeria monocytogenes*, da de har tilnærmet lik gensekvens.

Ingen av blansjeringsmetodene utmerket seg. Resultatene viste ingen signifikante forskjeller på total polyfenolinnhold. Butare blansjert ved 70 °C i 180 sekunder viste signifikant høyere innhold av fucoxanthin, og den ublansjerte butaren viste høyest antioksidantkapasitet, basert på signifikant laveste EC50-verdi. Videre viste lagringsforsøket at butareabsorbenten kun hadde effekt på bakterievekst til melkesyrebakterier. For aerobe kimtall og *L. innocua* ble det ikke observert forskjell i bakterievekst for laksefiletene med butareabsorbent og standard absorbent. Det ble ikke observert vekst av *Pseudomonas*. På grunnlag av dette konkluderes det med at butarekstrakt tilsatt en aktiv emballaseløsning ikke hadde en hemmende effekt på den mikrobielle forringelsen som oppstår under lagring. Videre konkluderes det med at butareabsorbenten ikke hadde effekt på mattryggheten når det gjelder *L. monocytogenes*, da absorbenten ikke viste hemmende effekt på *L. innocua*.

Abstract

In this master thesis bioactive components from winged kelp (*Alaria esculenta*) was evaluated as a potential ingredient in an active packaging solution to increase shelf life and food safety in Atlantic salmon fillet (*Salmo salar* L.). In addition, an optimal blanching method was developed, based on least possible denaturation of the bioactive components; polyphenols and fucoxanthin. The total antioxidant capacity of the winged kelp was also investigated. The winged kelp was blanched at different time and temperature regimes, followed by freeze drying and pulverization. Winged kelp extracts were made with ethanol and water (1:1). The Folin-Ciocalteu method was used to study the total polyphenolic content of the winged kelp extract. HPLC was used for detection and quantification of fucoxanthin and the DPPH method was used to study the antioxidant capacity of the winged kelp extract. To examine the potential effect of winged kelp extract in an active packaging solution, a 21 days storage experiment was conducted in which salmon fillet (80 g) was packed in modified atmosphere at 4 °C with and without absorbents added winged kelp extract. The method used to assess the antimicrobial effect of the winged kelp absorber was based on the observation of microbial growth on four different growth medium; Brilliance Listeria for *Listeria innocua*, Long & Hammer for aerobic plate count, Pseudomonas agar base for *Pseudomonas* and de Man, Rogose and Sharpe agar (MRS) for lactic acid bacteria. To evaluate the effect on *L. innocua*, an inoculum was inoculated on the top and bottom of the salmon fillets prior to the storage experiment. *L. innocua* was used to assess the growth of the virulent foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*, because of the similarities in their gene sequence.

Neither one of the blanching methods excelled. The results showed no significant differences in total polyphenolic content. Winged kelp blanched at 70 °C for 180 seconds showed significantly higher content of fucoxanthin, and the unblanched winged kelp showed the highest antioxidant capacity, based on significantly lower EC50 value. Furthermore, the storage experiment showed that the winged kelp absorber only had an effect on the microbial growth of lactic acid bacteria. For aerobic bacteria and *L. innocua* no difference in bacterial growth was observed for the salmon fillet packed with the winged kelp absorber or standard absorber. No growth of *Pseudomonas* was observed. On this basis, it was concluded that added winged kelp extract into absorbents had no effect on the microbial degradation that occurs during storage. Furthermore, it was concluded that the winged kelp had no effect on the food safety when it comes to *L. monocytogenes*, based on the observation that the absorbents showed no inhibitory effect on *L. innocua*.

Forord

Etter to år på mastergradsutdanningen mat og teknologi ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), avsluttes studiet med denne oppgaven. Det har vært utrolig spennende og givende å få muligheten til å fordype seg i brunalgens mulige potensiale.

Jeg vil først og fremst takke min veileder, Førsteamanuensis Jørgen Lerfall og medveileder, Førsteamanuensis Anita Nordeng Jakobsen for støtte og veiledning gjennom prosessen. For gode faglige innspill, konstruktiv kritikk og motivasjon som har vært nødvendig for å gjennomføre denne masteroppgaven. Videre vil jeg takke Førsteamanuensis Kirill Mukhatov for opplæring i programvaren IBM SPSS. Jeg vil også gi en spesiell takk til medstudent, Emira Ayadi Nilsen for et godt samarbeid gjennom masterprosessen.

Til slutt vil jeg takke mine foreldre og Morten, for tålmodigheten, støtten og motivasjonen til å gjennomføre denne masteroppgaven etter beste evne.

Trondheim, den 22.05.2020



Hanna Østvik

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	1
1.1 Målet med masteroppgaven.....	2
1.2 Avgrensninger	3
1.3 Kunnskapsgrunnlag for litteraturstudiet	4
1.4 Disposisjon	7
2. Teori	8
2.1 Råstoff	8
2.1.1 Makroalger	8
2.1.1.1 Bioaktive komponenter i butare (<i>Alaria esculenta</i>).....	10
2.1.2 Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i> L.)	16
2.1.2.1 Post mortem endringer i kjølelagret fisk	17
2.1.2.2 Patogener	21
2.2 Forbehandlingsteknologi	23
2.2.1 Varmebehandling	23
2.2.2 Frysetørking	24
2.2.3 Emballasjeteknologi.....	24
3. Material og metoder	26
3.1 Optimalisering av blansjeringsmetode	26
3.1.1 Oversikt over forsøksdesign benyttet i evaluering av blansjeringsmetode.....	26
3.1.2 Blansjering av butare	28
3.1.3 Frysetørking av butare	28
3.1.4 Tillaging av butareekstrakt	28
3.1.5 Total polyfenolinnhold.....	29
3.1.6 Deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin	29
3.1.7 Antioksidantkapasitet.....	30
3.2 Butareabsorbentens effekt på bakterievekst	32
3.2.1 Oversikt over forsøksdesign benyttet i vurdering av butareabsorbentens effekt.....	32
3.2.2 Tillaging av butareabsorbenter	34
3.2.3 Inokulering med <i>Listeria innocua</i>	34
3.2.4 Butareabsorbentens effekt på <i>Listeria innocua</i> , aerobe kimtall, <i>Pseudomonas</i> og melkesyrebakterier	35
3.3 Statistiske analyser	36
4. Resultater.....	37
4.1 Optimalisering av blansjeringsmetode	37

4.1.1 Total polyfenolinnhold.....	37
4.1.2 Deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin	38
4.1.3 Antioksidantkapasitet.....	39
4.2 Butareabsorbentens effekt på bakterievekst	41
4.2.1 <i>Listeria innocua</i>	41
4.2.2 Aerobe kimtall	43
4.2.3 <i>Pseudomonas spp.</i>	45
4.2.4 Melkesyrebakterier	46
5. Diskusjon.....	47
5.1 Optimalisering av blansjeringsmetode	47
5.1.1 Total polyfenolinnhold.....	47
5.1.2 Deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin	49
5.1.3 Antioksidantkapasitet.....	50
5.1.4 Valg av blansjeringsmetode	53
5.2 Butareabsorbentens effekt på bakterievekst	53
5.2.1 Tillaging av butareabsorbenter	53
5.2.2 Butareabsorbentens effekt på <i>Listeria innocua</i> , aerobe kimtall, <i>Pseudomonas</i> og melkesyrebakterier	54
5.3 Videre arbeid	59
6. Konklusjon	60
7. Referanseliste	61
8. Vedlegg	76

Figurer

Figur 1. 1	Ekksklusjonsmetode for total polyfenolinnhold, antioksidantkapasitet og innhold av fucoxanthin.	s. 5
Figur 1. 2	Ekksklusjonsmetode for brunalgens antimikrobielle effekt	s. 6
Figur 2. 1	Morfologisk skisse av butare (<i>Alaria esculenta</i>)	s. 10
Figur 2. 2	Utvalg av isolerte florotanniner fra marine brunalger	s. 11
Figur 2. 3	Fucoxanthin sin molekylære struktur	s. 12
Figur 2. 4	ATP metabolismen <i>post mortem</i>	s. 18
Figur 3. 1	Forsøksdesign for evaluering av blansjeringsmetodene	s. 27
Figur 3. 2	Forsøksdesign for evaluering av butareabsorbentens effekt	s. 33
Figur 3. 3	Frysetørket butareabsorbent	s. 34
Figur 4. 1	Total polyfenolinnhold for de ulike blansjeringsmetodene	s. 37
Figur 4. 2	Innhold av fucoxanthin for utvalgte blansjeringsmetoder	s. 38
Figur 4. 3	Antioksidantkapasitet for de ulike blansjeringsmetodene	s. 39
Figur 4. 4	Scatterplott over blansjeringsmetodene med antioksidantkapasitet som funksjon av total polyfenolinnhold	s. 40
Figur 4. 5	Vekstkurve <i>L. innocua</i> for variantene LO, LOK, LU og LUK	s. 41
Figur 4. 6	Vekstkurve <i>L. innocua</i> for variantene LO og LU	s. 42
Figur 4. 7	Vekstkurve aerobe kimtall for variantene LO og LOK	s. 43
Figur 4. 8	Vekstkurve aerobe kimtall for variantene LU og LUK	s. 44
Figur 4. 9	Vekstkurve aerobe kimtall for variantene NMA og NMAK	s. 45
Figur 4. 10	Vekstkurve melkesyrebakterier for variantene LO, LOK, LU, LUK, NMA og NMAK	s. 46

Tabeller

Tabell 2. 1	Brunalger som er påvist å ha inhiberende effekt mot et utvalg av bakterier	s. 9
Tabell 2. 2	Total polyfenolinnhold målt i butare ved ulik innhøstingstid og lokalisasjoner	s. 14
Tabell 2. 3	Antioksidantkapasitet målt i butare ved ulik innhøstingstid og lokalisasjoner	s. 15
Tabell 2. 4	Fucoxanthininnhold målt i butare ved ulik innhøstingstid og lokalisasjoner	s. 15
Tabell 2. 5	Næringsinnhold i 100 g oppdrettslaks, rå spiselig del	s. 16

Vedlegg

Vedlegg 1	Resultater fra eksterne rapporter opparbeidet gjennom litteraturstudiet	s. 76
Vedlegg 2	Beregning av estimert gallussyre ekvivalenter per 100 gram tørrvekt	s. 82
Vedlegg 3	Tillaging av Tris-HCl buffer og DPPH-løsning	s. 83
Vedlegg 4	Resultater fra optimalisering av blansjeringsmetoder	s. 84
Vedlegg 5	Beregnet bakteriekonsentrasjon log (kde/g) fra lagringsforsøket	s. 85
Vedlegg 6	Målt CO ₂ i frivolum gjennom lagringsstudiet.	s. 89

Forkortelser

GAE = gallussyre ekvivalent

LO = Laks inokulert med *Listeria innocua* på overside, med butareabsorbent

LOK = Laks inokulert med *Listeria innocua* på overside, med standard absorbent

LU = Laks inokulert med *Listeria innocua* på underside, med butareabsorbent

LUK = Laks inokulert med *Listeria innocua* på underside, med standard absorbent

MA = Modifisert atmosfære

MAP = Modifisert atmosfære pakking

MIC = Minste hemmende konsentrasjon

MRS = de Man, Rogose, Sharpe agar

NMA = Laks med butareabsorbent

NMAK = Laks med standard absorbent

SE = standardfeil

TPC = Total polyfenolinnhold

1. Introduksjon

Fokus på bærekraftige løsninger i sjømatnæringen og utnyttelse av marine makroalger er stadig økende. Verdens befolkning øker med 80 millioner hvert år, og forventes å nå 9 milliarder innen år 2050. FNs mat- og landbruksorganisasjon har forutsett at det globalt må produseres 70 % mer mat innen 2050 for å møte etterspørselen (Ytrestøyl, Aas og Åsgård, 2015). I tillegg ønsker forbrukerne sunnere og tryggere alternativer, med færre kjemiske tilsetninger og lengre holdbarhetstid (Galatto *et al.*, 2012).

Akvakultur utgjør nesten halvparten av den totale matfiskforsyningen, og andelen øker hvert år (Ytrestøyl, Aas og Åsgård, 2015). Generelt inkluderer dette en rekke høykvalitetsprodukter med betydelig økonomisk gevinst. Sjømat forringes derimot raskt, og kort holdbarhet fører til en begrensning i eksport av fersk fisk (Galatto *et al.*, 2012). Forringelsen skyldes hovedsakelig metabolske aktiviteter til mikroorganismer, autolyse og den kjemiske oksidasjonen av lipider (Gram og Huss, 1996; Ashie *et al.*, 1996). For å møte den fremtidige forventede etterspørselen blir det essensielt å finne bedre og nye metoder som kan påvirke den forringende mekanismen og således forlenge holdbarheten. Samtidig rapporteres det om flere tilfeller av matbårne sykdommer (Gould *et al.*, 2013) og et økende antall tilfeller av bakterieresistens mot konvensjonelle antimikrobielle midler (Koluman og Dikici, 2012). *Listeria monocytogenes* er en av de mest virulente matbårne patogener, og for gravide og personer med nedsatt immunforsvar kan bakterien gi alvorlige konsekvenser (Lee *et al.*, 2014).

Makroalger og brunalger er ansett som en kilde til bioaktive komponenter (Dhargalkar og Pereira, 2005). Bioaktive komponenter er komponenter som påvirker fysiologiske og/eller cellulære aktiviteter (Wang *et al.*, 2016). Blant annet inneholder brunalger florotanniner; polyfenolske forbindelser som viser antimikrobiell aktivitet ovenfor flere spesifikke kvalitetsforringelsesorganismer og patogener (Nagayama *et al.*, 2002; Singh og Sidana, 2013). Florotanniner har også vist sterke antioksidative egenskaper mot skade forårsaket av frie radikaler (Yan, Nagata og Fan, 1998; Li *et al.*, 2011). I tillegg inneholder brunalger pigmentet fucoxanthin som er et karotenoid med antioksidative egenskaper (Foot og Denny, 1968; Sachindra *et al.*, 2007). Butare er en brunalge som holder til i de nordlige deler av Atlanteren (Greville, 1830), og er rapportert å inneholde høyere konsentrasjoner av polyfenoler og fucoxanthin sammenlignet med andre brunalger (Schiener *et al.*, 2015; Stévant *et al.*, 2017; Roleda *et al.*, 2019).

På bakgrunn av butarens innhold av bioaktive komponenter vil det derfor være interessant å studere eventuelle antimikrobielle og antioksidative egenskaper.

1.1 Målet med masteroppgaven

Hovedmålet med denne masteroppgaven blir å se om butarekstrakt tilsatt i en aktiv emballasjeløsning kan øke mattrykgheten og forlenge holdbarheten til modifisert atmosfærepakket laksefilet. Dette med fokus på butarekstraktets inhiberende effekt på bakterievekst av *Listeria innocua*, aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier.

Delmål én: En optimalisering av blansjeringsmetoder skal utføres ved å teste ulike tid og temperatur regimer. Regimene skal evalueres basert på minst mulig denaturering av polyfenoler og fucoxanthin samt butarens antioksidantkapasitet.

Delmål to Den antimikrobielle effekten av butareabsorbenten skal evalueres. Effekten skal vurderes med fokus på endring av mikrobiell vekst gjennom en lagringsstudie av aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier, med hensikt å evaluere om butare tilsatt en aktiv emballasjeløsning kan benyttes til å hemme vekst av mikrobiell forringelse som inntreffer under lagring. I tillegg skal butareabsorbenten evalueres med hensyn på hemming av *L. innocua* på inokulert modifisert atmosfærepakket laksefilet. Dette for å evaluere om butare tilsatt en aktiv emballasjeløsning kan bidra i å hemme vekst av den genetisk liknende patogene bakterien *Listeria monocytogenes*.

1.2 Avgrensninger

På bakgrunn av dagens situasjon grunnet covid-19 utbruddet er det blitt satt noen avgrensninger rundt oppgavens innhold. I utgangspunktet skulle masteroppgaven basere seg på resultater opparbeidet gjennom perioden, men situasjonen har begrenset dette. Det har dermed blitt besluttet å beholde de allerede eksisterende resultatene, og videre utføre en utvidet gjennomgang av relevant litteratur. I utgangspunktet var det planlagt å evaluere hovedmålet i masteroppgaven ved å se om butareekstrakt tilsatt i en aktiv emballaseløsning kunne forlenge holdbarheten til MA-pakket laksefilet. Med forlenging av holdbarheten menes det å vurdere både absorbentens effekt på det mikrobiologiske (bakterievekst og biogene aminer), det biokjemiske (lipidoksidasjon og ATP-nedbrytning) og det fysiske (farge). Dette blir hovedsakelig begrenset til å kun fokusere på det mikrobiologiske aspektet av holdbarheten, med effekt på bakterievekst som eneste grunnlag. Delmål én i oppgaven forblir uendret, men delmål to mister en god del analyser da det var planlagt å analysere butareabsorbentens effekt på lipidoksidasjon, ATP-nedbrytning, biogene aminer og fargeendring på laksefiletene. Grunnlaget for konklusjoner ble dermed svekket grunnet færre undersøkte parametere. I tillegg var det i utgangspunktet tre delmål, hvorav det siste skulle inkludere en sensorisk analyse som avslutning på masteroppgaven. Delmål tre ble erstattet med en utvidet litteraturstudie. Oppgaven blir dermed todelt; laboratoriebasert i kombinasjon med en utvidet teoretisk del.

1.3 Kunnskapsgrunnlag for litteraturstudiet

På bakgrunn av den utvidete teoretiske delen, ble det besluttet å utføre en gjennomgang av relevant litteratur, som hovedsakelig omhandler butarens total polyfenol- og fucoxanthininnhold, samt dens antioksidantkapasitet. Det ble også ansett som relevant for oppgaven å undersøke brunalgens antimikrobielle effekt mot utvalgte bakteriearter. Fremgangsmåten for innhenting av denne informasjonen blir videre presentert i dette delkapittelet. Resultatene fra gjennomgangen presenteres i del 2 – teori.

Total polyfenolinnhold

For innhenting av informasjon angående total polyfenolinnhold i butare ble det søkt i databasen Google Scholar med søkeordene *Alaria esculenta*, total polyphenolic content, TPC, Folin ciocalteu og GAE i ulike kombinasjoner. Søket ble avsluttet 14.04.2020. Basert på lite resultater ble det ikke satt avgrensning med tanke på artikler publisert etter dato. Artiklenes relevans ble i første omgang vurdert på bakgrunn av tittel og deretter sammendrag. Relevante artikler ble videre lest i fulltekst (figur 1. 1). For å bli inkludert i oppgaven, måtte artiklene oppfylle følgende kriterier:

- Analyse total polyfenoler i butare (*Alaria esculenta*)
- Bruk av Folin-Ciocalteu metoden
- Bruk av gallussyre til standardløsning

Antioksidantkapasitet

For innhenting av informasjon angående antioksidantkapasitet ble det søkt i databasen Google Scholar med søkeordene *Alaria esculenta*, antioxidant capacity, DPPH, EC50 i ulike kombinasjoner. Søket ble avsluttet 14.04.2020 og følger lik eksklusjonsmetode som for total polyfenolinnhold. For å bli inkludert i oppgaven måtte artiklene oppfylle følgende kriterier:

- Analyse av antioksidantkapasitet på butare (*Alaria esculenta*)
- Bruk av metoden DPPH

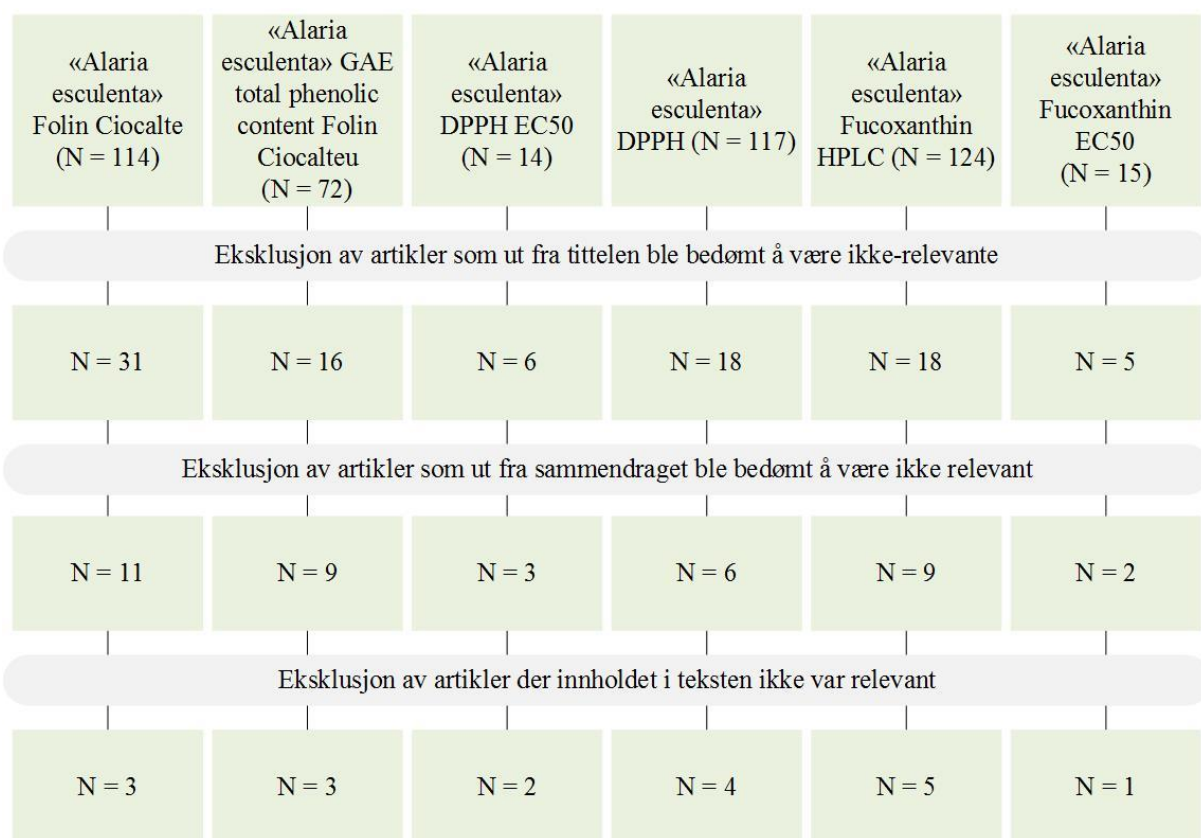
Innhold av fucoxanthin

For innhenting av informasjon angående fucoxanthininnhold ble det også søkt i databasen Google Scholar med følgende søkeord: *Alaria esculenta*, fucoxanthin, HPLC i ulike kombinasjoner. Søket ble avsluttet 14.04.2020 og følger lik eksklusjonsmetode som for total

polyfenolinnhold og antioksidantkapasitet (figur 1. 1). For å bli inkludert i oppgaven måtte artiklene oppfylle følgende kriterier:

- Kvantifisering av fucoxanthin i butare (*Alaria esculenta*)
- Bruk av HPLC som analysemetode

Benyttet eksklusjonsmetode baserte seg i første omgang på å utelukke artikler som ut fra tittelen ble vurdert å være ikke-relevante. For artiklene med relevante titler ble sammendraget lest og vurdert for eksklusjon eller ikke. Videre ble hele artikkelen lest, hvorav ikke-relevante artikler ble ekskludert. Figur 1. 1 viser et flytdiagram for seks eksempler på søkeord som ble benyttet i anvendelse av eksklusjonsmetoden



Figur 1. 1 Eksklusjonsmetode for total polyfenolinnhold, antioksidantkapasitet og innhold av fucoxanthin. Flytdiagram som viser hvor mange artikler som ble funnet ved søk i Google Scholar og hvor mange som ble ekskludert – først basert på tittel, deretter basert på sammendraget og til sist på hele artikkelen

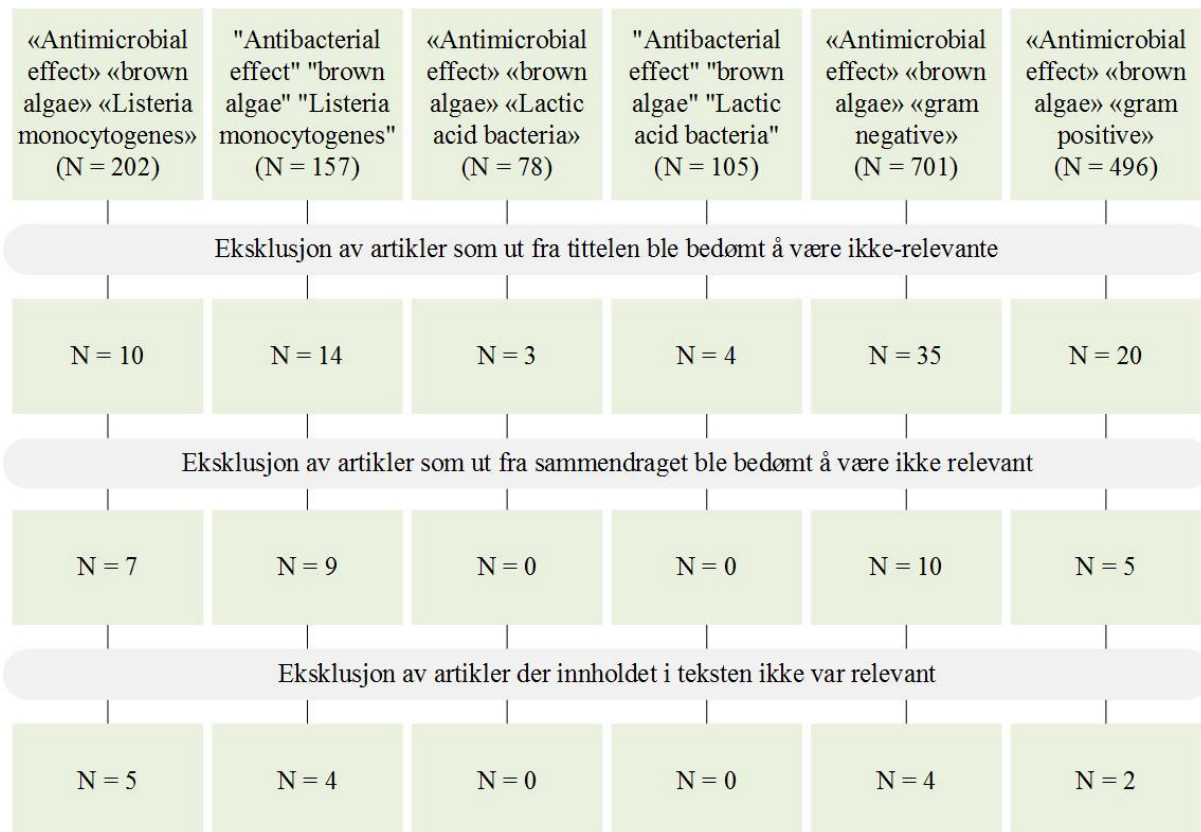
Brunalgens antimikrobielle effekt

På bakgrunn av mangelfull litteratur angående butarens inhiberende effekt ble denne delen av litteraturstudiet utvidet til å omfatte brunalgens inhiberende effekt. For innhenting av informasjon angående den inhiberende effekten ble det søkt i databasen Google Scholar med søkeordene antimicrobial effect, antibacterial effect, brown algae, *Listeria monocytogenes*,

lactic acid bacteria, gram negative og gram positive i ulike kombinasjoner (figur 1. 2). Søket ble avsluttet 03.05.2020. For å bli inkludert i oppgaven måtte artiklene oppfylle følgende kriterier:

- Antimikrobiell og/eller inhiberende effekt ved bruk av brunalge
- Effekten skal være oppgitt, enten som minst hemmende konsentrasjon (MIC), hemmingssone, prosent inhibering og lignende.
- Effekt mot bakterier som ble ansett som relevante for oppgaven. Denne innebærer blant annet *Listeria monocytogenes*, *Shewanella* spp., *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Photobacterium phosphoreum* og melkesyrebakterier.

Eksklusjonsmetoden (figur 1. 2) som ble benyttet er lik som for total polyfenolinnhold, antioksidantkapasitet og fucoxanthin.



Figur 1. 2 Eksklusjonsmetode for brunalgens antimikrobielle effekt. Flytdiagram som viser hvor mange artikler som ble funnet ved søk i Google Scholar og hvor mange som ble ekskludert – først basert på tittel, deretter basert på sammendraget og til sist på hele artikkelen

1.4 Disposisjon

Denne masteroppgaven er organisert i seks deler, med unntak av vedlegg.

Del 2 – Teori. Delen dekker de teoretiske forutsetninger angående råstoffet og teknologier som benyttes. Dette skal gi leseren evnen til å forstå oppgaven, og arbeidet som presenteres i de følgende delene. For å relatere dette arbeidet i en bredere sammenheng, presenteres også eksterne resultater og relevant litteratur innledende.

Del 3 – Materiale og metoder. Presenterer fremgangsmåten for metodene benyttet til evaluering av optimalisering av blansjeringsmetodene samt butareabsorbentens antimikrobielle effekt.

Del 4 – Resultater. Delen presenterer resultater fra optimalisering av blansjeringsmetodene, med butarens totale polyfenolinnhold, fucoxanthininnhold og antioksidantkapasitet. Videre presenteres resultatene fra lagringsstudie som omhandler butareabsorbentens effekt på *L. innocua*, aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier.

Del 5 – Diskusjon. I denne delen diskuteres resultatene fra forsøkene, i tillegg til å verifisere eksperimentene. Resultatene fra litteraturstudiet diskuteres opp mot resultater som er opparbeidet av studenten. Delen tar også for seg forslag til videre arbeid.

Del 6 – Konklusjon. Konkluderer oppgaven med avsluttende bemerkninger.

2. Teori

2.1 Råstoff

2.1.1 Makroalger

Alger er en heterogen gruppe planter som videre kan deles inn i to hovedgrupper; mikroalger og makroalger. Sistnevnte deles videre inn i brunalger (*Phaeophyta*), grønnalger (*Chlorophyta*) og rødalger (*Rhodophyta*) (Feroz, 2018). Marine alger er kjent for å være en god kilde til sunn mat på grunn av deres lave innhold av lipider (1-6 g/100 g tørrvekt), høy konsentrasjon av polysakkarider, vitaminer (A, B₁, B₁₂, C, D og E riboflavin og niacin), mineraler (Ca, P, Na og K) (Dhargalkar og Pereira, 2005) og flerumettede fettsyrer (Pereira *et al.*, 2012). Makroalger er også ansett som en kilde til bioaktive komponenter og er i stand til å produsere et stort antall ulike sekundære metabolitter karakterisert av et bredt spekter med biologiske egenskaper (Gupta og Abu-Ghannam, 2011).

Makroalger er ofte eksponert for en kombinasjon av sterkt lys og høye oksygenkonsentrasjoner. Dette kan føre til dannelsen av frie radikaler og andre sterke oksiderende agenter. Antioksidantaktiviteten i algene fungerer derfor som en kjemisk beskyttelsesmekanisme da de genererer de nødvendige komponentene for å beskytte seg mot eksterne faktorer slik som forurensning, stress og UV-bestråling (Gupta og Abu-Ghannam, 2011; Fung, Hamid og Lu, 2013). Samtidig er det flere arter som produserer eller inneholder polysakkarider, glykoproteiner og andre sekundære metabolitter med antimikrobiell og antiviral aktivitet. Brunalger viser høyest fytokjemisk innhold. I tillegg til å være rik på polysakkarider, og andre viktige metabolitter inneholder de også fenolske komponenter, terpenoide og karotenoider (Gupta og Abu-Ghannam, 2011).

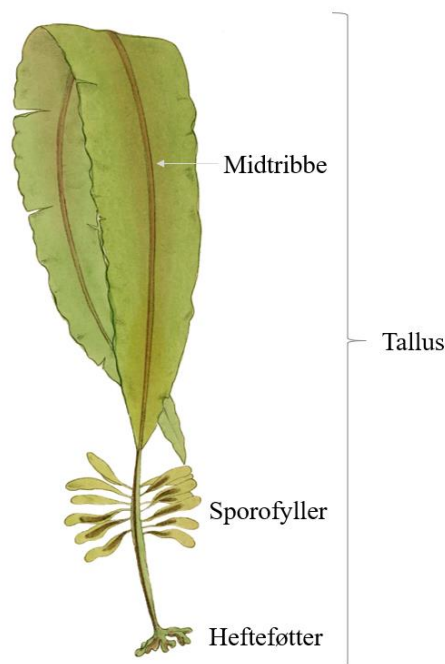
I Norge finnes det rundt 160 ulike arter av brunalger (Aagard, 2011). Den brune fargen kommer av fucoxanthininnholdet. Celleveggen er hovedsakelig laget av cellulose og alginsyre, og karbohydratreservene består av laminarin og mannitol. Algen benyttes hovedsakelig industrielt på grunn av deres hydrocolloide innhold av alginat, laminarin og fucoidan. (Gamal, 2010). I senere tid er det også blitt et større fokus på bruk av de antimikrobielle aktivitetene som brunalgen innehar for å inhibere patogen vekst og forhindre matforringelse (Hayes *et al.*, 2010). Manivannan *et al.* (2011) har rapportert brunalger til å være aktive mot flere gram-positive og gram-negative bakterier. Tabell 2. 1 viser en oversikt over brunalger som har vist inhiberende effekt på patogener samt gram negative og – positive bakterier. Med inhiberende effekt menes

i dette tilfellet en observert inhiberende aktivitet på bakterier som er blitt tallfestet i form av prosent inhibisjon, hemmingssone eller minste hemmende konsentrasjon (MIC).

Tabell 2. 1 Oversikt over ulike arter brunalger som er påvist å ha inhiberende effekt mot ulike typer bakterier. Tabellen er en forenklet versjon av tabell VI. 1, vedlegg 1

Brunalge	Bakterie	Referanse
<i>Myagropsis myagroides</i>		(Lee <i>et al.</i> , 2014)
<i>Laminaria digitata</i>		(Gupta, Rajauria og Abu-Ghannam, 2010; Cox, Abu-Ghannam og Gupta, 2010)
<i>Himanthalia elongata</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	(Gupta, Rajauria og Abu-Ghannam, 2010; Cox, Abu-Ghannam og Gupta, 2010; Gupta <i>et al.</i> , 2010)
<i>Laminaria Saccharina</i>		(Gupta, Rajauria og Abu-Ghannam, 2010; Cox, Abu-Ghannam og Gupta, 2010)
<i>Ecklonia cava</i>		(Nshimiyumukiza <i>et al.</i> , 2015)
<i>Alaria esculenta</i>	<i>Listeria innocua</i>	(Kopperud, 2018; Lerfall <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Liu, 2020)
<i>Padina gymnospora</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Salem, Galal og Nasr El-deen, 2011)
<i>Hizikia Fusiformis</i>		(Manivannan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Padina gymnospora</i>	<i>Shewanella spp.</i>	(Wu <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ascophyllum nodosum</i>		(Manivannan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Alaria esculenta</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	(Liu, 2020)
<i>Padina gymnospora</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(Lerfall <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	(Manivannan <i>et al.</i> , 2011)
		(Boisvert <i>et al.</i> , 2015)

Butare (*Alaria esculenta*) er medlem av familien *Alariceae* og tilhører laminariales-ordenen (Fredersdorf *et al.*, 2009) og er en type brunalge. Algen er rik på natrium og kalium, som gjør at den er blitt ansett som en god salterstatter i matindustrien (Stévant *et al.*, 2017). Butaren holder til i de nordlige delene av Atlanterhavet og vokser ikke ved temperaturer over 16 °C. Den kan bli opptil 4 meter lang og 25 cm bred, men er vanligvis rundt 1-2 meter lang og 5-10 cm bred (Greville, 1830). Morfologisk karakteriseres butaren ved lange blad med en stripe langs midtribben (Figur 2. 1)(Oma, 2018). Taren har en relativt kort stilk og benytter sine hefteføtter til å feste seg til overflater. På stilken er det festet sporofyller, små brune blad som inneholder sporer som brukes til formering (Greville, 1830).



Figur 2. 1 Morfologisk skisse av butare (*Alaria esculenta*). Figuren er modifisert fra (Landsborough, 1851)

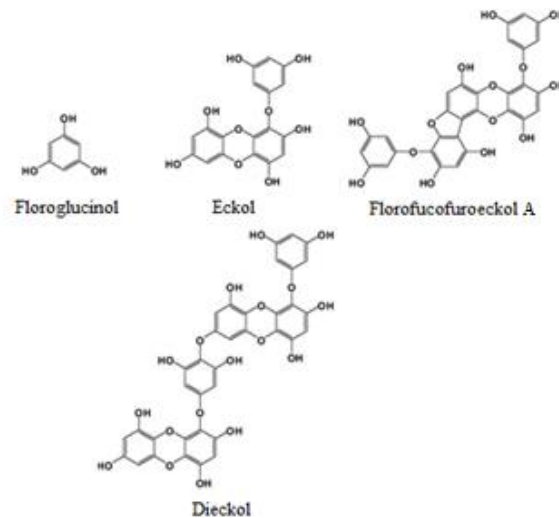
2.1.1.1 Bioaktive komponenter i butare (*Alaria esculenta*)

Butare inneholder et stort spekter av molekyler som opererer som frie radikal-fjernere. Dette inkluderer vitamin C og E, fucoxanthin, fucoidan, mycosporinlignende aminosyrer og florotanniner (Rocha de Souza *et al.*, 2007; Halliwell og Gutteridge, 2015; Oren og Gunde-Cimerman, 2007; Banaszak *et al.*, 1998). Florotanniner viser også antimikrobiell effekt. I butare er florotanniner og fucoxanthin de bioaktive komponentene som viser størst potensiale til brukt som ingrediens i antioksidative og antimikrobielle løsninger.

Polyfenoler

Florotanniner er polyfenolske komponenter og er den eneste gruppen tanniner til stede i brunalger (Singh og Sidana, 2013; Fung, Hamid og Lu, 2013; Ragan og Craigie, 1976). De består av polymerer av floroglucinol (1,3,5-tryhydroxybenzen) enheter og dannes i acetat-malonat veien (Li *et al.*, 2011). Florotanninene er lokalisert i fysoder, som er membranbundne cytoplasmiske vesikler (Ragan og Craigie, 1976; Li *et al.*, 2009). De er svært hydrofile komponenter med et bredt spekter av molekylstørrelser (126-650 kDa) (Wijesekara og Kim, 2010; Siahaan, Cepas og Soto, 2018). Florotanniner deles inn i fire undergrupper basert på binding; eterbinding (floroetoler), fenyl-binding (fucoler), eter- og fenylbinding (fucofloretol) og dibenzo [1,4] dioksinbinding (eckoler) (Singh og Sidana, 2013; Li *et al.*, 2017). Figur 2. 2 viser et utvalg av isolerte og karakteriserte florotanninene fra marine brunalger; floroglucinol,

eckol (2), florofucofuroeckol A (4) og dieckol (6) (Li *et al.*, 2011). Eckol, som hovedsakelig er av lav molekylstørrelse har så langt kun blitt funnet i familien *Alarieae* og *Lessoniacea* (Siahaan, Cepas og Soto, 2018; Singh og Sidana, 2013). Per dags dato er det ikke karakterisert hvilke florotanniner som er til stede i butare.



Figur 2. 2 Molekylstruktur til et utvalg av isolerte florotanniner fra marine brunalger; floroglucinol, eckol, florofucofuroeckol A og dieckol (Li *et al.*, 2011)

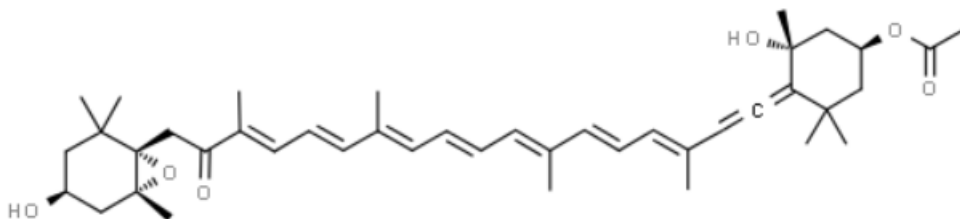
Polyfenoler er generelt flyktige (Shim, 2012) og varmesensitive (Gonçalves *et al.*, 2010). I tillegg er florotanniner svært ustabile og reaktive komponenter og gjennomgår flere enzymatiske og kjemiske reaksjoner som under lagring og prosessering fører til skade på plantecellene (Kirke *et al.*, 2017; Cheynier, 2005). Samtidig viser florotanniner dårlig holdbarhet som følge av intra og/eller intermolekylære omleiringsreaksjoner som resultat av temperaturøkning eller oksidasjon av hydroksylgruppene på polyfenolringene (Kirke *et al.*, 2017). Konsentrasjonen av florotanniner kan variere innad en individuell algeplante eller mellom ulike planter i en algepopulasjon. Variasjonene skyldes både ytre og indre faktorer; genetiske ulikheter, miljø og økologisk stimuli. De intrinsiske faktorer inkluderer størrelse, alder og reproduksjonsstadiet (Ragan og Jensen, 1978; Holdt og Kraan, 2011; Singh og Sidana, 2013). De ekstrinsiske faktorene omfatter hovedsakelig salinitet, tilgang på næringsstoff, lys og UV-stråling (Singh og Sidana, 2013). Døgn- og sesongvariasjoner har også vist å påvirke innholdet av florotanniner hos brunalger av samme populasjon og disse variasjonene blir viktig når en skal bestemme hvilken innhøstingstid som er mest gunstig. I kaldtvannsområder vil det fenolske innholdet typisk være høyere om sommeren og tidlig høst og lavere om vinteren (Connan, Stiger og Deslandes, 2004; Parys *et al.*, 2009; Roleda *et al.*, 2019). Sesongvariasjonen kan også sees i sammenheng med eksponering av UV-stråling og sollys da økt konsentrasjon

av florotanniner er blitt observert å øke som respons (Roleda, Wiencke og Lüder, 2006; Pavia og Toth, 2000). Derfor vil algeprøver høstet fra grunne områder vise høyere nivåer sammenlignet med prøver høstet fra dype områder (Fairhead *et al.*, 2006; Steinhoff *et al.*, 2012).

Karotenoider

Karotenoider er en familie av pigmenterte forbindelser som syntetiseres av planter, alger, sopp og mikroorganismer, og er ansvarlig for farge på ulike fotosyntetiske organismer (Wu og Lin, 2019). Karotenoider deles inn i to klasser basert på deres oppbygging; karotenoider som inneholder kun karbon og hydrogenatomer, og oxokarotenoider (xantofyller) som bærer minst et oksygenatom (Stahl og Sies, 2003). I det marine miljøet er karotenoider utbredt hos makroalger. De fleste av karotenoidene har funksjoner i fotosyntesen og er intermediater (mellomprodukter) av karsinogenesisen (Takaichi, 2011). Generelt er karotenoider relativt pH-stabile og er fettløselig. De er sensitive til oksidasjon, isomerisering og polymerisering når de løses opp i fortynningsløsning under lys med tilgang på oksygen (Prasanna *et al.*, 2007).

Fucoxanthin er en av de viktigste karotenoidene i brunalger, og blir funnet hovedsakelig i brunalger og i noen andre makroalger (Kumar, Hosokawa og Miyashita, 2013; Takaichi, 2011; Peng *et al.*, 2011). Fucoxanthin har en unik molekylær struktur med karakteristiske alleniske bindinger (C=C=C) og konjugerte karbonylgrupper langs polyenryggraden (figur 2. 3) (Peng *et al.*, 2011; Pangestuti og Siahaan, 2018). Denne alleniske bindingen som for det meste finnes i karotenoider er ansvarlig for deres høye antioksidantpotensial (Sachindra *et al.*, 2007). Fucoxanthin er en xantofyll og deler noen kjemiske egenskaper med karotenoider, slik som lipofilisitet og antioksidantaktivitet (Abu-Ghannam og Shannon, 2018). Som andre karotenoider reduseres fucoxanthin under lagring som et resultat av eksponering for varme, lys, oksygen, umettede lipider og andre prooksidanter (Zhang *et al.*, 2015)



Figur 2. 3 Fucoxanthin sin molekylære struktur (formel $C_{42}H_{58}O_6$) (ChemSpider, u.å)

Fucoxanthin oppbevares i kloroplastene i membranbundne rom som kalles tylakoider (Miyashita *et al.*, 2011). I tylakoidene bindes fucoxanthin til klorofyll a, c og apoprotein, og danner et kompleks som absorberer lys i det blå-grønne området på spekteret og overfører

energien tilbake til algen (Kita *et al.*, 2015). Fucoxanthin forekommer mer signifikant i bladet til tallusen, da dette området opplever en større lyseksponering sammenlignet med stilken og hefteføttene (figur 2. 1) (Abu-Ghannam og Shannon, 2018).

Fucoxanthininnholdet varierer stort mellom makro- og mikroalger. Sesong og geografisk variasjoner påvirker også innholdet. Brunalger høstet vanligvis fra september til mars, som er den modne fasen til sporofyttene og inneholder ofte høyere konsentrasjoner av fucoxanthin (Fung, Hamid og Lu, 2013; Terasaki *et al.*, 2009). Om vinteren oppreguleres xantofyllsyklusveien som en respons på den reduserte eksponeringen av sollys og innholdet av fucoxanthin øker (Mikami og Hosokawa, 2013; Campbell, Bité og Burridge, 1999; Goss og Jakob, 2010).

Antimikrobielle komponenter i butare

Hovedsakelig er det fenol- og polysakkaridkomponenter i taren som er ansvarlig for tarens antimikrobielle aktivitet. De fenolske aromatiske ringene og OH-gruppene til floroglucinolenhetene binder seg til -NH-gruppene til bakterieproteinene ved hydrogenbinding og hydrofobe interaksjoner (Wei *et al.*, 2016). Det er antatt at den mikrobielle virkningen av polyfenoler endrer cellepermeabiliteten til mikroorganismene, som fører til tap av makromolekyler fra innsiden av cellen. Den forstyrrende membranfunksjonen fører også til lysering av cellene og potensiell celledød (Shannon og Abu-Ghannam, 2016). Floroglucinol (1), eckol (2), florofucofuroeckol A (4) og dieckol (6) (figur 2. 2) har blitt undersøkt for antimikrobiell aktivitet mot flere patogene gram positive stammer samt gram negative bakterier. Med unntak av floroglucinol viste de andre komponentene bakteriedrepende aktivitet mot både gram positive og gram negative organismer (Singh og Sidana, 2013).

Tabell 2. 2 viser en oversikt over total polyfenolinnhold målt i butare med tilhørende innhøstingstid. Polyfenolinnholdet uttrykkes som gram floroglucinol ekvivalent (PGE) per 100 gram tørrstoff, gram gallussyre ekvivalent (GAE) per 100 gram tørrstoff eller prosent polyfenoler i tørrvekt.

Tabell 2. 2 Rapportert innhold total polyfenolinnhold hos butare med tilhørende informasjon angående innhøsting (lokalisasjon, sesong og år). Tabellen er en forenklet versjon av tabell V1. 2, vedlegg 1

Total polyfenolinnhold	Høstet	Referanse
3,07 ± 0,26 g GAE/ 100g tørrvekt	Bodø, Trondheim, Frankrike Vår 2015-2016	(Roleda <i>et al.</i> , 2019)
4,96 ± 0,50 g GAE/ 100g tørrvekt	Bodø, Trondheim, Frankrike Høst 2015-2016	
4,28 ± 0,48 g GAE/ 100g tørrvekt	Bodø, Trondheim, Frankrike Sommer 2015-2016	
1,77 g GAE/ 100g tørrvekt	Canada, april 2010	(Tibbetts, Milley og Lall, 2016)
0.31 ± 0.01 % polyfenoler tørrvekt	Skottland, mars 2011	(Schiener <i>et al.</i> , 2015)
1.49 ± 0.04 % polyfenoler tørrvekt	Skottland, mai 2011	
0.81 ± 0.02 % polyfenoler tørrvekt	Skottland, juli 2011	

Antioksidativ effekt

Polyfenoler betegnes også som sekundære antioksidanter, og fungerer effektivt mot lipidoksidasjon (Manchini-Filho, Vidal-Novoa og Silva, 2013; Kang *et al.*, 2004). De fleste av florotanninene som er redegjort fra marine brunalger er ansvarlig for antioksidativ aktivitet og viser en beskyttende effekt mot H₂O₂ induisert skade, ved å opptre som frie radikal-fjernere (Fung, Hamid og Lu, 2013; Ahn *et al.*, 2007). Antioksidantegenskapene har også blitt rapportert for individuelle florotannin komponenter, inkludert eckol, dieckol, florofucofuroeckol A og 8-8'-bieckol (Shibata *et al.*, 2008). Aktiviteten til disse florotannin komponentene på 2,2-difenyl-picrylhydrazyl (DPPH) ble funnet å være 2-10 ganger så høy sammenlignet med for eksempel askorbinsyre (Wang *et al.*, 2012).

Karotenoidpigmenter har antioksidantegenskaper som er basert på deres oksygen-quenching-egenskaper og deres evne til å fange frie radikaler (Krinsky, 2006; Krasnovsky, 1983). Fucoxanthin og astaxanthin er to viktige marine karotenoider som er kjent for å ha gode antioksidative egenskaper (Riccioni *et al.*, 2011; Gammone, Riccioni og D'Orazio, 2015). Blant de forskjellige beskyttelsesstrategiene er karotenoider mest involvert i fjerningen av singlet molekylær oksygen (¹O₂) og peroxyradikaler men de er også effektive i å deaktivere dannelsen av radikaler og singlet oksygen (Sies og Stahl, 1995). Interaksjonen mellom karotenoider og singlet oksygen avhenger i stor grad av fysisk quenching som innebærer direkte energioverføring mellom begge molekylene. Energien til singlet molekylær oksygen overføres til karotenoidmolekylet, som videre overfører energien til omgivelsene. Siden karotenoider

forblir intakte under fysisk quenching av singlet oksygen, kan de brukes flere ganger (Stahl og Sies, 2003; Foot og Denny, 1968; Krasnovsky, 1983). Blant de forskjellige radikaler som dannes under oksidative forhold i organismen, reagerer karotenoider mest effektivt mot peroksyldikaler. Disse radikalene forårsaker skade i lipofile rom, slik at eliminering av disse radikalene avbryter reaksjonssekvensen. På grunn av deres lipofilisitet og spesifikke egenskaper for å fange peroxyldikaler, antas derfor karotenoider å spille en viktig rolle i beskyttelsen av cellemembraner og lipoproteiner mot oksidativ skade (Stahl og Sies, 2003; Sies og Stahl, 1995). Det er flere komponenter med antioksidative egenskaper som er blitt isolert fra butare, men polysakkarider, florotanniner og terpenoider viser størst potensiale (Balboa *et al.*, 2013). Tabell 2. 3 viser en oversikt over total antioksidantkapasitet for butare med tilhørende innhøstingstid. Kapasiteten benevnes som EC50 mg/mL og EC50 g antioksidant (AH)/ g DPPH.

Tabell 2. 3 Rapportert antioksidantkapasitet hos butare med tilhørende informasjon angående innhøsting (lokalisasjon, sesong og år). Tabellen er en forenklet versjon av tabell VI. 3, vedlegg 1

Antioksidantkapasitet	Høstet	Referanse
0,11 EC50 mg/mL	Island, mai 2007	(Wang, Jónsdóttir og Ólafsdóttir, 2009)
6,43 EC50 mg/mL	Frankrike, mai 2007	(Zubia <i>et al.</i> , 2009)
1,09 ± 0,4 EC50 mg/mL	Maine, USA	(Nayyar, 2016)
2,1 ± 0,4 EC50 mg/mL	April 2016	
3,0 ± 0,6 EC50 mg/mL		
4,67 ± 0,06 EC50 g AH/g DPPH	Trondheim, mai 2017	(Kopperud, 2018)
7,41 ± 0,21 g AH/g DPPH	Trondheim, mai 2017	(Skadal, 2018)

Fucoxanthin hører til terpenoider og basert på dens struktur har den svært gode biologiske egenskaper som beskytter mot skade på algeceller forårsaket av reaktive oksygen som oppstår på grunn av den konstante eksponeringen av lys og høye oksygennivåer i havet (Abu-Ghannam og Shannon, 2018). Tabell 2. 4 viser fucoxanthininnhold målt hos butare, med tilhørende innhøstingstid.

Tabell 2. 4 Rapportert fucoxanthininnhold i butare med tilhørende informasjon angående innhøsting (lokalisasjon, sesong og år). Tabellen er en forenklet versjon av tabell VI. 4, vedlegg 1

Fucoxanthininnhold	Høstet	Referanse
0,870 ± 0,030 mg/g	Irland, juli 2015	(Shannon og Abu-Ghannam, 2017)
0,871 ± 0,053 mg/g tørrvekt	Frankrike, mai 2016	(Stévant <i>et al.</i> , 2017)
0,822 mg/g	Irland, juli 2015	(Shannon og Abu-Ghannam, 2018)
0,48 ± 0,03 mg/g tørrvekt	Irland, mai 2013	(Schmid og Stengel, 2014)
22,97 ± 0,35 mg/g tørrvekt	Trondheim, mai 2017	(Kopperud, 2018)

2.1.2 Atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Atlantisk laks forekommer naturlig langs både øst- og vestkysten av Atlanterhavet, hvor den lever som både anadrom og ikke-anadrom (Klemetsen *et al.*, 2013). Ifølge fiskeridirektoratets «Statistikk for akvakultur» ble det i 2018 slaktet 1,3 millioner tonn oppdrettslaks i Norge (Fiskeridirektoratet, 2018), hvorav 1,1 millioner tonn ble eksportert hovedsakelig til EU og Asia (Norges sjømatråd, 2019).

Laks har et høyt proteininnhold og et lavt mettet fettinnhold (tabell 2. 5) (Matportalen, 2019), og regnes som en svært verdifull matressurs (Mei, Ma og Xie, 2019). Fisk er den primære kostholdskilden til omega-3 flerumettede fettsyrer (PUFA), inkludert dokosaheksaensyre (DHA) og eikosapentaensyre (EPA). Fettsyrene er viktig for blant annet riktig fosterutvikling, og påvirker hjerte- og karfunksjoner som betennelse, perifer arteriesykdom og antikoagulasjon (Swanson, Block og Mousa, 2012). Verdens helseorganisasjon (WHO) anbefaler et regelmessig fiskeforbruk på 1-2 porsjoner per uke som tilsvarer omtrent 200-500 mg omega-3 PUFA (WHO, u.å).

Tabell 2. 5 Oversikt over næringsinnhold i 100g oppdrettslaks, rå spiselig del (Matportalen, 2019)

Næringsstoffer	Mengde
Protein	20 g
Fett	16 g
Mettede fettsyrer	3 g
Cis-enumettede fettsyrer	5,9 g
Cis-flerumettede fettsyrer	5 g
EPA	1 g
DHA	1,36 g
Omega-3-fettsyrer	3,6 g
Omega-6-fettsyrer	1,2 g
Kolesterol	0,08 g
Vitaminer:	
Vitamin A	26 RAE
Vitamin D	10 µg
Riboflavin	110 µg
Vitamin B12	3,5 µg
Mineraler:	
Jern	300 µg
Selen	30 µg
Jod	5,5 µg

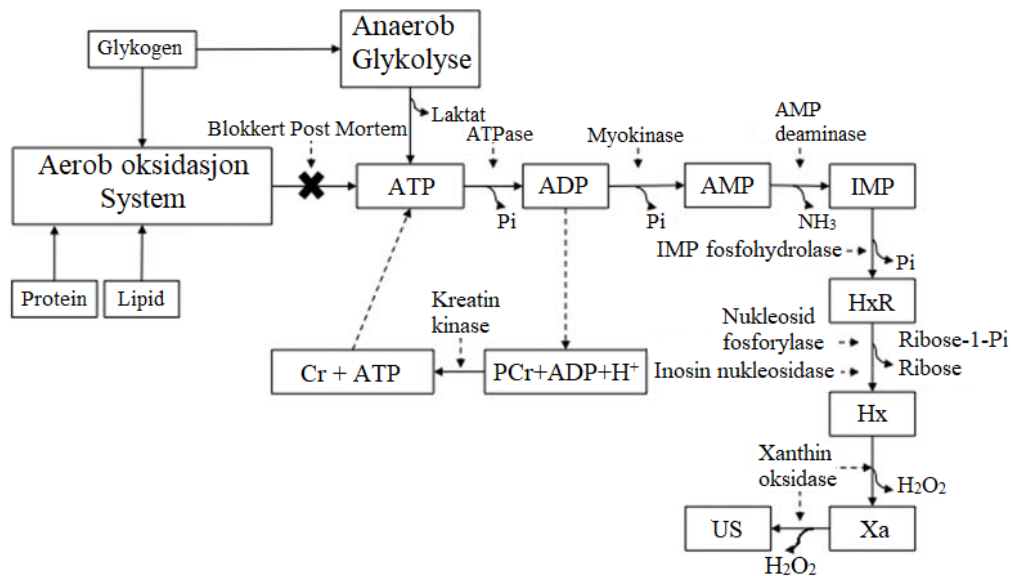
2.1.2.1 Post mortem endringer i kjølelagret fisk

Fisk er lettbederverlig og blir raskt dårlig etter fangst. Ferringelse av fisk skyldes forandringer forårsaket av reaksjoner fra fiskens egne enzymer (autolyse), lipidoksidasjon og metabolske aktiviteter fra mikroorganismer (Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002; Ashie *et al.*, 1996), som videre gir endring i fiskelukt, smak og tekstur (Mei, Ma og Xie, 2019). Mikrobiologisk akseptabel grense for forbrukeraksept er 6 log kde/g (Fernandez, Aspe og Roeckel, 2009; Fuentes-Amaya *et al.*, 2016; Gram og Huss, 1996), og sammen med lipidoksidasjon og ATP-nedbrytning bidrar disse faktorene til bestemmelse av kvalitet og holdbarhet.

Autolyse

En viktig del av kvalitetsvurderingen av fisk er rigor mortis (dødsstivhet). Rigor mortis er den første post mortem prosessen og har stor påvirkning på utseende og strukturen til fiskemuskelen, og påvirker dermed kjøttkvaliteten (Berg, Erikson og Nordtvedt, 1997; Nakayama, Toyoda og Ooi, 1993). Når blodsirkulasjonen stoppes som følge av fiskens død, vil oksygentilførselen til muskelen opphøre. Det gjenværende oksygenet brukes opp raskt og dermed avsluttes aerob utvinning av adenosin trifosfat (ATP). ATP-nivåene opprettholdes allikevel i en periode ved å benytte fosfokreatinin og anaerob glykolyse fra glykogenet som er til stede i fisken (figur 2. 4). Som et resultat av glykogennedbrytningen, dannes melkesyre og det oppstår en pH-reduksjon i muskelen. Produksjonen av energi fortsetter til glykogenlagrene er tømt, eller til pH har sunket såpass mye at enzymene som er involvert i glykolysen hemmes. Når ATP-nivåene er tilstrekkelig lave (rundt 1,25 mmol g⁻¹ muskel), kryssbindes muskelfibrene (myofibrillene) og fisken er i rigor mortis (Jacobsen *et al.*, 2010). Oppløsningen av rigor mortis resulterer i den påfølgende mørningen av muskelvevet. Det antas å være relatert til aktivering av en eller flere av de naturlig forekommende muskelenzymene, som fordøyer visse komponenter av rigor mortis komplekset (Huss, 1995).

Nedbrytningen av ATP er en integrert del de autolytiske prosessene som skjer post mortem. Når oksygentilførselen opphøres på grunn av mangel på blodforsyning vil enzymene som er ansvarlig for ATP-nedbrytningen ikke lenger inhiberes.



Figur 2. 4 ATP metabolismen post mortem. ATP brytes ned til ADP, og ADP til AMP. IMP brytes ned til HxR og videre til Hx. Hx brytes ned til Xa og Xa brytes ned til urinsyre. Pi = fosfat. Figuren er modifisert fra (Huss, 1995; Hong, Regenstein og Luo, 2017)

Figur 2. 4 illustrerer syntesen av ATP for de fleste teleoster. Det aerobe oksidasjonssystemet møter ATP-kravene hos levende fisk, men i post mortem må muskelen bruke de to gjenværende veiene; kreatin fosfatase (PCr)- og/eller den anaerobe glykolyseveien. PCr-veien bruker kreatin kinase i muskelen for å omdanne adenosin difosfat (ADP) og PCr til ATP og kreatin. I den anaerobe glykolysen brytes glykogen ned og omdannes til pyruvat og med begrenset oksygen reduseres pyruvat til melkesyre (laktat). Den gradvise uttømmingen av PCr og glykogen gjør at ATP nedbrytes raskt. Nedbrytningen av ATP fører til en økt mengde ADP som er substratet i myokinase reaksjonen og resulterer i produksjonen av én ATP og én adenosin monofosfat (AMP) fra to ADP. Følgelig øker mengden AMP som deamineres til inosin monofosfat (IMP) som videre reduseres til inosin (Ino). Ino blir deretter omdannet til hypoxanthin (Hx) ved hjelp av nukleosid fosforylaseenzymet (Hong, Regenstein og Luo, 2017). Opphopningen av hypoxanthin i fisk er tilsynelatende ansvarlig for bitter smak (Huss, 1995). Tilslutt omdannes Hx til xantin (Xa), urinsyre (US) og andre produkter (Hong, Regenstein og Luo, 2017).

Saito et al. (1959) utviklet en formel for fiskens friskhet basert på de autolytiske endringene (K-indeksen):

$$K\% = \frac{[Ino] + [Hx]}{[ATP] + [ADP] + [AMP] + [IMP] + [Ino] + [Hx]} * 100$$

Hvor [ATP], [ADP], [AMP], [IMP], [Ino] og [Hx] representerer de relative konsentrasjonene av disse komponentene i fiskemuskel, målt ved ulike tider under kjølelagring (Huss, 1995).

Enzymatisk nedbrytning av proteiner er en viktig faktor for kvaliteten. Reduksjonen i pH som kommer av akkumulering av melkesyre på grunn av glykolytisk konvertering har en effekt på de fysikalske egenskapene til muskelen (Hui *et al.*, 2006). Når pH faller vil netto overflateladninger i muskelproteinene reduseres og forårsaker en partiell denaturering av proteinene som gjør at de mister noe av vannholdningskapasiteten. I tillegg vil lav pH aktivere de iboende katepsinene i fiskemuskel. Katepsiner er proteaser, og det er antatt at disse lysosomale proteasene er ansvarlig for proteinnedbrytningen i fiskemuskel (Huss, 1995). Proteolysen av myofibriller og bindevevsproteiner bidrar hovedsakelig til en forverring av tekstur som fører til uønsket mørning av muskelvevet. Proteinene som binder myofibrillene til cellemembranen er blant de første til å dekomponere. Nedbrytningen av disse muskelproteinene reduserer kohesjonsevnen til muskelsegmentene i fileten og fremmer gaping (Jacobsen *et al.*, 2010). I tillegg til nedbrytning av proteiner, påvirker også enzymer hydrolyse av lipider. Hydrolysen katalyseres av lipaser og fosfolipaser som er til stede i fiskevevet, og er en viktig kvalitets-forringelses prosess. Lipolyseprosessen fører blant annet til dannelsen av frie fettsyrer, glyserol og nitrogenbaser. Sensoriske egenskaper er spesielt påvirket av frie fettsyrer, og det er blitt observert at en økning i frie fettsyrer har en korrelasjon med den sensoriske oppfatningen (Jacobsen *et al.*, 2010).

Lipidoksidasjon

Laks er klassifisert som en fet art og har store fettlagre i mageklaffene (Katikou, Hughes og Robb, 2001). Laksens lipider består hovedsakelig av triglycerider. De er nøytrale lipider og finnes hovedsakelig som store dråper i fettvevet, eller som mindre dråper mellom muskelcellene. Sammenlignet med andre dyr, er akvatiske dyr rike på langkjedede flerumettede fettsyrer (PUFA), som hovedsakelig finnes i membranfosfolipidene, men også i de lagrede triglyceridene. Akvatiske dyr som er tilpasset kaldt vann har høyere nivåer av PUFA sammenlignet med de som er tilpasset varmere vann da mer umettethet er essensielt for å opprettholde funksjon og membran-fluiditet ved lavere temperaturer. Omtrent halvparten av membran-fosfolipidene i kaldtvannsfisk er omega-3 fettsyrene EPA og DPA (Hui *et al.*, 2006).

n-3 langkjedede PUFA finnes i både fosfolipider og triglycerider. Fosfolipider er lokalisert i cellemembranen, som gir cellen både struktur og fluiditet. Triglycerider finnes i fettvev og muskelvev. Fosfolipider er mer utsatt for lipidoksidasjon, da de er mer umettede og er lokalisert nærmere prooksidanter i den vandige fasen (Jacobsen *et al.*, 2010). I tillegg har fosfolipider større overflate som gjør ustabile fosfolipider mer eksponert for et utvalg av prooksidanter, slik

som heme proteiner, radikaler, jern og kobber. Disse prooksidantene kan føre til høye nivåer av lipidoksidasjonsprodukter (Hui *et al.*, 2006).

Mikrobiell forringelse

Muskelen i sunn levende eller nyfanget fisk er steril ettersom immunforsvaret til fisken hindrer bakterier i å vokse i kjøttet (Huss, 1995). Mikroorganismer finnes på alle ytre overflater (hud og gjeller) og i tarmen i levende og nyfanget fisk. Det totale antallet organismer varierer, men det oppgis normale bakteriekonsentrasjoner på 10^2 - 10^7 kde (kolonidannede enheter)/cm² på hudoverflaten. Gjeller og tarm inneholder begge mellom 10^3 - 10^9 kde/g (Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002). Når fisk dør kollapser immunsystemet og bakterier sprer seg fritt og under lagring invaderer de kjøttet ved at de beveger seg mellom muskelfibrene (Huss, 1995).

Laksemikrobiotaen avhenger av miljøet der den blir fanget; fisk fanget i kaldt, rent vann har et lavere antall bakterier sammenlignet med fisk fanget i varmere vann. Bakteriene på fisk fanget i kaldt vann klassifiseres i henhold til deres veksttemperaturområde som enten psykrotrofe eller psykrofile. Psykrotrofe (kaldtolerante) er bakterier som kan vokse ved 0 °C, men optimalt rundt 25 °C. Psykrofile (kaldtelskende) er bakterier med maksimal veksttemperatur rundt 20 °C og optimal temperatur ved 15 °C (Huss, 1995). Mikrofloraen i kaldtvannsfisk er dominert av psykrotrofiske og psykrofile gram-negative stavbakterier som tilhører genera *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium* og *Vibrio* (Huss, 1995; Adams og Moss, 2000). Det finnes også en mindre andel gram-positive bakterier inkludert *Bacillus* og *Lactobacillus* (Huss, 1995; Gram, 2009; Macé *et al.*, 2013; Dalgaard, 2000). Blant de mikroorganismene som dominerer forringelsesmikrobiotaen, er det kun de som har evnen til å produsere metabolitter i tilstrekkelige mengder til å forårsake sensorisk avvisning, som kan betraktes som årsak til forringelse. Disse mikroorganismene er kjent som spesifikke kvalitetsforringelses organismer (SSO) (Gram og Dalgaard, 2002; Gram og Huss, 1996). Selv om fiskemikrobiotaen opprinnelig består av et bredt spekter av bakterier er det kun et utvalg av få mikroorganismer som til slutt dominerer produktet. Derfor er sammensetningen av den forringende mikrobiotaen avhengig av mangfoldet av den innledende mikrobiotaen, samt ekstrinsike og intrinsike faktorer som påvirker veksten til mikroorganismer i mat. På denne måten er den forringende mikrobiotaen koblet til fiskens opprinnelse, foredling og lagring (Bozaris og Parlapini, 2017). Spesifikke kvalitetsforringelses organismer funnet i laks inkluderer blant annet *Shewanella* spp. (Gram og Huss, 1996) *P. phosphoreum* (Macé *et al.*, 2012), *B. thermosphacta* (Joffraud *et al.*, 2001), *Lactobacillus* spp. (Olofsson, Ahrné og Molin, 2007), *Pseudomonas* spp. (Gram og Huss, 1996), *Lactococcus piscium* (Macé *et al.*, 2012). Ved

reduisert oksygen og forhøyet karbondioksid (MAP) dominerer hovedsakelig gram positive bakterier som melkesyrebakterier og *B. thermosphacta*, eller den CO₂ resistente *P. phosphoreum* (Gram og Huss, 1996).

P. phosphoreum er en gram negativ bakterie som er blitt funnet i MA-pakkede fiskeprodukter (Macé *et al.*, 2013; Dalgaard *et al.*, 2003). Bakterien er primært ansvarlig for produksjonen av biogene aminer i vakuumpakket kaldrøkt laks (Emborg *et al.*, 2001). Under dekomponering av sjømat, spesielt under lagring ved høyere temperaturer (over 8 °C) produseres forskjellige mengder utvalgte biogene aminer. De vanligste biogene aminer i sjømat assosiert med ødeleggelse er histamin, tyramin, putreskin, kadaverin, tryptamin, spermidin og spermin (Prester, 2011; Biji *et al.*, 2016). De biogene aminene produseres ved at spesielle aminosyrer omdannes via bakteriell nedbrytning (NHI, 2019). Blant aminer er histamin viktig fra det toksikologiske synspunktet da det er årsaken til histaminforgiftning og matintoleranse (Prester, 2011).

2.1.2.2 Patogener

Sett bort fra forbedringer i mat hygiene og produksjonsteknikker, har det blitt en global økning i rapporterte tilfeller av matassosierte infeksjoner (Gould *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014) og økende tilfeller av bakterieresistens mot konvensjonelle antimikrobielle midler (Koluman og Dikici, 2012). Viktige patogener som forårsaker matbåren sykdom inkluderer *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus* og *Clostridium perfringens*. Disse patogenene påvirker ikke bare kvaliteten til maten, de forårsaker også helseproblemer for de som inntar den kontaminerte maten (Lee *et al.*, 2014). *L. monocytogenes* er en av de mest virulente matbårne patogener og har flere ganger blitt isolert fra rå laks (Mędrala *et al.*, 2003; Di Ciccio *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Den grampositive bakterien *L. monocytogenes* er et ubikvitært, intracellulært patogen som har vært ansvarlig for flere utbrudd knyttet til matbåren sykdom (Farber og Peterkin, 1991). Listeriose er en bakteriell, næringsmiddelbåren sykdom som forårsakes av bakterien *L. monocytogenes* og kan gi sykdommer av varierende alvorlighetsgrad. Spesielt hos gravide og personer med lavt immunforsvar kan mikroben gi alvorlige konsekvenser (Lassen, 1999).

Listeria monocytogenes vokser godt i lettpreserverte fiskeprodukter (Eklund *et al.*, 1995; Rørvik, Yndestad og Skjerve, 1991). Bakterien er ubikvitær i miljøet og har blitt detektert i flere typer mat og kan vokse både aerobt og anaerobt ved temperaturer så lavt som -1 °C (Eklund *et al.*, 1995). I tillegg vokser den ved høye saltkonsentrasjoner (10 %), i et bredt pH-spenn (4,5-9) og ved lengre perioder med tørking og frysing (Buchrieser *et al.*, 2006). Pakking

under CO₂ atmosfære utsetter vekst av *L. monocytogenes*, men modifiserte atmosfære og kjølelagring er alene ikke tilstrekkelig for å kontrollere vekst av bakterien (Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002; Nosedá *et al.*, 2014). *L. monocytogenes* tilhører slekten *Listeria* sammen med den ikke-patogene *L. innocua*. Gensekvensen for de to nevnte *Listeria* artene er tilnærmet lik som gjør at en kan vurdere vekst og oppførsel av den patogene arten *L. monocytogenes*, ved bruk av den ikke-patogene arten *L. innocua* (Buchrieser *et al.*, 2006).

2. 2 Forbehandlingsteknologi

2.2.1 Varmebehandling

Blansjering

Blansjering er en av de mest brukte forbehandlingsteknologiene i matindustrien og benyttes for å ødelegge enzymatisk aktivitet før produktet eventuelt dehydreres eller fryses (Fellows, 2017). Blansjering er et eksempel på en ustabil varmeoverføringsstilstand som involverer konvektiv overflateoppvarming med damp eller varmt vann, som videre fører til at varmen ledes fra overflaten og til matens indre (Fellows, 2017). Blansjering inaktiverer enzymer, forårsaker mykgjøring av vev og minimerer tap av farge og smak under tørking og lagring (Baloch, Buckle og Edwards, 1977; Adedeji *et al.*, 2008). Teknologien kan også føre til tap av næringsstoffer slik som vannløselige vitaminer, sukker, aminosyrer og mineraler (Marabi *et al.*, 2006). Et av formålene med blansjering er inaktivering av polyfenoloksidase. Polyfenoloksidase er en fellesbetegnelse for gruppen enzymer som katalyserer oksidasjonen av de fenolske komponentene som forårsaker den brune overflaten på kuttete frukt og grønnsaker (Chen, Collins og McCarty, 1971; Severini *et al.*, 2003). For å oppnå tilstrekkelig enzymatisk inaktivering, varmes produktet raskt til en bestemt temperatur og holdes der i en bestemt tid. Videre kjøles produktet raskt ned (Fellows, 2017). Blansjeringstiden er avgjørende og bør tilpasses størrelse og type produkt basert på følsomheten til nedbryting ved termisk prosessering. Underblansjering stimulerer enzymatiske reaksjoner og reduserer nedbrytningsraten og overblansjering fører til tap av tekstur, farge og smak (Huang *et al.*, 2016). Bioaktive fytokjemikalier som karotenoider og polyfenoler, kan også gjennomgå kjemiske forandringer under blansjering. Effekten av blansjering på de kjemiske endringene avhenger av flere faktorer som inkluderer metoden for blansjering, termisk stabilitet til de ulike komponentene, enzymaktiviteten og plasseringen i plantestrukturen (Huang *et al.*, 2016).

Sous vide

Sous vide er en metode hvor råmateriale tilberedes under kontrollerte betingelser av temperatur og tid i varmemestabile, vakuumiserte poser. Vakuumsforseglingen har flere fordeler ved at den lar varmen overføres effektivt fra vannet til maten, og øker matens holdbarhet ved å eliminere risikoen for kontaminering under lagring og den hemmer oksidering. Den presise temperaturreguleringen tillater god reproducerbarhet (Baldwin, 2011).

2.2.2 Frysetørking

Frysetørking, også kjent som lyofilisering, er sublimasjon eller fjerning av vanninnhold fra frossen mat og benyttes for konservering av organiske materialer og matvarer (Stévant *et al.*, 2015). Frysetørking er en skånsom prosess og teknologien benyttes for å unngå tap av flyktige stoffer og smaker for å oppnå et produkt med høy kvalitet. En fordel ved frysetørking er at man unngår tap av flyktige stoffer og smaker, og minimerer reaksjoner som oppstår under konvensjonell tørking, som for eksempel proteindenaturering og ikke-enzymatiske reaksjoner. Dette gjør at teksturen og smaken på produktet ligner fersk mat (Lombraña, 2009). I tillegg tillater frysetørking bedre ekstraksjonsutbytte ved for eksempel ekstraksjon av florotanniner (Dai og Mumper, 2010)

Ved frysetørking fjernes vann i produktet ved sublimering ved lav temperatur og trykk under trippelpunktet for vann, og fast stoff går direkte til gass/damp uten at det går via væskefasen (Nguyen, Arason og Eikevik, 2014; Pedersen, 2018). Først fryses vannet i produktet i frysetrinnet, og deretter fjernes det ved sublimasjon av is i det primære tørketrinnet (Nguyen, Arason og Eikevik, 2014). Dehydreringen skjer under vakuum, og våtsonen er fryst under hele prosessen slik at en får gode preserveringsresultater.

2.2.3 Emballasjeteknologi

Modifisert atmosfære pakking (MAP)

Modifisert atmosfære pakking (MAP), er en teknikk som benyttes for å forlenge holdbarheten til lettbederverlige matvarer, og kan defineres som innkapsling av mat i en emballasje der atmosfæren (%CO₂, %CO, %O₂, %N₂) inne i pakken er modifisert (Nosedá *et al.*, 2014). Prinsippet i MAP baserer seg på å erstatte luften i pakken med en annen type fiksert gassmix. CO₂ er den viktigste gassen som benyttes i MAP av fisk på grunn av dens bakteriostatiske og fungistatiske egenskaper. Den inhiberer veksten til mange forringende bakterier og inhiberingen øker med økt CO₂-konsentrasjon i atmosfæren (Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002). CO₂ er vann- og fettløselig (Farber, 1991) og kan trenge gjennom bakteriemembranen og forårsake endringer i intracellulær pH og forstyrre den indre enzymatiske likevekten (Aickin og Thomas, 1975). I fiskeindustrien brukes to emballasjeteknikker som konserveringsstrategi: vakuumemballasje, som fjerner gassfasen fra emballasjen før den forsegles og emballasje med modifisert gassammensetning i frivolumet (Nosedá *et al.*, 2014).

Aktiv emballasje

Som et alternativ og forbedring til matemballasje, blir aktiv emballasje benyttet (Galatto *et al.*, 2012). Aktiv emballasje er et emballasjekonsept som bidrar til å opprettholde eller forlenge holdbarheten til næringsmidler samtidig som den forsikrer at kvalitet, sikkerhet og integritet i produktet opprettholdes. Aktive emballasjesystemer kan deles inn i absorberende og emitterende. Absorberende fjerner uønskede komponenter fra næringsmiddelet, eller fra miljøet. Dette kan for eksempel være fuktighet, karbondioksid, oksygen, etylen eller lukt. Emmitterende kan tilsette komponenter i den emballerte maten eller i frivolumet, slik som antimikrobielle komponenter, karbondioksid, antioksidanter, smaker eller etanol (Yildirim *et al.*, 2017). En av de mest lovende løsningene er antimikrobielle emitterende, som representerer en alternativ måte å bruke antimikrobielle midler for å øke mattryggheten. Antimikrobielle emitterende bruker forskjellige typer antimikrobielle komponenter som forsinker og/eller hemmer vekst av mikroorganismer i næringsmidler ved at næringsmiddelproduktet er i kontakt med emballasjen (Galatto *et al.*, 2012). I fersk og prosessert mat, vil degradering eller mikrobiell vekst oppstå i overflaten av maten, og det er antatt at tilsetning via aktiv emballasje øker holdbarheten og kvaliteten (Yildirim *et al.*, 2017). Utslipp av tilsetningsstoffene fra aktiv emballasje øker forbrukernes sikkerhet da forbindelsene er inkludert i emballasjestrukturen og kan frigjøres på en kontrollert måte i mindre mengder og bare hvor det er nødvendig (Galatto *et al.*, 2012).

3. Material og metoder

Kapittelet inkluderer material og metoder benyttet i laboratorieforsøkene knyttet til masteroppgaven. Dette innebærer blant annet optimalisering av blansjeringsmetode og tillaging av butareekstrakt, samt metodene anvendt ved evaluering av ekstraktets innhold av polyfenoler, fucoxanthin og dens antioksidantkapasitet. I tillegg presenteres fremgangsmåten ved vurdering av butarens effekt på mikroorganismer med fokus på butareabsorbentens virkning på vekst av *L. innocua*, aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier.

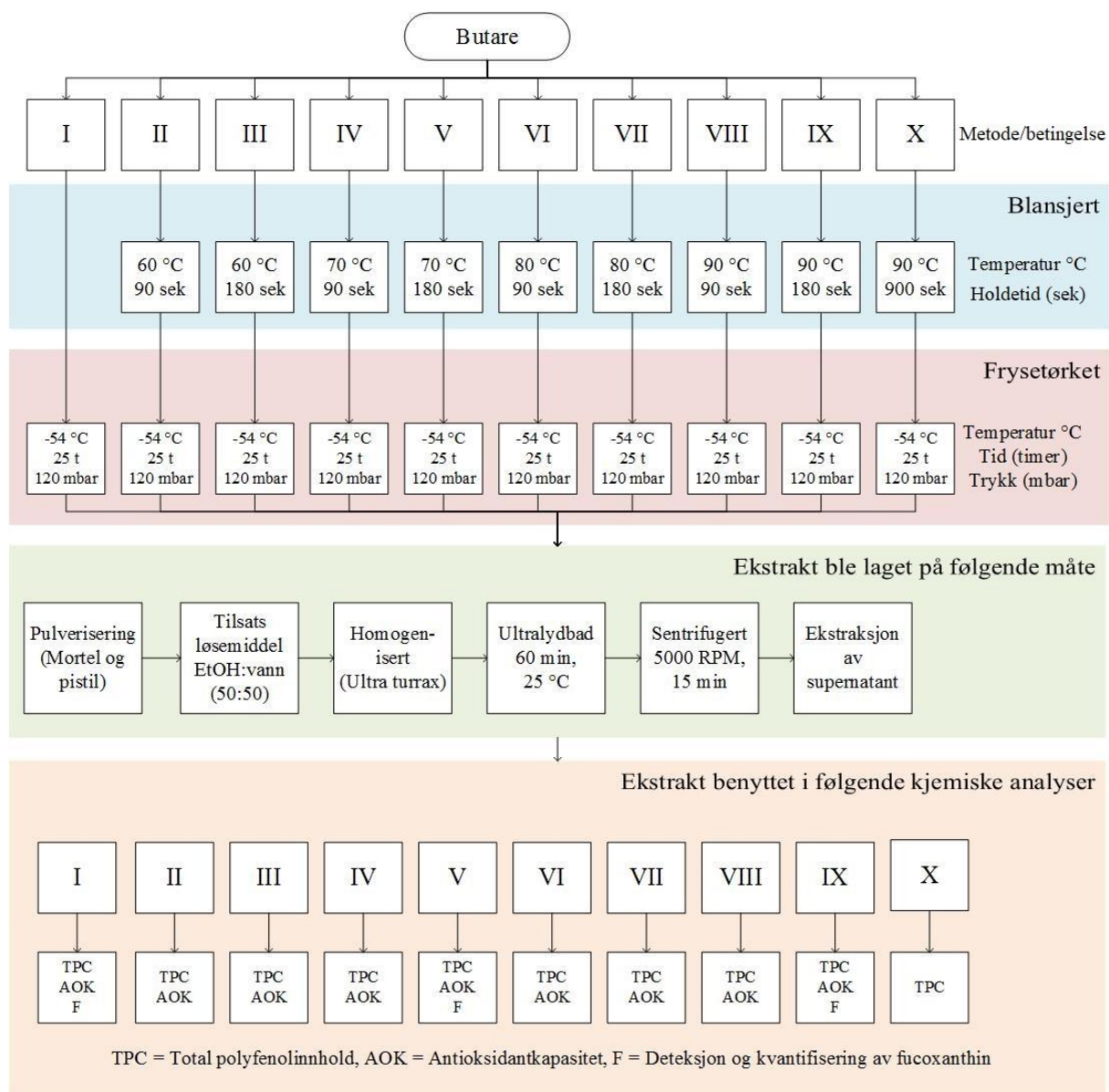
3.1 Optimalisering av blansjeringsmetode

Delmål én i masteroppgaven innebar en optimalisering av blansjeringsmetode som ble utført ved å undersøke ulike tid- og temperatur regimer. Regimene ble vurdert basert på minst mulig denaturering av polyfenoler, fucoxanthin, samt butarens antioksidantkapasitet. Videre viser metoden benyttet i evaluering av blansjeringsmetodene.

3.1.1 Oversikt over forsøksdesign benyttet i evaluering av blansjeringsmetode

Prøvematerialet av frossen butare (*Alaria esculenta*) fra Seaweed Energy Solutions AS, Frøya ble benyttet i analysene som er beskrevet. Butaren ble dyrket i åpent vann, høstet 06.05.2019 og oppbevart ved -20 °C frem til bruk. Tre paralleller á 100 g ($\pm 0,1$ g) for hver av de ti blansjeringsmetodene (figur 3. 1) ble veid ut og vakuumpakket (Webo matic) i poser egnet for Sous Vide (Maskegruppen Vinterbro). Parallellene ble blansjert i de respektive regimene (figur 3. 1), og videre oppbevart i -80 °C. Etter endt blansjering ble butaren frysetørket og videre pulverisert. Ved tillaging av ekstrakt ble det som en del av ekstraksjonsmetoden tilsatt løsemiddel (etanol: vann 1:1) sammen med butarepulveret. Dette ble videre klargjort for tillaging av ekstrakt. Ekstraktene ble benyttet i analyse av total polyfenolinnhold, deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin og vurdering av butarens antioksidantkapasitet. Kort oppsummert kan de overnevnte trinnene deles inn i

- Blansjering av butare (kapittel 3.1.2)
 - Frysetørking av butare (kapittel 3.1.3)
 - Tillaging av butareekstrakt (kapittel 3.1.4)
 - Total polyfenolinnhold (kapittel 3.1.5)
 - Deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin (kapittel 3.1.6)
 - Antioksidantkapasitet (kapittel 3.1.7)
- Disse punktene er presentert videre i detalj.



Figur 3. 1 Flytskjema over forsøksdesignet benyttet for evaluering av blansjeringsmetodene. Figuren involverer butaren fra tint tilstand hvorav ulike parti (I-X) ble blansjert i ulike tid og temperaturregimer, og deretter frysetørket. Videre oppsummerer figuren tillagning av ekstrakt, og hvilke blansjeringsmetoder som ble inkludert i de kjemiske analysene

3.1.2 Blansjering av butare

For en kontrollerbar og reproducerbar prosess ble det bestemt at butaren skulle blansjeres i en Sous Vide-maskin (Metos No 502493 Fusion shef, Jylaba), ved ulike tid- og temperaturregimer (figur 3. 1). Som en kontroll på valgt tid- og temperaturområde ble det benyttet en kontrollgruppe ekskludert fra blansjeringen samt én ekstremvariant som ble blansjert ved 90 °C i 900 sekunder. Etterfulgt av blansjeringen ble parallellene plassert direkte i isbad i 120 sekunder. Butaren ble videre lagret ved -80 °C frem til videre bruk.

3.1.3 Frysetørking av butare

Blansjeringsmetodene med tilhørende paralleller ble frysetørket (Freezone 12, LabConco) hver for seg i 25 timer ved -54 °C med et trykk på 120 mbar. Den frysetørkede butaren ble deretter lagret i -80 °C frem til videre bruk.

3.1.4 Tillaging av butareekstrakt

Den frysetørkede butaren ble manuelt pulverisert med morter og pistill. En mengde på 1,000g ($\pm 0,008g$) ble veid ut og overført til sentrifugerør (Starstedt). For hver parallell, ble det laget ytterligere to paralleller (a og b) under utveilingen. Videre ble 9,0 mL løsemiddel (etanol: vann, 1:1) (Ethanol 96 % vol, VWR Chemicals, CAS: 64-17-5) tilsatt sentrifugerørene sammen med den pulverisert butaren. Valg av etanol som løsemiddel er basert på at ekstraktet videre skal være i kontakt med mat, og er derfor å foretrekke fremfor bruk av eksempelvis metanol og aceton (Wang *et al.*, 2012). På grunn av fordamping av etanol ble hver tilsatt av løsemiddel veid, for en mer nøyaktig utregning av konsentrasjon, og mengden (g) tilsatt løsemiddel ble korrigert i henhold til tettheten (g/mL) til løsemiddelet. Gjennomsnittlig sluttkonsentrasjonen til butareekstraktet ble $105,94 \pm 0,15$ g butare/ L ekstrakt. Prøvene ble videre homogenisert ved hjelp av Ultra turrax (IKA T25 digital) ved 13 000 omdreininger per minutt (rpm) i 30 sekunder, etterfulgt av ultralydbad (Branson 5800) i 60 minutter ved 25 °C. Prøvene ble videre sentrifugert (Eppendorf Centrifuge 5804, 5000 RPM, 4472 RCF) i 15 minutter. Supernatanten (væskefasen) ble ekstrahert ved bruk av sprøyte og filtrert gjennom sprøytefilter (Sterile Syringe Filter, 0,2 μ m Cellulose Acetate Membrane, VWR Chemicals), og videre overført til kimaxrør. Ekstraktene ble lagret i -80 °C frem til videre bruk.

3.1.5 Total polyfenolinnhold

Folin-Ciocalteu metoden er en antioksidantanalyse basert på elektronoverføring, som måler den reduserende kapasiteten til en antioksidant. Analysen benyttes til å bestemme total fenol/polyfenolinnhold i plantebasert mat (Lamuela-Raventós, 2017). Fenolske forbindelser reagerer med Folin-Ciocalteu-reagenset og en dissosiasjon av fenolprotoner fører til dannelse av fenolat-anion. Fenolat reduserer Folin-Ciocalteu-reagenset og det dannes en blått kompleks mellom fenolat og Folin-Ciocalteu-reagenset uavhengig av strukturen til fenolforbindelsene (Huang, Ou og Prior, 2005). Det blå komplekset kvantifiseres ved bruk av spektrofotometri (Blainski, Lopes og Palazzo de Mello, 2013), og total polyfenol blir ofte estimert som gallussyre ekvivalenter per gram ekstrakt (He *et al.*, 2012).

Total polyfenolinnhold i butarekstraktene ble analysert ved bruk av Folin-Ciocalteu metoden i henhold til metoden beskrevet av Asami *et al.* (2003). I forkant av analysen ble det laget en standardkurve med gallussyre. Ionebyttet vann (5 mL) ble tilsatt en serie på 6 målekolber (100 mL). Videre ble det tilsatt en stamløsning av gallussyre ved ulike konsentrasjoner (0-5,0 mg/L) i tillegg til 1 mL Folin-Ciocalteu reagens (VWR Chemicals, CAS: UN3264) og 10 mL 7% natriumkarbonat (Sodium carbonate anhydrous, VWR Chemicals, CAS: 497-19-8). Kolbene ble videre fortynnet med ionebyttet vann til 100 mL. Etter 2 timer ble absorbansen målt spektrofotometrisk ved 750 nm (Shimadzu UV-1800). Stamløsningen ble laget ved å tilsette 0,0100 g gallussyre i 100 mL målekolbe (Gallic acid monohydrate \geq 98 %, Sigma Aldrich, CAS: 5995-86-8), og ble fortynnet med ionebyttet vann som ga stamløsningen en sluttkonsentrasjon på 100,0 mg/L.

For bestemmelse av total polyfenol i butarekstraktet ble det benyttet samme fremgangsmåte som for standardkurven, med unntak av tilsats av gallussyren som ble erstattet med 500 μ L butarekstrakt. Det ble laget 2 paralleller for hver prøve. Resultatene ble estimert som gram gallussyre ekvivalenter per 100 gram tørrvekt (g GAE/ 100 g tørrvekt). For utregning av g GAE/100 g tørrvekt ble fremgangsmåten i vedlegg 2 benyttet.

3.1.6 Deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin

High performance liquid chromatography (HPLC) er en utbredt kvalitativ og kvantitativ analysemetode for separasjon, identifikasjon og kvantifisering av ikke-flyktige organiske analytter i væske (Kumar, Mumtaz og Ahmad, 2018).

For deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin ble det benyttet normalfase HPLC (Agilent 1100). Butareekstrakt (100 µL) ble overført til HPLC-glass (VWR Chemicals) som inneholdt micro-insert-rør på 0,1 mL (VWR Chemicals). Detektoren som ble benyttet i forsøket var en Diode Array Detektor og kolonnen som ble benyttet var en YMC-Pack 30 kolonne (250× 4.6 mm id, S-5 µm). Mobilfasen besto av metanol (Methanol HiPerSolv Chromanorm, VWR Chemicals, CAS: 67-56-1): aceton (Acetone HiPerSolv Chromanorm, VWR Chemicals, CAS: 67-64-1) (A (60:40)) og aceton: vann (B (60:40)) med en gradient på 80 % A og 20 % B i løpet av analysetiden på kolonnen som ble satt til 20 minutter. Mobilfasen hadde en flow på 1,0 mL/min, og kolonnen hadde en temperatur på 20 °C. Fucoxanthin ble detektert ved 447 nm og det ble benyttet kommersiell standard (Fucoxanthin all-trans analytical standard, Sigma-Aldrich, CAS: 3351-86-8) som kontroll.

3.1.7 Antioksidantkapasitet

Antioksidantkapasiteten til en komponent, et ekstrakt eller andre biologiske kilder kan evalueres ved bruk av 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) – metoden. DPPH er et stabilt fritt radikal som har en dyp fiolett farge (Tirzitis og Bartosz, 2010), og metoden baserer seg på reduksjon av DPPH når den blandes med en antioksidant (Kedare og Singh, 2011). Ved å motta hydrogen fra en korresponderende donor, mister løsningen den karakteristiske dype lillafargen (Tirzitis og Bartosz, 2010). Primære antioksidanter, hovedsakelig fenoler og tioler kan fjerne frie radikaler gjennom hydrogenatom-donasjon som er mulig på grunn av den relativt svake bindingen som dannes mellom hydrogen og tilsvarende heteroatom (som for eksempel oksygen, nitrogen og svovel) (Nenadis og Tsimodou, 2017). Antioksidantkapasiteten uttrykkes som EC50, det vil si konsentrasjonen av antioksidanten som er nødvendig for å redusere 50 % av 1 gram DPPH i stabil tilstand (Sánchez-Moreno, Larrauri og Saura-Calixto, 1998). Lav EC50-verdi korresponderer med høy antioksidantkapasitet (Suriyatem *et al.*, 2017).

Antioksidantkapasiteten til butareekstraktet ble målt ved bruk av DPPH-metoden i henhold til metoden beskrevet i Sánchez-Moreno, Larrauri og Saura-Calixto (1998). I forkant av analysen ble det laget en fortynningsrekke av butareekstraktet og ekstraktene ble fortynnet med etanol: vann (1:1) til endelige konsentrasjoner i området 0-300 g/g DPPH. For tillaging av løsninger ble det tilsatt 200 µL antioksidantløsning (butareekstrakt) fra hver av de nevnte fortynningene, 800 µL Tris-HCL buffer (100 mM, pH 7,4) og 1000 µL DPPH-løsning (500 µM) i egnede rør. Videre ble løsningene blandet og plassert mørkt i 60 minutter før absorbansen ble avlest spektrofotometrisk ved 520 nm (Shimadzu UV-1800). Tre prøver bestående av 800 µL Tris-

HCL buffer og 1000 µL DPPH-løsning ble benyttet som blankprøve og Tris-HCL buffer ble benyttet som referanse. Et punktdiagram ble laget i Excel basert på konsentrasjonen til fortynningsrekken (g AH/g DPPH) og % Radical Scavenging Effect (RSE). RSE (%) ble beregnet ut fra absorbansen til prøven og blankprøven (ligning 3.1).

$$RSE (\%) = \left[1 - \frac{\text{Absorbans av prøve}}{\text{Absorbans av blank}} \right] * 100 \quad (3.1)$$

Videre ble EC50-verdien beregnet ut fra den lineære og logaritmiske trendlinjen.

En standardkurve ble laget ved bruk av Trolox (\pm 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid 97 %, Sigma-Aldrich, CAS: 53188-07-1). Stammløsningen hvor 50 mg Trolox ble fortynnet med 5 mL etanol (Ethanol 96%, VWR Chemicals, CAS: 64-17-5) ble videre fortynnet til konsentrasjoner fra 400 µg/mL til 25 µg/mL. Til analyse av antioksidantkapasiteten ble det benyttet samme fremgangsmåte som for butarekstraktet. Standardkurven ble kun benyttet til vurdering av fremgangsmåten, for å evaluere tilstanden til de benyttede løsningene. For tillaging av Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7,4) og DPPH-løsningen (500 µM) ble fremgangsmåten i vedlegg 3 benyttet.

3.2 Butareabsorbentens effekt på bakterievekst

Hovedmålet med oppgaven var å se om butareekstrakt tilsatt i en aktiv emballaseløsning kunne øke mattrykgheten og forlenge holdbarheten til modifisert atmosfærepakket laksefilet. Delmål to i oppgaven baserte seg på evaluering av butareabsorbentens effekt. Denne effekten skulle vurderes med fokus på endring av mikrobiell vekst gjennom en lagringsstudie av aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier. I tillegg skulle butareabsorbenten evaluert med hensyn på hemming av vekst av *L. innocua* på inokulert modifisert atmosfærepakket laksefilet. Videre presenteres fremgangsmåten i metodene benyttet i evaluering av effekten.

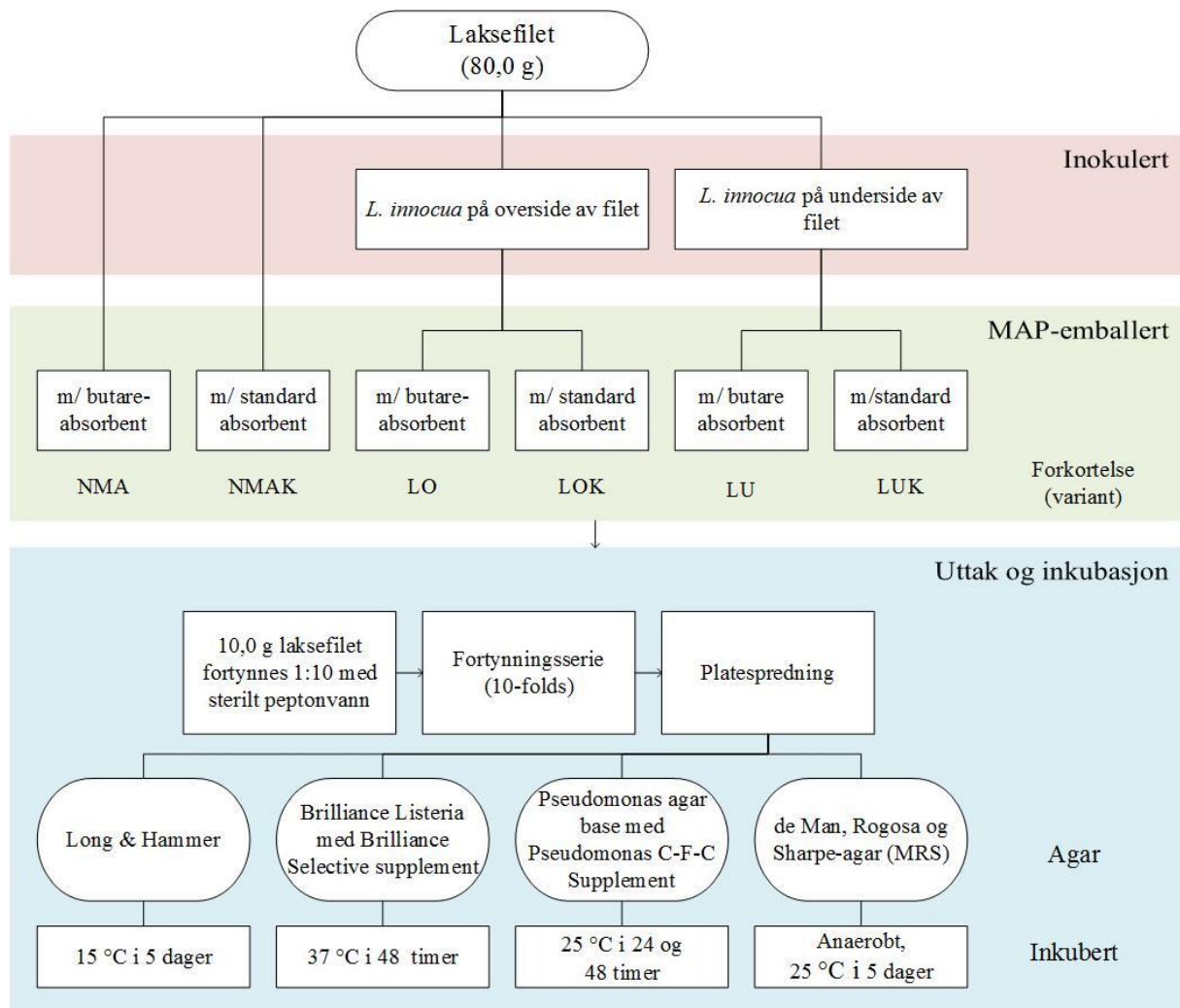
3.2.1 Oversikt over forsøksdesign benyttet i vurdering av butareabsorbentens effekt

Hel laks fra SalmoSea ble filetert og porsjonert til 80 ± 2 g (slaktedato: 07.02.2020, leveringsdato: 10.02.2020). Seks ulike varianter (figur 3. 2) á 3 paralleller ble fordelt i 230 mL plastskåler (Hicpet, Faerch Plast) med tilhørende absorbent. Skålene ble pakket i modifisert atmosfære (Tray Sealing Machine TL 250, Webomatic) med 60 % CO₂ og 40 % N₂ og oppbevart ved 4 °C frem til uttak. Nivået av CO₂ og N₂ ble målt (Checkmate 9900, Dansensor PBI) hver uttaksdag.

I forkant av forsøket ble det laget butareabsorbenter på grunnlag av resultatene opparbeidet i delmål én, hvor en optimal blansjeringsmetode ble evaluert basert på minst mulig denaturering av polyfenoler, fucoxanthin og antioksidantkapasitet. Fremgangsmåten benyttet under vurdering av butareabsorbentens antimikrobielle effekt ble basert på observasjon av mikrobiologisk vekst på fire ulike vekstmedium; Brilliance Listeria, Long & Hammer, Pseudomonas agar base og de Man, Rogose og Sharpe agar (MRS). Studiet varte over 21 dager og oppbevart ved 4 °C med uttak hver 3. dag. For undersøkelse av butareabsorbentens effekt på *L. innocua*, ble det i forkant av forsøket laget et inokulum av *L. innocua* som ble inokulert på underside/overside av laksefileten. Kort oppsummert kan trinnene som nevnt over deles inn i:

- Tillaging av butareabsorbenter (kapittel 3.2.2)
- Inokulering av *L. innocua* (kapittel 3.2.3)
- Butareabsorbentens effekt på *L. innocua*, aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier (3.2.4)

Disse trinnene vil bli videre presentert i detalj.



Figur 3. 2 Flytskjema over forsøksdesignet benyttet til evaluering av butareabsorbentens effekt *L. innocua*, aerobe kintall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier. Figuren involverer laksefileten fra rå tilstand hvorav 2/3 av laksefiletene ble inokulert med *L. innocua* (1/3 på oversiden, 1/3 på undersiden). Videre ble laksefileten pakket i modifisert atmosfære med tilhørende absorbent (butare eller standard). Figuren oppsummerer fremgangsmåten for uttak, og inkubasjonsbetingelser satt for de ulike agarene

3.2.2 Tillaging av butareabsorbenter

For å undersøke maksimal løsemiddeladsorpsjon til absorbentene ble 10 absorbenter dyppet i løsemiddel (etanol: vann, 1:1) og veid. Gjennomsnittet av absorbert veske ble benyttet til bestemmelse av mengde butarekstrakt som skulle tilsettes absorbentene.

På bakgrunn av resultatene fra delmål én ble det besluttet å blansjere taren i 90 °C i 180 sekunder. Til homogenisering av ekstraktet ble polytron (Polytron PT 3000, Kinematica AG) med 11000 omdreininger per minutt i 40 sekunder benyttet, ellers ble ekstraktet laget som for blansjeringsmetodene i det innledende forsøket. På hver absorbent ble det pipettert 5 mL butarekstrakt og absorbentene ble videre fryst i -80 °C frem til frysetørking. Butareabsorbentene (figur 3. 3) ble frysetørket i 36 timer.



Figur 3. 3 Ferdig frysetørket butareabsorbent som ble benyttet i lagringsforsøket

3.2.3 Inokulering med *Listeria innocua*

Ren *Listeria innocua* kultur (-80 °C) (CCUG 15531) ble benyttet. Kulturen ble tint og dyrket opp på brain heart infucion (BHI) agar (Oxoid, CM1136) ved 37 °C i 24 timer. En koloni ble videre overført til BHI buljong (Oxoid, CM1032) for videre kultivering og ble inkubert ved 8 °C i 4 dager for kuldeadapsjon. Kulturen ble fortynnet til $OD_{600} = 0,1$ for å oppnå en celletetthet på ca. 8×10^7 celler/mL (Agilent, u.å). Kulturen ble videre fortynnet 1:1000 og 800 µL av kulturen ble tilsatt laksebitene (à 80g) for å oppnå en startkonsentrasjon på ca. 3 log kde/g.

3.2.4 Butareabsorbentens effekt på *Listeria innocua*, aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier

10,0 ± 1,0 g laksefilet ble veid og overført i stomacherpose (Separator 400, Grade products ltd) og tilsatt sterilt peptonvann (Neutralized bacteriological peptone, Oxoid LP0034) til 1:10 fortynning i henhold til NMKL metode nr. 91, 6. utgave (NMKL, 2010). Prøvene ble homogenisert ved bruk av stomacher (Masticator, IUL). Videre ble det laget en 10-folds fortynningsserie, hvor konsentrasjon av fortynningen var basert på forventet bakterievekst. Ved utsåing ble det benyttet platespredning, og aseptisk teknikk gjennom hele forsøket.

For kvantifisering av *L. innocua*, ble Brilliance Listeria agar (Oxoid, CM1080) benyttet, med Brilliance Selective Supplement (SR0227E, Oxoid). For kvantifisering av aerobe kimtall ble Long & Hammer-agar benyttet og fremgangsmåten ble laget i henhold til NMKL metode nr. 184 (NMKL, 2006). For kvantifisering av *Pseudomonas* ble det benyttet Pseudomonas agar base (Oxoid, CM0559) med Pseudomonas C-F-C Supplement (SR0103E, Oxoid). For kvantifisering av melkesyrebakterier ble MRS agar benyttet (de Man, Rogose, Sharpe, Oxoid, E.CM0361). For bestemmelse av startkonsentrasjonen til *L. innocua* ble det på dag 0 av uttaket pipettert og fordelt 1 mL fra fortynningen $1,0 \times 10^{-1}$ (tilhørende varianten inokulert med *L. innocua*) på tre Brilliance Listeria agarskåler. Samme fremgangsmåte ble benyttet på den naturlige varianten, for å utelukke vekst av *Listeria* på det opprinnelige råstoffet. Brilliance Listeria agar ble inkubert aerobt ved 37 °C, med avlesning etter 48 timer. Long & Hammer-agar ble inkubert aerobt ved 15 °C, med avlesning etter 5 dager. Pseudomonas-agar ble inkubert aerobt ved 25 °C, med avlesning etter 24 og 48 timer. MRS-agar ble inkubert anaerobt med O₂ absorbent (EZ Anaerobe Container System with Indicator, BD GasPak™) ved 25 °C, med avlesning etter 5 dager. Kimtall ble uttrykt som log kde/g prøve.

3.3 Statistiske analyser

Til statistiske analyser ble programvaren IBM SPSS benyttet (IBM SPSS Statistics). Generell lineær modell (GLM), univariat ble benyttet til analyse av resultatene. GLM univariat gir regresjonsanalyse og analyse av varians (ANOVA) for en avhengig variabel, med en eller flere faktorer og/eller variabler (IBM, u.å). For vurdering av statistisk signifikans ble et signifikansnivå (α) på 0,05 (5 %) anvendt. Duncan, post hoc ble benyttet i tilfeller hvor det ble detektert statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$ og forskjeller indikeres ved bruk av bokstaver.

Ved analyse av korrelasjon ble det benyttet bivariant, Pearson, tosidig korrelasjon kombinert med statistisk signifikans ($\alpha = 0,05$). Retningslinjer for å tyde Pearsons korrelasjons koeffisient (r) tilsier at en korrelasjonskoeffisient mellom 0,1-0,3 viser liten korrelasjon, 0,3-0,5 viser medium korrelasjon og 0,5-1,0 viser sterk korrelasjon (Cohen, 1977).

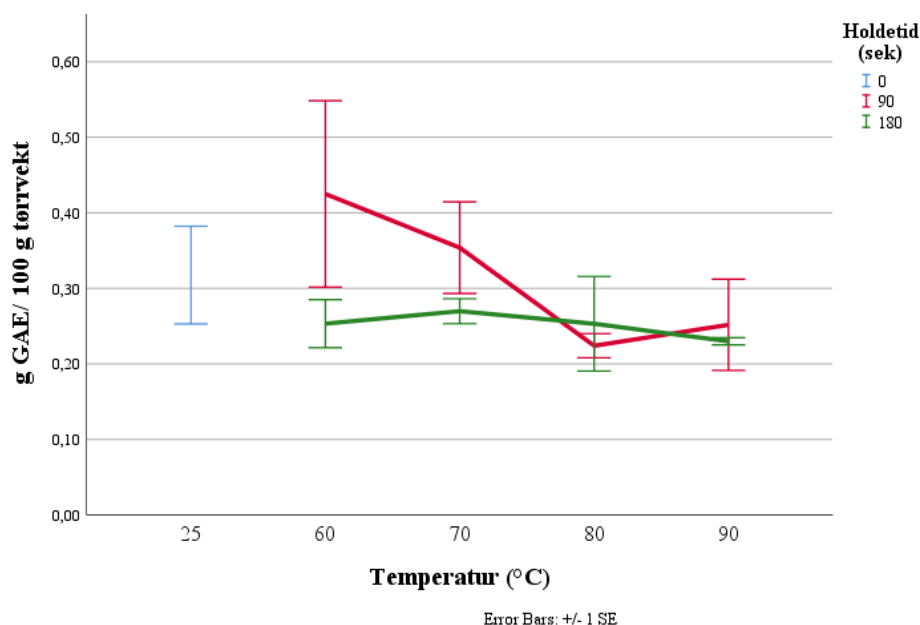
4. Resultater

I dette kapittelet vil resultater fra optimalisering av blansjeringsmetode presenteres med tilhørende resultater fra butarekstraktenes total polyfenolinnhold, fucoxanthininnhold og antioksidantkapasitet. Videre presenteres resultatene fra lagringsstudie. Ved vurdering ble det benyttet et signifikansnivå (α) på 0,05. Videre vil resultatene bli presentert med gjennomsnitt mellom parallellene \pm standardfeil.

4.1 Optimalisering av blansjeringsmetode

4.1.1 Total polyfenolinnhold

Tillaget butarekstrakt fra de ulike blansjeringsmetodene ble undersøkt for konsentrasjon av total polyfenolinnhold ved bruk av Folin-Ciocalteu metoden. Figur 4. 1 viser at blansjeringsmetode II (60 °C ved holdetid 90 sekunder) ga størst utbytte av total polyfenolinnhold ($0,43 \pm 0,12$ g GAE/100 g tørrvekt). Videre viser figuren at ved holdetid 90 sekunder reduseres innholdet av polyfenoler med økende temperatur og ved holdetid 180 sekunder holdes nivået av total polyfenolinnhold stabilt gjennom temperaturintervallet. Det ble derimot ikke observert signifikante forskjeller mellom blansjeringsmetodene og konsentrasjonen av total polyfenolinnhold ($p = 0,394$). Figuren er fremstilt fra resultatene i tabell V4. 1, vedlegg 4.

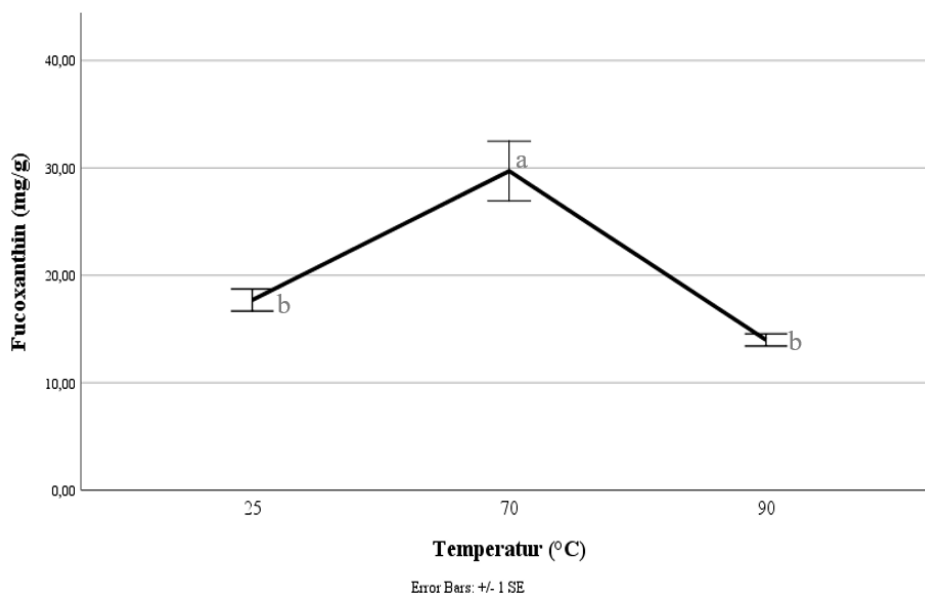


Figur 4. 1: Total polyfenolinnhold uttrykt som g GAE/100 g tørrvekt for holdetidene 0 sek, 90 sek og 180 sek. Figuren viser gjennomsnitt total polyfenolinnhold (estimert gallussyre g GEA/ 100g tørrvekt) som funksjon av de ulike temperaturene (°C) benyttet i blansjeringsmetodene. Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

En ekstremvariant ble inkludert for å evaluere om valgte tids- og temperaturregimer var passende. Ekstremvarianten ble blansjert i 90 °C i 900 sekunder (15 minutter) og uttrykte et total polyfenolinnhold på $0,16 \pm 0,00$ g GAE/ 100 g tørrstoff.

4.1.2 Deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin

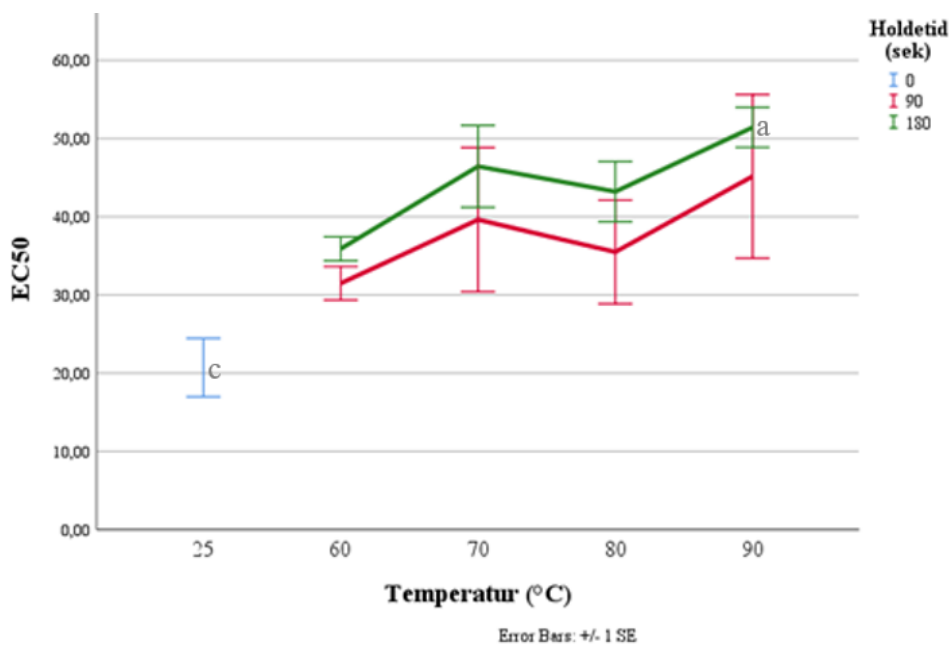
Ekstrakt fra utvalgte blansjeringsmetoder (ingen, middel og høy behandling) ble analysert ved bruk av HPLC for deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin. Ingen behandling tilsvarer ublansjert, middel behandling tilsvarer 70 °C i 180 sekunder og høy behandling tilsvarer 90 °C i 180 sekunder. Det ble observert signifikante forskjeller mellom blansjeringsmetodene og innhold av fucoxanthin (mg/g) ($p < 0,05$). Resultatene viste signifikant høyere konsentrasjoner av fucoxanthin ved blansjeringsmetode 70 °C i 180 sekunder sammenlignet med ublansjert og butare blansjert ved 90 °C i 180 sekunder. Figur 4. 2 viser økende konsentrasjon av fucoxanthin fra den ublansjerte butaren (ved 25 °C) til 70 °C, og videre reduksjon ved 90 °C. Bokstavene (a og b) indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$. Figuren er fremstilt fra resultatene i tabell V4. 2, vedlegg 4.



Figur 4. 2 Kvantifisering av fucoxanthin (mg/g) for holdetid 180 sekunder. Figuren viser gjennomsnitt konsentrasjon fucoxanthin (mg/g) som funksjon av de ulike temperaturene (°C) benyttet i blansjeringsmetodene. Bokstavene i figuren indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$. Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

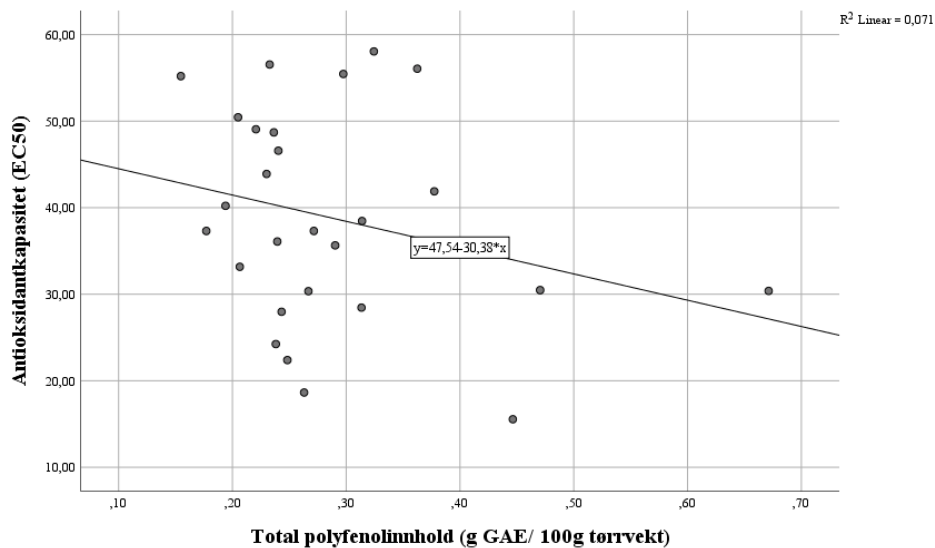
4.1.3 Antioksidantkapasitet

For vurdering av hvilken blansjeringsmetode som ga høyest antioksidantkapasitet ble de ulike butarekstraktenes evne til å nøytralisere DPPH undersøkt. Antioksidantkapasiteten presenteres ved bruk av EC50 (g AH/ g DPPH). Det ble observert signifikante forskjeller i EC50-verdier mellom de ulike blansjeringsmetodene ($p = 0,048$). Resultatene viste at ublansjert butare hadde signifikant lavere EC50-verdi ($20,72 \pm 3,73$ g AH/ g DPPH). Blansjeringsmetode 90 °C, holdetid 180 sekunder viste signifikant høyere EC50-verdier ($51,43 \pm 2,56$ g AH/), sammenlignet med de andre blansjeringsmetodene. Figur 4. 3 viser at EC50-verdiene øker med økende temperatur, hvor holdetid 180 sekunder generelt har noe høyere EC50-verdi sammenlignet med holdetid 90 sekunder gjennom temperaturintervallet. Bokstavene (a og c) indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$. Figuren er fremstilt fra resultatene i tabell V4. 3, vedlegg 4.



Figur 4. 3 Antioksidantkapasitet uttrykt som EC50 (g AH/ g DPPH) for holdetidene 0 sek, 90 sek og 180 sek. Figuren viser gjennomsnitt EC50-verdier (g AH/ g DPPH) som funksjon av de ulike temperaturene (°C) benyttet under blansjeringsmetodene. Bokstavene i figuren indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$. Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

Siden polyfenoler og fucoxanthin har antioksidative egenskaper ble Pearson korrelasjon (r) benyttet for vurdering av korrelasjonen mellom de ulike bioaktive komponentene og antioksidantkapasiteten. Basert på Pearsons retningslinjer for korrelasjon viser antioksidantkapasiteten og total polyfenolinnhold ingen signifikant korrelasjon mellom blansjeringsmetodene ($r = -0,267$, $p = 0,179$) (figur 4. 4). Det samme gjelder for holdetid 90 ($r = -0,197$, $p = 0,540$) og holdetid 180 sekunder ($r = 0,015$, $p = 0,964$).



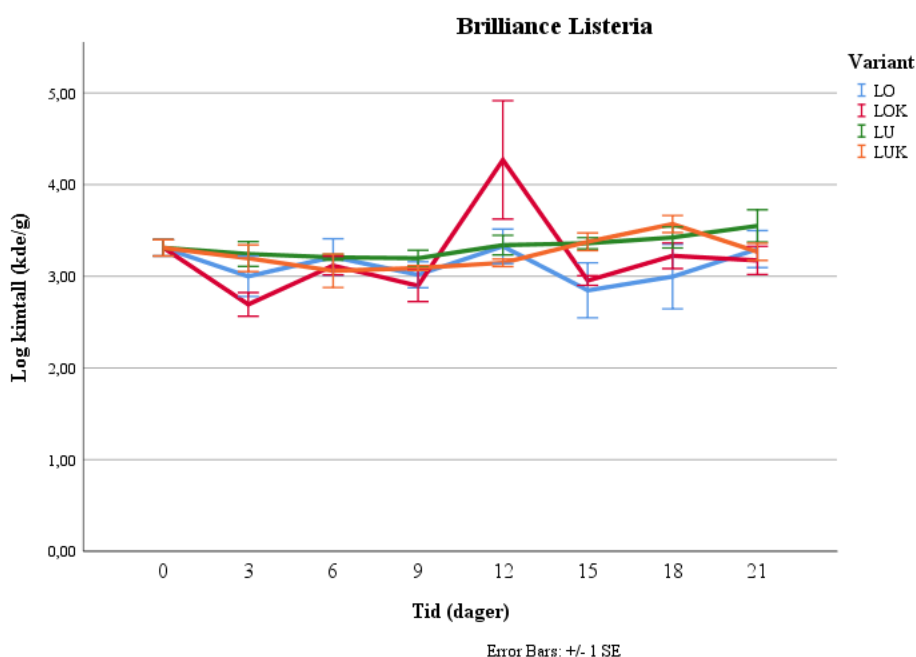
Figur 4. 4 Scatterplot over blansjeringsmetodene, med antioksidantkapasiteten (EC50) som funksjon av total polyfenolinnhold (g GAE/ 100 g tørrvekt)

Fucoxanthin viser også ingen statistisk korrelasjon med antioksidantkapasiteten. ($r = 0,204$, $p = 0,599$).

4.2 Butareabsorbentens effekt på bakterievekst

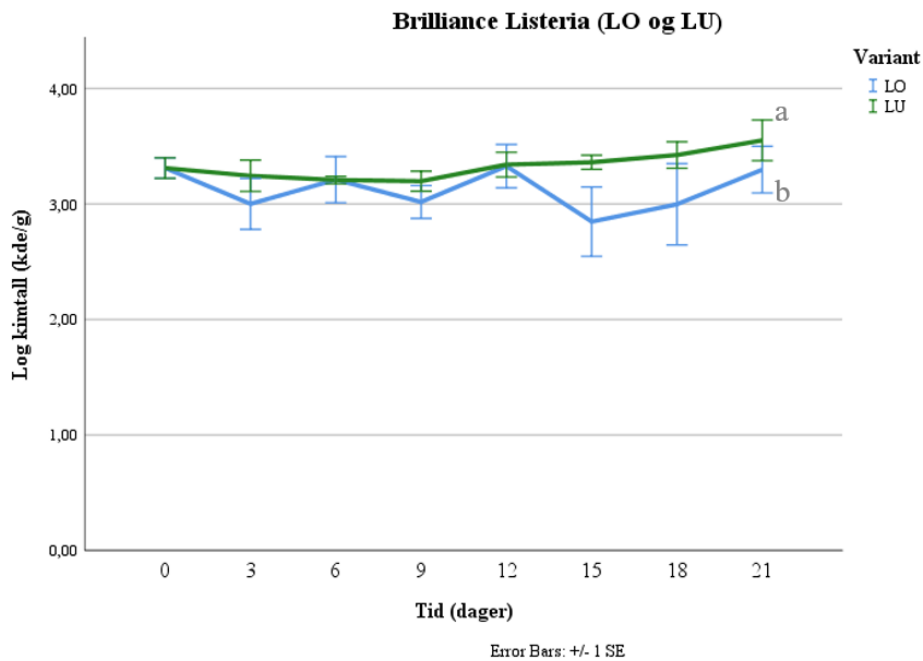
4.2.1 *Listeria innocua*

For vurdering av butareabsorbentens antimikrobielle effekt på *L. innocua* ble Brilliance Listeria agar benyttet med Brilliance Listeria Selective Supplement. Det ble ikke observert signifikante forskjeller mellom de ulike variantene (LO, LOK, LU og LUK) på vekst av *L. innocua* ($p = 0,184$). Figur 4. 5 viser vekstkurven for de ulike variantene; laks inokulert med *L. innocua* på overside med butareabsorbent (LO), laks inokulert med *L. innocua* på overside med standard absorbent (LOK), laks inokulert med *L. innocua* på underside med butareabsorbent (LU) og laks inokulert med *L. innocua* på underside med standard absorbent (LUK). Figuren viser stabil vekst med liten/ingen endring i bakteriekonsentrasjon (med unntak av LOK på dag 12) gjennom det 21 dager lange lagringsstudiet. LO, LOK, LU og LUK har på dag 0 en bakteriekonsentrasjon på $3,31 \pm 0,03$ log kde/g. På dag 21 har LO en bakteriekonsentrasjon på $3,30 \pm 0,20$ log kde/g, LOK; $3,17 \pm 0,15$ log kde/g, LU; $3,55 \pm 0,18$ log kde/g og LUK; $3,27 \pm 0,09$ log kde/g. Post Hoc av analysen viser derimot at bakteriekonsentrasjonen for LU er signifikant høyere sammenlignet med bakteriekonsentrasjonen til LO (figur 4. 6). Figur 4. 5 og 4. 6 er fremstilt fra resultatene i tabell V5. 1, vedlegg 5.



Figur 4. 5 Vekst av *L. innocua* hos variantene laks inokulert med *L. innocua* på overside med butareabsorbent (LO), laks inokulert med *L. innocua* på overside med standard absorbent (LOK), laks inokulert med *L. innocua* på underside med butareabsorbent (LU) og laks inokulert med *L. innocua* på underside med standard absorbent (LUK). Resultatene er representert med gjennomsnitt log kimtall (kde/g) som en funksjon av tid (dager). Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

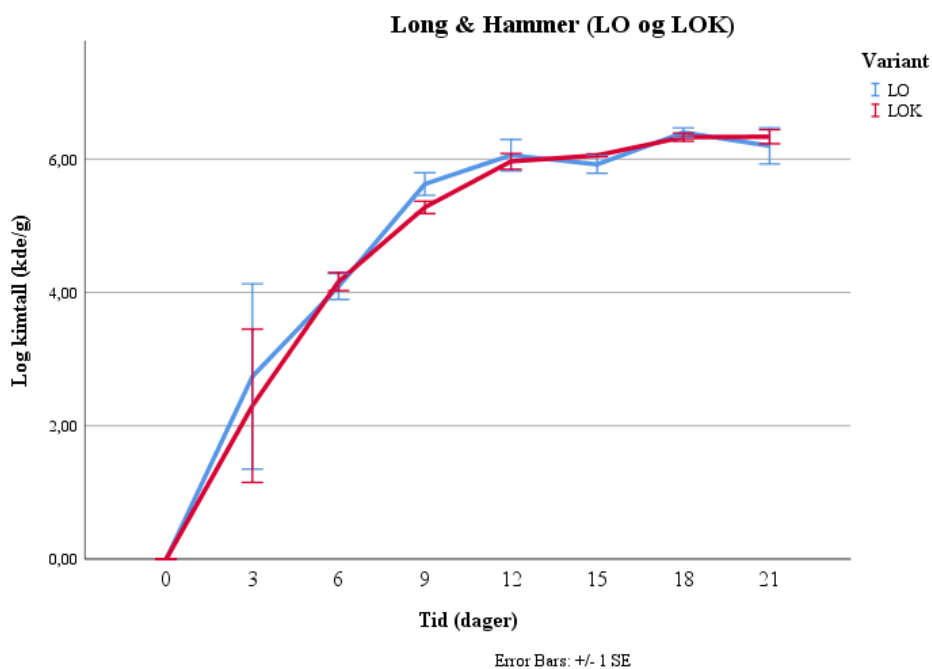
Figur 4. 6 viser vekst av *L. innocua* hos variantene; laks inokulert med *L. innocua* på overside med butareabsorbent (LO) og laks inokulert med *L. innocua* på underside med butareabsorbent (LU). Det ble observert signifikante forskjeller mellom bakteriekonsentrasjonen for variantene ($p < 0,05$), hvor laks inokulert på underside har signifikant høyere bakteriekonsentrasjon (log kintall (kde/g), sammenlignet med laks inokulert på overside. Figur 4. 6 viser vekstkurven til de to variantene LO og LU, hvor bokstavene (a og b) indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$.



Figur 4. 6 Vekst av *L. innocua* hos variantene laks inokulert med *L. innocua* på overside med butareabsorbent (LO) og laks inokulert med *L. innocua* på underside med butareabsorbent (LU). Resultatene er representert med gjennomsnitt log kintall (kde/g) som funksjon av tid (dager). Bokstavene i figuren indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$. Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

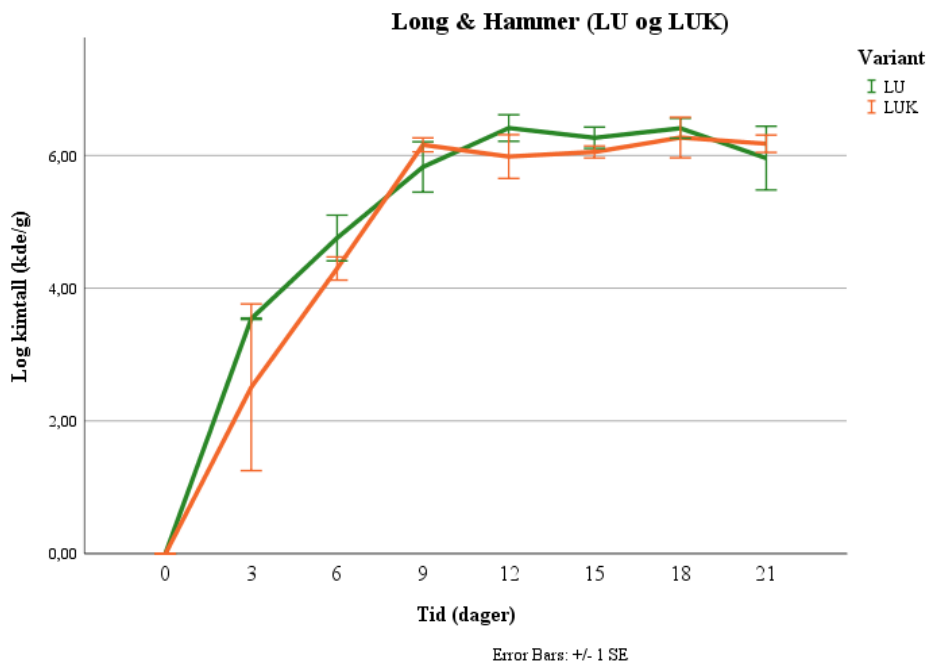
4.2.2 Aerobe kimtall

Butareabsorbentens effekt på aerobe kimtall ble undersøkt. Det ble ikke observert signifikante forskjeller på bakteriekonsentrasjon av aerobe kimtall mellom laks inokulert med *L. innocua* på overside med butareabsorbent (LO) og med standard absorbent (LOK) ($p = 0,749$). Figur 4. 7 viser en sammenfallende vekstkurve for de to variantene, hvor bakteriekonsentrasjonen stiger med økende antall dager; LO og LOK har på dag 0 en bakteriekonsentrasjon på 0 log kde/g. På dag 21 har LO en bakteriekonsentrasjon $6,20 \pm 0,27$ log kde/g og LOK har en bakteriekonsentrasjon på $5,91 \pm 0,47$ log kde/g. Figur 4. 7 er fremstilt fra resultatene i tabell V5. 2, vedlegg 5.



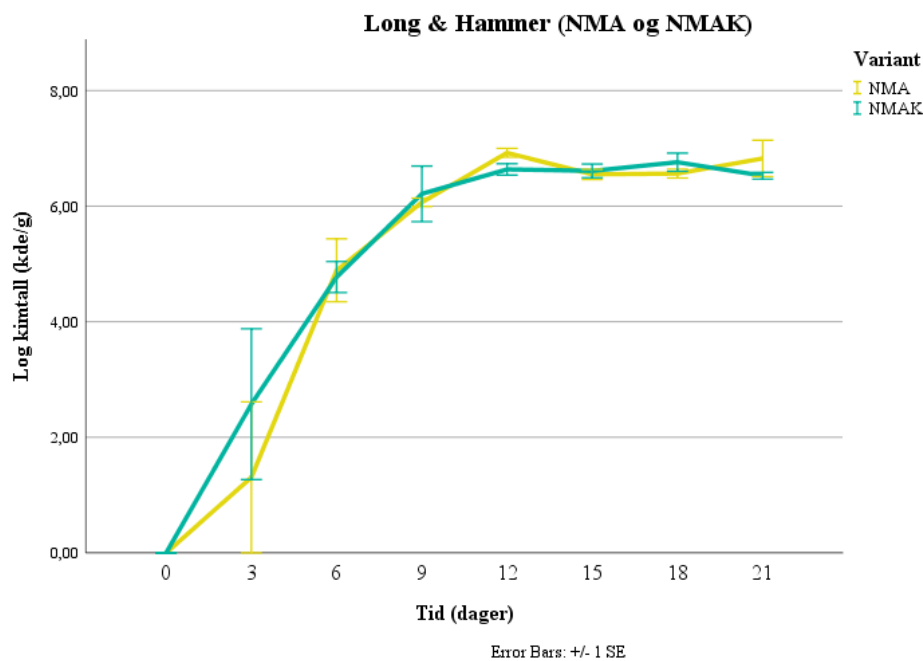
Figur 4. 7 Vekst av aerobe kimtall for de ulike variantene; laks inokulert med *L. innocua* på overside med butareabsorbent (LO), laks inokulert med *L. innocua* på overside med standard absorbent (LOK). Resultatene er representert med gjennomsnitt log kimtall (kde/g) som funksjon av tid (dager). Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

Videre ble bakteriekonsentrasjon for aerobe kintall undersøkt for variantene laks innokulert med *L. innocua* på underside av laksefilet, med butareabsorbent (LU) og med standard absorbent (LUK). Det ble ikke observert signifikante forskjeller på bakterievekst mellom variantene ($p = 0,276$). Vekstkurven fra figur 4. 8 viser sammenfallende grafer. LU og LUK har på dag 0 en bakteriekonsentrasjon på 0 log kde/g. På dag 21 har LU en bakteriekonsentrasjon $5,96 \pm 0,48$ log kde/g og LUK har en bakteriekonsentrasjon på $6,18 \pm 0,13$ log kde/g. Figur 4. 8 er fremstilt fra resultatene i tabell V5. 2, vedlegg 5.



Figur 4. 8 Vekst av aerobe kintall for de ulike variantene laks inokulert med *L. innocua* på underside med butareabsorbent (LU) og laks inokulert med *L. innocua* på underside med standard absorbent (LUK). Resultatene er representert med gjennomsnitt log kintall (kde/g) som funksjon av tid (dager). Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

Vekst av aerobe kimtall for naturell laks med butareabsorbent (NMA) og standard absorbent (NMAK) ble også undersøkt. Det ble ikke observert signifikante forskjeller på bakterievekst mellom de ulike variantene. Grafen i figur 4. 9 viser at vekstkurven for NMA og NMAK er sammenfallende. På uttaksdag 0 har NMA og NMAK en bakteriekonsentrasjon på 0 log kde/g. NMA har på dag 21 en bakteriekonsentrasjon på $6,83 \pm 0,32$ log kde/g og NMAK har en bakteriekonsentrasjon på $6,53 \pm 0,06$ log kde/g. Figur 4. 9 er fremstilt fra resultatene i tabell V5. 2, vedlegg 5.



Figur 4. 9 Vekst av aerobe kimtall for de ulike variantene laks med butareabsorbent (NMA) og laks med standard absorbent (NMAK). Resultatene er representert med gjennomsnitt log kimtall (kde/g) som funksjon av tid (dager). Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

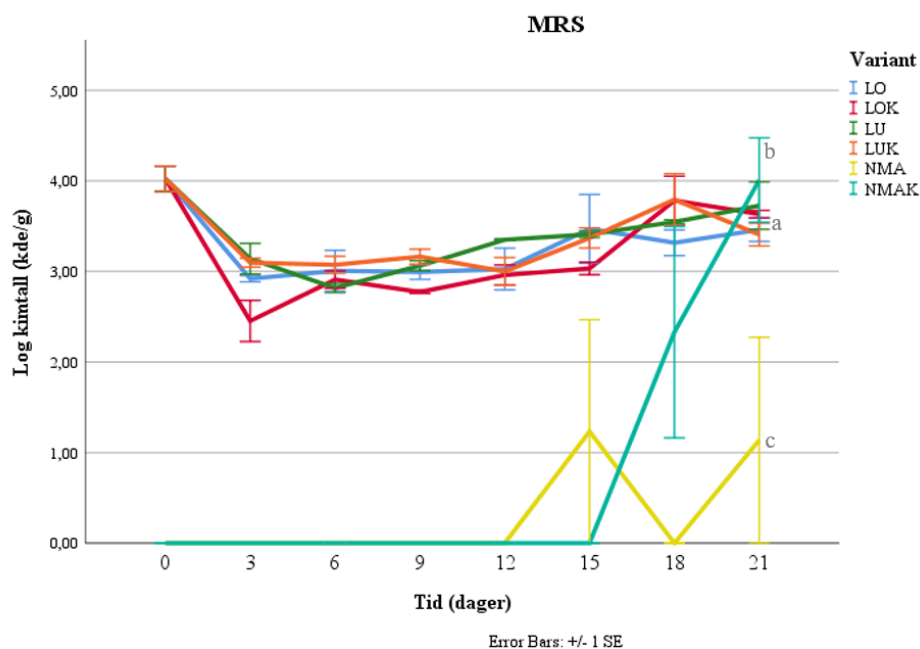
4.2.3 *Pseudomonas* spp.

For deteksjon av *Pseudomonas* spp. ble det benyttet *Pseudomonas* agar med *Pseudomonas* C-F-C supplement. Resultatene viser ingen påvisning av *Pseudomonas* spp., og vil ikke bli presentert i oppgaven.

4.2.4 Melkesyrebakterier

Butareabsorbentens effekt på vekst av melkesyrebakterier ble undersøkt. Det ble observert signifikante forskjeller mellom de ulike variantene, hvor variantene inokulert med *L. innocua* (LO, LOK, LU og LUK) hadde signifikant høyest bakteriekonsentrasjon. Videre viser resultatene at naturell laks med standard absorbent (NMAK) har signifikant høyere bakterievekst enn naturell laks med butareabsorbent (NMA). På dag 0 har NMA og NMAK en bakteriekonsentrasjon på 0 log kde/g. På dag 21 har NMAK har en bakteriekonsentrasjon på $4,01 \pm 0,47$ log kde/g hvorav NMA har en bakteriekonsentrasjon på $1,14 \pm 1,14$ log kde/g.

Figuren 4. 10 viser at variantene inokulert med *L. innocua* (LO, LOK, LU og LUK) har bakterievekst fra dag 0 med en relativt stabil bakterievekst gjennom hele studiet. Vekstkurven til variantene inokulert med *L. innocua* er ikke sammenfallende med vekstkurven for den naturlige laksen (NMA og NMAK). Kontroll av referansestammen (*L. innocua* CCUG 15531) på MRS agar ga bakterievekst, noe som indikerer at *L. innocua* også vokser på MRS-agar. Bokstavene i figuren (a, b og c) indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$. Figur 4. 10 er fremstilt fra resultatene i tabell V5. 3, vedlegg 5.



Figur 4. 10 Vekst av melkesyrebakterier på de ulike variantene; laks inokulert med *L. innocua* på overside med butareabsorbent (LO), laks inokulert med *L. innocua* på overside med standard absorbent (LOK), laks inokulert med *L. innocua* på underside med butareabsorbent (LU), laks inokulert med *L. innocua* på underside med standard absorbent (LUK), laks med butareabsorbent (NMA) og laks med standard absorbent (NMAK). Bokstavene i figuren indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$. Resultatene er representert med gjennomsnitt log kintall (kde/g) som funksjon av tid (dager). Bokstavene i figuren indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$. Feilfeltene viser ± 1 standardfeil (SE)

5. Diskusjon

5.1 Optimalisering av blansjeringsmetode

Delmål én i masteroppgaven innebar optimalisering av blansjeringsmetoder, hvor ulike tids- og temperaturregimer skulle evalueres basert på minst mulig denaturering av polyfenoler og fucoxanthin, samt butarens totale antioksidantkapasitet.

5.1.1 Total polyfenolinnhold

Brunalger inneholder polyfenolske komponenter i form av florotanniner. På bakgrunn av dette ble det utført en kvantifisering av total polyfenolinnhold ved bruk av Folin-Ciocalteu metoden hvor resultatene ble benyttet som en parameter i vurdering av hvilke blansjeringsmetoder som ga høyest utbytte.

Resultatene viste ingen signifikant forskjell mellom blansjeringsmetodene når det gjaldt total polyfenolinnhold. Selv om det ikke ble observert signifikante forskjeller, kan en trend identifiseres i figur 4. 1, hvor holdetidene (90 og 180 sekunder) påvirket resultatene noe ulikt. Metode II; 60 °C, holdetid 90 sekunder viser høyest total polyfenolinnhold, hvor innholdet gradvis ble redusert med økt temperatur og stabilisert rundt 80 °C. Florotanninene er lokalisert i fysodene, som er membranbundne cytoplasmatiske vesikler (Ragan og Craigie, 1976; Li *et al.*, 2009). Trenden som observeres i figur 4. 1 kan skyldes at noen av fysodene fortsatt var intakte i den ublansjerte butaren, selv etter ekstraksjonsbehandlingen den ble utsatt for. Den påfølgende varmebehandlingen kan ha forårsaket celleskade og videre utslipp av fenolske komponenter, som videre forklares med høyere utbytte ved 60 °C, holdetid 90 sekunder. Siden polyfenoler er varmesensitive kan den observerte reduksjonen i total polyfenolinnhold skyldes termisk degradering (Gonçalves *et al.*, 2010; Jaiswal, Gupta og Abu-Ghannam, 2012). For holdetid 180 sekunder ser en at total polyfenolinnhold var relativt stabilt gjennom temperaturintervallet og at innholdet var på samme nivå som for 80 °C og 90 °C ved holdetid 90 sekunder. Ut ifra figuren ser det ut til at holdetid under blansjering påvirket total polyfenolinnhold i høyere grad sammenlignet med temperatur på blansjeringsbadet. De kjemiske endringene som oppstår ved blansjering avhenger av tid og temperatur (Huang *et al.*, 2016). For å kontrollere om tids- og temperaturregimer var innenfor riktig område ble det besluttet å blansjere en ekstremvariant. Ekstremvarianten; metode X (90 °C /900 sekunder) viste lavest konsentrasjon av total polyfenolinnhold og valgt blansjeringsområde ser ut til å være riktig.

Videre viste resultatene store standardfeil for flere av blansjeringsmetodene (figur 4. 1). En av årsakene til måleusikkerheten kan være at deler av taren ble underblansjert. Underblansjering stimulerer enzymatiske reaksjoner og reduserer nedbrytningshastigheten (Huang *et al.*, 2016). Ved bruk av vakuumposer egnet for sousvide, er det også forventet at det trengs lengre tid for at en fullstendig varmeoverføring skal inntreffe. Måleusikkerheten ble gradvis mindre med økt temperaturbehandling og lengre holdetid. I tillegg viser ekstremvarianten den laveste observerte standardfeilen for alle metodene (I-X), som understøtter teorien om at taren ikke var fullstendig blansjert i de tilfellene med lavere temperatur og holdetid.

Fra litteraturstudiet viser rapportene at total polyfenolinnhold i butare (tabell 2. 2) generelt er en god del høyere sammenlignet med total polyfenolinnhold opparbeidet i denne oppgaven (figur 4. 1). Mangfoldet av forbehandlinger og ekstraksjonsmetoder er store (tabell V1.2, vedlegg 1) og påvirker evnen til å sammenligne resultatene som er funnet i denne oppgaven. Samtidig har ingen benyttet blansjering som en del av forbehandlingen. Abu-Ghannam og Jaiswal (2015) analyserte reduksjon i polyfenoler for kål under blansjering (80-90 °C) i 2 minutter og fant en reduksjon på 45% i total polyfenolinnhold. Det totale polyfenolinnholdet ble analysert for ublansjert butare, og da innholdet av polyfenoler ikke viser signifikante forskjeller fra de andre blansjeringsmetodene, ser det ut til at det er andre faktorer som påvirker det lave polyfenolinnholdet. Litteraturstudiet viste generelt bruk av frysetørking som forbehandling (tabell V1. 2, vedlegg 1). Det ble derimot benyttet ulike metoder til pulverisering av den frysetørkede butaren, som også kan ha påvirket utbyttet av total polyfenolinnhold. Roleda *et al.* (2019) har pulverisert butaren til en partikkelstørrelse på 0,12 mm. Dette er betraktelig lavere sammenlignet med partikkelstørrelsen rapportert i de andre artiklene. Da total polyfenolinnhold også var en god del høyere i dette tilfellet, kan det tenkes at partikkelstørrelsen en oppnår under pulverisering av butaren har en påvirkning på utbytte av total polyfenolinnhold. I denne oppgaven ble butaren manuelt pulverisert med mortel og pistil og det kan tenkes at partikkelstørrelsen er noe større. Bruk av homogenisator bidro til redusert partikkelstørrelse, men den faktiske størrelsen ble ikke tallfestet, og det er usikkert om det kan være en av årsakene til det lave utbyttet av total polyfenolinnhold som ble observert.

Det er noe uenighet i hvilken ekstraksjonsmetode som gir høyest utbytte av total polyfenolinnhold. Sammensetningen av løsemiddelet er avgjørende i ekstraksjonsprosessen da en vellykket ekstraksjon i stor grad er avhengig av polyfenolenes polaritet. Det er derfor nødvendig å bruke polare væsker slik som vann og organiske løsemidler som etanol, etyl acetat, aceton og metanol (Creis, Gall og Potin, 2018). Roleda *et al.* (2019) og Tibbetts, Milley og Lall

(2016) benytter begge aceton som løsemiddel i ekstraksjonen og flere studier har vist at ekstraksjonsutbytte er størst ved bruk av aceton (Koivikko *et al.*, 2005; Catarino *et al.*, 2019). Et forsøk utført av Boi, Cuong og Vinh (2017) viser derimot at etanol ga høyest utbytte av polyfenoler. Kopperud (2018) analyserte total polyfenolinnhold i butare ved bruk av etanol som løsemiddel, og resultatene viste lavere total polyfenolinnhold sammenlignet med resultatene som benyttet aceton som løsemiddel. Med utgangspunkt i Kopperud (2018), viste total polyfenolinnhold opparbeidet i denne oppgaven betraktelig lavere innhold, med lik fremgangsmåten. Dermed ser det ut til at det er andre faktorer enn bruk av løsemiddel som er årsak til de store avvikene som observeres i litteraturstudiet og total polyfenolinnholdet opparbeidet i denne oppgaven.

Individuelle forskjeller, reproduksjonsstadiet, døgn og sesongvariasjoner er faktorer som er påvist å ha innvirkning på innholdet av florotanniner hos brunalger. Spesielt viser det seg at lokalisasjon og sesong har stor påvirkning (Ragan og Jensen, 1978; Holdt og Kraan, 2011; Singh og Sidana, 2013). Florotanniner øker med økt sollys og en sesong med relativt lite sollys kan bidra til lavere utbytte av total polyfenolinnhold. I tillegg er det viktig å bemerke at konsentrasjonen av florotanniner varierer både innad en individuell algeplante, og mellom ulike planter i en algepopulasjon (Ragan og Jensen, 1978; Holdt og Kraan, 2011; Singh og Sidana, 2013). Individuelle forskjeller kan også bidra til lavere innhold av total polyfenolinnhold og høy måleusikkerhet, noe som ble observert i studien.

5.1.2 Deteksjon og kvantifisering av fucoxanthin

Pigmentet fucoxanthin er årsaken til den brune fargen i brunalger, og det var forventet deteksjon av fucoxanthin i butare. Fucoxanthin ble detektert og kvantifisert ved bruk av HPLC, som en del av vurderingsgrunnlaget for valg av blansjeringsmetode. Resultatene viste signifikant høyere konsentrasjon av fucoxanthin i butaren som ble blansjert ved 70 °C, holdetid 180 sekunder. Figur 4. 2 viser at metodene; ublansjert butare og butare blansjert ved 90 °C i 180 sekunder ga signifikant lavere fucoxanthininnhold. Fucoxanthin er bundet til flere proteiner og andre pigmenter (Kita *et al.*, 2015) og en økning i temperatur kan ha bidratt til brudd i bindingene og videre høyere ekstraksjonsutbytte, som kan forklare observasjonen i figur 4. 2 ved 70 °C. Denne teorien understøttes av Kim *et al.* (2012) som rapporterte høyere fucoxanthininnhold ved 70 °C, sammenlignet med 30 °C og 50 °C. Videre kan nedgangen av fucoxanthininnholdet som observeres fra 70 °C til 90 °C, skyldes at fucoxanthin har denaturert fra 70 °C til 90 °C (Kawee-ai, Kuntiya og Kim, 2013) som et resultat av at fucoxanthin er ustabil og påvirkes av varme (Zhang *et al.*, 2015).

Litteraturstudiet som ble gjennomført i sammenheng med masteroppgaven viste lavere rapporterte fucoxanthininnhold (tabell 2. 4), sammenlignet med fucoxanthininnholdet opparbeidet i denne oppgaven. På samme måte som for total polyfenolinnhold ble det benyttet ulike ekstraksjonsmetoder (tabell V1. 4, vedlegg 1). Resultatene i tabell 2. 4 viser relativt likt innhold av fucoxanthin, uavhengig av ekstraksjonsmiddel. Valgte mobilfaser er også forskjellige, men igjen ser ikke dette ut til å påvirke resultatene. Kopperud (2018) har benyttet samme ekstraksjonsmetode og fremgangsmåte for deteksjon og kvantifisering, som den som presenteres i denne oppgaven. Butaren i Kopperud (2018) ble også høstet ved samme lokalisasjon og på samme årstid, og viser et relativt likt innhold av fucoxanthin. Da resultatene opparbeidet i denne oppgaven samsvarer med resultatene fra Kopperud (2018), tyder det på at sesong og geografiske variasjoner har en effekt på fucoxanthininnholdet (Dean og Hurd, 2007; Fung, Hamid og Lu, 2013; Terasaki *et al.*, 2009). Dette kan være en av årsakene til at det ble observert store forskjeller i fucoxanthininnholdet i denne oppgaven sammenlignet med resultatene fra litteraturstudiet, hvor butaren ble høstet fra lokalisasjoner sør for Norge (tabell V1. 4, vedlegg 1).

5.1.3 Antioksidantkapasitet

Som nevnt tidligere inneholder butaren flere bioaktive komponenter som er ansvarlig for antioksidantaktiviteten. DPPH-metoden ble benyttet til analyse av total antioksidantkapasitet i butareekstraktet og som en del i vurderingen av blansjeringsmetodene. Antioksidantkapasiteten presenteres som EC50-verdi (g AH/ g DPPH) og lav EC50-verdi korresponderer med høy antioksidantkapasitet (Suriyatem *et al.*, 2017).

Resultatene fra analysen viste signifikante forskjeller i antioksidantkapasiteten hos de ulike blansjeringsmetodene. Den ublansjerte butaren hadde signifikant lavere EC50 verdier sammenlignet med de andre blansjeringsmetodene noe som betyr at den ublansjerte butaren har høyest antioksidantkapasitet. Dette indikerer også at det kreves mindre mengde (g) av antioksidanter fra den ublansjerte butaren for å redusere 50% av 1 gram DPPH. Blansjeringsmetode IX 90 °C, holdetid 180 sekunder viste signifikant høyere EC50-verdier sammenlignet med de andre blansjeringsmetodene. Figur 4. 3 viser at EC50-verdien øker med økende temperatur og lengre holdetid, noe som tyder på at antioksidantkapasiteten ble redusert med økt behandling. Jaiswal, Gupta og Abu-Ghannam (2012) rapporterte at høye blansjerings temperaturer påvirker evnen i å fjerne H₂O₂ i større grad, sammenlignet med lavere temperaturer noe som understøtter denne observasjonen.

Studier viser til dels motstridende resultater når det kommer til effekten blansjering har på den totale antioksidantkapasiteten. Noen rapporter viser en økning i antioksidantkapasitet ved bruk av blansjering (Obob, 2005; Kim, Kim og Yoon, 2013), og andre viser det motsatte (Amin og Lee, 2005; Abu-Ghannam og Jaiswal, 2015; Jaiswal, Gupta og Abu-Ghannam, 2012; Heraz-Ramírez *et al.*, 2012). Det er kjent at blansjering påvirker de kjemiske komponentene ulikt basert på hvor komponentene befinner seg i plantestrukturen (Huang *et al.*, 2016). På bakgrunn av de motstridende funnene ved bruk av blansjering, kan det tyde på at komponentene som er ansvarlig for den antioksidative effekten påvirkes ulikt av temperaturbehandlingen de utsettes for. Dette må tas hensyn til hvis blansjering skal vurderes som en forbehandling. Sett bort i fra at fucoxanthininnholdet viste høyest utbytte ved 70 °C, kan det tyde på at blansjeringen hadde en effekt på antioksidantene som videre kan forklare at antioksidantkapasiteten er høyest for ublansjert butare.

Antioksidantkapasiteten utarbeidet i denne oppgaven viste høyere EC50-verdier, og dermed lavere antioksidantkapasitet, sammenlignet med resultatene fra litteraturstudiet (tabell 2. 3). På samme måte som for total polyfenolinnhold og fucoxanthin ble det benyttet ulike forbehandling og ekstraksjonsmetoder (tabell V1. 3, vedlegg 1). Blant annet benyttet acetone, diklormetan, metanol og etanol som løsemidler i tillaging av butarekstraktet som videre benyttes i DPPH-analysen. I følge Boi, Cuong og Vinh (2017) er etanol det beste løsemiddelet når det kommer til ekstraksjon av antioksidative komponenter, som også er løsemiddelet som ble benyttet i denne oppgaven. Siden antioksidantkapasiteten var betydelig lavere sammenlignet med de rapporterte antioksidantkapasitetene i litteraturstudien, ser det ut til å være årsaker enn bruk av løsemiddel som fører til den lave antioksidantkapasiteten til butaren. I tillegg ble metoden for kvantifisering av den totale antioksidantkapasiteten utført på ulike måter. Metoden som ble benyttet for DPPH (Sánchez-Moreno, Larrauri og Saura-Calixto, 1998) er i utgangspunktet tilpasset bær og har anbefalt konsentrasjon på DPPH løsningen til å være 0,2 mg/mL, som ikke samsvarer med metodene som ble benyttet i de andre rapportene (tabell V1. 3, vedlegg 1). Videre viste blankprøvene og prøvene absorbansverdier på henholdsvis 2,0 og 0,5 – 2,5, noe som indikerer at mesteparten av lyset ikke trenger gjennom prøven. Absorbansverdier bør være mellom 0,1 og 0,8 for troverdige resultater og løsninger med høyere konsentrasjoner gir høyere måleusikkerhet (Wenzel, 2019). Ulike prosedyrer for tillaging av butarekstrakt samt analyse av antioksidantkapasitet gjør sammenligning av resultatene vanskelig da mange faktorer kan påvirke. I tillegg er det viktig å nevne at selve DPPH-metoden i seg selv er en noe omdiskutert metode når det kommer til måling av

antioksidantkapasitet (Huang, Ou og Prior, 2005). En antioksidant, eller hvilket som helst molekyl med en svak X-H binding reagerer med det fargede og høyst persistente radikalet DPPH. Siden EC50-verdien avhenger av reaksjonstiden, gir ikke resultatet fullstendig informasjon til den faktiske reaktiviteten til antioksidanten når den vurderes alene (Amorati og Valgimigli, 2015). Yamaguchi *et al.* (1998) anbefaler ikke bruk av DPPH-metoden ved undersøkelse av fargede matvarer da pigmentene i ekstraktet kan interferere. På bakgrunn av dette blir det vanskelig å avgjøre troverdigheten til resultatene da butarekstraktet som ble benyttet til analyse av antioksidantkapasiteten hadde en sterk brungul farge.

Siden florotanniner og fucoxanthin har antioksidative egenskaper, kan de ulike faktorene som påvirker innholdet av florotanniner og fucoxanthin ha en innvirkning på antioksidantkapasiteten. Kopperud (2018) og Skadal (2018) har begge høstet butare fra Trondheim i mai, 2017 og butaren benyttet i denne oppgaven ble høstet i Trondheim i mai, 2019. Antioksidantkapasiteten i de to nevnte rapportene er derimot en god del høyere sammenlignet med antioksidantkapasitet opparbeidet i denne oppgaven. Dette gjelder også total polyfenolinnhold, hvor Kopperud (2018) har høyere verdier. På denne måten ser det ut til at lokalisasjon og innhøstingstid ikke har en direkte sammenheng med antioksidantkapasiteten og total polyfenolinnhold. De store ulikhetene kan derimot forklares med individuelle forskjeller og vær-situasjonen det året taren ble høstet, noe som er antydning tidligere.

På bakgrunn av de antioksidative egenskapene til de bioaktive komponentene var det forventet å observere en korrelasjon mellom total polyfenolinnhold, fucoxanthininnhold og antioksidantkapasiteten i butare. Resultatene viste derimot ingen signifikant sammenheng mellom antioksidantkapasiteten og total polyfenolinnhold, og mellom antioksidantkapasiteten og fucoxanthin (figur 4. 4). En av årsakene kan være at DPPH metoden analyserer den totale antioksidantkapasiteten til selve ekstraktet. Til sammenligning analyserer Folin-Ciocalteu metoden kun total polyfenolinnhold, og HPLC kvantifiserer kun fucoxanthin. Det er kjent at butaren inneholder flere komponenter med antioksidative egenskaper, slik at disse komponentene kan bidra til at det ikke observeres en korrelasjon. Samtidig har butaren gjennomgått en rekke forbehandlinger, inkludert blansjering og frysetørking. Florotanniner er svært ustabile og omdannes raskt til ulike reaksjonsprodukter (Kirke *et al.*, 2017; Cheynier, 2005). Enzymatisk oksidasjon blir ansett som den viktigste biokjemiske prosessen som inntreffer etter celledød på algen, og det kan tenkes at den antioksidative virkningen hos polyfenolene er noe redusert selv om de detekteres som polyfenoler via Folin-Ciocalteu metoden (Cheynier, 2005). I tillegg til å være ustabile viser florotanniner dårlig holdbarhet over

tid. (Kirke *et al.*, 2017). På grunn av ustabilitet og kort holdbarhet ble det besluttet å lage nye ekstrakter i forkant av hvert forsøk. Med de forskjellene som observeres i total polyfenol, kan avgjørelsen om å lage nye ekstrakter for hvert forsøk bidra til at korrelasjonen mellom total polyfenolinnhold og antioksidantkapasitet er fraværende.

Det er også verdt å bemerke seg at fucoxanthininnholdet opparbeidet i denne oppgaven var høyt, og en god del høyere sammenlignet med tidligere rapporter. Videre viste total polyfenolinnhold og den totale antioksidantkapasiteten lavere resultater. Av den grunn skulle man forvente at det høye fucoxanthininnholdet ga utslag på den totale antioksidantkapasitet. Da dette ikke var tilfellet, ser det ut til at fucoxanthin hadde en mindre rolle i antioksidantkapasiteten, sammenlignet med polyfenoler.

5.1.4 Valg av blansjeringsmetode

Basert på resultatene fra total polyfenolinnhold, fucoxanthininnhold og butarens antioksidantkapasitet var det ingen av blansjeringsmetodene som utmerket seg. På bakgrunn av høye standardfeil for total polyfenolinnhold og antioksidantkapasitet ble det dermed besluttet å velge en blansjeringsmetode som ga lav standardfeil og det ble bestemt å fortsette med blansjeringsmetode IX; 90 °C i 180 sekunder.

5.2 Butareabsorbentens effekt på bakterievekst

Mikrofloraen i kaldtvannsfisk er hovedsakelig dominert av psykrotrofiske gram-negative stavbakterier. På bakgrunn av at *Shewanella*, *Pseudomonas*, *B. thermosphacta* og *P. phosphoreum* og melkesyrebakterier er blant de mest dominerende spesifikke kvalitetsforringelses organismene ble det besluttet å undersøke butareabsorbentens effekt på aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier. I tillegg ble absorbentens effekt på den ikke-patogene bakterien *L. innocua* undersøkt, som på bakgrunn av tilnærmet lik gensekvens kan benyttes i evaluering av den patogene bakterien *L. monocytogenes*.

5.2.1 Tillaging av butareabsorbenter

Basert på resultatene fra blansjeringsforsøket ble det besluttet å lage ekstrakt fra butare blansjert i 90 °C i 180 sekunder. Ekstraktet ble laget ved bruk av samme metode som for blansjeringsforsøket med unntak av homogenisatoren (polytron). Det ble også benyttet en noe lavere omdreining per minutt og lengre homogeniseringstid som kan ha bidratt til forskjeller i den kjemiske komposisjonen til ekstraktene. Butareekstraktet inneholder en god del vann, og det var essensielt å tørke butareabsorbentene på en skånsom måte for å unngå tap av viktige komponenter, og det ble besluttet å frysetørke absorbentene. Da det ikke eksisterer litteratur

angående den faktiske effekten behandlingen har på absorbenter, samt tap av og påvirkning på de bioaktive komponentene er det vanskelig å vite ettervirkningen av denne avgjørelsen.

5.2.2 Butareabsorbentens effekt på *Listeria innocua*, aerobe kimtall, *Pseudomonas* og melkesyrebakterier

Spesifikke kvalitetsforringelses organismer som er blitt funnet i laks inkluderer blant annet *Shewanella* spp., *Pseudomonas* spp. (Gram og Huss, 1996), *B. thermosphacta* (Joffraud *et al.*, 2001), *P. phosphoreum* (Macé *et al.*, 2013), *Lactobacillus* spp. (Olofsson, Ahrné og Molin, 2007) og *Lactococcus piscium* (Macé *et al.*, 2012). I tillegg knyttes den patogene bakterien *L. monocytogenes* til flere matbårne utbrudd (Farber og Peterkin, 1991) og patogenet har flere ganger blitt isolert fra rå laks (Mędrala *et al.*, 2003; Di Ciccio *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Listeriose er en bakteriell, næringsmiddelbåren sykdom forårsaket av bakterien *L. monocytogenes*, og for gravide og personer med nedsatt immunforsvar kan sykdommen gi alvorlige konsekvenser (Lassen, 1999).

Brunalger har ved flere anledninger vist antimikrobiell effekt mot flere patogener og bakterier ansvarlig for forringelse. Tabell 2. 1 viser en oversikt over ulike brunalgearter som er påvist å ha inhiberende effekt mot flere bakterier. Artsspekteret over de ulike brunalgene er stort, og graden av inhibisjon (tabell VI. 1, vedlegg 1) viser gode muligheter til bruk av brunalger som ingrediens i aktiv emballasje, for økt holdbarhet og mattrygghet. Lee *et al.* (2014), Gupta, Rajauria og Abu-Ghannam (2010), Cox, Abu-Ghannam og Gupta (2010), Gupta *et al.* (2010) og Nshimiyumukiza *et al.* (2015) har alle påvist inhiberende effekt på *L. monocytogenes* ved bruk av brunalger. Lee *et al.* (2014) rapporterte «sterk antimikrobiell aktivitet» fra brunalgen *Myagropis myagroides* mot *L. monocytogenes* med en minst hemmende konsentrasjon (MIC) på 0,063 mg/mL (Nshimiyumukiza *et al.*, 2015). Cox, Abu-Ghannam og Gupta (2010) oppnådde en 100 % inhibisjon av *L. monocytogenes* ved bruk av brunalgene *Laminara digitata* og *Himanthalia elongata* og Kopperud (2018) viste antydning til effekt på *L. innocua* ved bruk av butare (tabell VI. 1, vedlegg 1). Resultater fra litteraturstudiet viste at brunalger har effekt både mot gram negative og gram positive bakterier. Blant annet rapporterte Wu *et al.* (2016) og Manivannan *et al.* (2011) at brunalgene *Hizikia Fusiformis* og *Padina gymispora* har antimikrobiell effekt mot *Shewanella* spp., med en inhibisjonssone på henholdsvis 7-11 mm og 11.33 ± 0.51 mm, som ifølge Wu *et al.* (2016) og Akremi *et al.* (2017) tilsvarer svak til moderat antimikrobiell effekt. Brunalgen *Ascophyllum nodosum* har også vist antimikrobiell effekt på bakterien *B. thermosphacta* med en antimikrobiell inhibisjon på $30,9 \pm 12.8$ % (Boisvert *et al.*, 2015). Det ble funnet lite litteratur knyttet til brunalgens antimikrobielle effekt på *P.*

phosphoreum og melkesyrebakterier, men Tabasco *et al.* (2011) observerte at polyfenoler ekstrahert fra druefrø hadde en inhiberende effekt på flere melkesyrebakterier.

Ved evaluering av butareabsorbentens effekt på *L. innocua* ble det ikke observert signifikante forskjeller mellom laks emballert med butareabsorbent og laks emballert med standard absorbent. En viktig observasjon ved undersøkelse av butarens antimikrobielle effekt på *L. innocua* viser at veksten av *L. innocua* holder seg stabil gjennom hele studiet (figur 4. 5). Dette gjelder for alle variantene, med og uten butareabsorbent som tilsier at systemet og betingelsene som er satt hverken støtter eller hemmer vekst av *L. innocua*. Bruk av modifisert atmosfære med CO₂ har vist å forlenge lag-fasen til *L. monocytogenes* (Pothuri, Marshall og McMillin, 1996) og utsetter veksten, men modifisert atmosfære sammen med kjølelagring er ikke tilstrekkelig til å kontrollere vekst av bakterien (Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002; Nosedá *et al.*, 2014). Forlenging av lagfase og utsettelse av vekst ser derimot ut til å kun ha effekt ved høye CO₂-nivåer (Nosedá *et al.*, 2014). En kombinasjon av den modifiserte atmosfæren sammen med stress og mulig utkonkurrering fra andre bakterier kan bidra til at veksten har holdt seg stabil. Det ble observert en signifikant forskjell mellom laks inokulert på overside og underside hvor begge variantene ble emballert med butareabsorbent (figur 4. 6). Laks inokulert med *L. innocua* på overside viste signifikant lavere bakterievekst sammenlignet med laks inokulert på underside. Det ble observert en reduksjon av CO₂ i pakken gjennom lagringsforsøket (tabell V6. 1, vedlegg 6). Denne observasjonen relateres til at CO₂ løses i vannet i laksefiletene, men også på grunn av pakkens permeabilitet (Fernandez, Aspe og Roeckel, 2009). Likevel ble det observert en CO₂ konsentrasjon på 50 % ved slutten av lagringsstudiet, og siden butareabsorbenten ikke viser effekt på bakterieveksten, kan den observerte forskjellen mellom LO og LU skyldes at LO er mer i kontakt med den CO₂ berikede atmosfæren.

Aerobe kimtall omfatter flere bakterier, og siden mikrobiotaen på laksen hovedsakelig bestemmes av miljøet den lever og blir fanget i, kan oppvekst på Long & Hammer-agar innebære et stort spekter av ulike bakterier. Hovedsakelig domineres mikrobiotaen på laks fanget i kaldt vann av *Shewanella* og *Pseudomonas*, men ved redusert oksygen og forhøyet CO₂ dominerer hovedsakelig melkesyrebakterier, *B. thermosphacta* og *P. phosphoreum*. Det ble ikke observert vekst av *Pseudomonas*, som effektivt inhiberes av CO₂ (de la Hoz *et al.*, 2000) som understøtter observasjonen. Ved undersøkelse av butareabsorbentens effekt på aerobe kimtall ble det ikke observert signifikante forskjeller for laks emballert med butareabsorbent og med standard absorbent. Grenseverdien for mikrobiologisk aksept hos forbrukere er 6 log

kde/g. På uttaksdag 21 var det den lavest detekterte bakteriekonsentrasjonen på 5,94 log kde/g (LU) og den høyeste 6,83 log kde/g (NMA) som er over grenseverdien for forbrukeraksept. Fernandez, Aspe og Roeckel (2009) utførte en lagringsstudie hvor laks ble pakket i modifisert atmosfære (60% O₂: 40% N₂), og den aerobe mesofile bakteriekonsentrasjonen ble rapportert å være rundt 6 log kde/g på dag 21 og samsvarer med bakteriekonsentrasjonen for aerobe kimtall opparbeidet i denne oppgaven.

Ved undersøkelse av butareabsorbentens effekt på melkesyrebakterier viste naturell laks med butareabsorbent signifikant lavere bakterievekst enn naturell laks med standard absorbent. Laksefiletene som ble inokulert med *L. innocua* (LO, LOK, LU og LUK) viste derimot en relativt uendret bakteriekonsentrasjon gjennom lagringsstudiet på MRS-agar (figur 4. 10). Vekstkurven er noe atypisk og ser mer ut til å ligne vekstkurven som ble observert for kvantifisering av *L. innocua* på Brilliance Listeria agar (figur 4. 5). På bakgrunn av denne observasjonen ble referansestammen til *L. innocua* dyrket opp på MRS-agar som videre ga bakterievekst. Det kan tyde på at den atypiske vekstkurven for de inokulerte variantene viste vekst av *L. innocua* og ikke melkesyrebakterier.

Sett bort ifra den antimikrobielle effekten som ble observert for melkesyrebakterier, kan det tenkes at den ikke eksisterende effekten på *L. innocua* og aerobe kimtall skyldes lavt innhold av polyfenoler i ekstraktet som ble benyttet. Som tidligere nevnt er det hovedsakelig florotanniner som er ansvarlig for den antimikrobielle aktiviteten til brunalger, og i det innledende forsøket ble det konstatert at innhold av florotanniner var betraktelig lavere sammenlignet med hva som er blitt rapportert tidligere. I tillegg er det viktig å påpeke at hvilke florotanniner som er til stede varierer fra brunalgeart til brunalgeart. Per dags dato er det ikke karakterisert hvilke typer florotanniner som finnes i butare, men Siahaan, Cepas og Soto (2018) rapporterte at Eckol bare er funnet i familien *Lessoniaceae* og *Alariaeae*, hvor sistnevnte huser butare. Siden det er de fenolske aromatiske ringene og OH-gruppene til floriglucinolenheten som binder seg til bakterieproteinene, vil for eksempel Eckol som er et lite molekyl, bidra mindre sammenlignet med et større florotanninmolekyl med flere fenolske ringer og OH-grupper. Selv om florotanniner inndeles i ulike grupper basert på binding, er den overordnede strukturen relativt lik og en kan anta at den antimikrobielle effekten påvirkes i større grad av konsentrasjonen av polyfenoler og ikke struktur. Polyfenoler er også flyktige organiske komponenter (Shim, 2012) og det kan tenkes at det allerede lave innholdet av florotanniner fra ekstraktet ble redusert under tilsetning i absorbentene. Det ble ikke undersøkt total polyfenolinnhold i butareabsorbentene, men utfra resultatene kan dette være en av årsakene til

den lave effekten på bakteriekonsentrasjonen til *L. innocua* og aerobe kimtall. Da butareabsorbenten hadde ulik effekt på melkesyrebakterier sammenlignet med aerobe kimtall og *L. innocua*, ser det ut til at det er andre faktorer enn florotanniner som gir den antimikrobielle effekten på melkesyrebakterier som observeres i naturell laks med butareabsorbent (NMA).

Resultatene fra litteraturstudiet (tabell 2. 1) indikerer en forventet effekt på bakterieveksten til aerobe kimtall og *L. innocua*. Det er derimot verdt å nevne at flere av de rapporterte tilfellene i tabell 2. 1 undersøkte den antimikrobielle effekten ved bruk av agar disc-diffusion. Metoden går ut på at agarplater inokuleres med et standardisert inokulum av en testbakterie og et filterpapir med den antimikrobielle komponenten i ønsket konsentrasjon plasseres på overflaten til agaren. Komponentene diffunderer i agaren og forhindrer og hemmer vekst av mikroorganismen, hvoretter diameteren på den hemmende vekstsonen måles (Balouiri, Sadiki og Ibsouda, 2016). I tillegg brukes det ulike konsentrasjoner og mengder på brunalgeekstraktene for å oppnå effekt. Agar disc-diffusion ble ikke benyttet i denne oppgaven, hvor den antimikrobielle effekten ble vurdert opp mot hemming av bakterievekst i en lagringsstudie. På bakgrunn av ulik fremgangsmåte i evaluering av den antimikrobielle effekten, påvirker dette evnen til å sammenligne resultatene. Konsentrasjonen på ekstraktet benyttet i denne oppgaven var $105,91 \pm 0,15$ mg /mL og er en god del høyere sammenlignet med konsentrasjonen til brunalgeekstraktene som rapporteres i litteraturstudiet (tabell V1.1, vedlegg 1), noe som igjen tyder på at den antimikrobielle effekten til ekstraktet er relativt begrenset.

Det ble ikke utført sekvensering etterfulgt av lagringsforsøket, og en kan dermed ikke vite hvilke aerobe bakterier som vokste på Long & Hammer agar. På bakgrunn av at *Shewanella* og *Pseudomonas* begge inhiberes av forhøyet CO₂, kan en anta at bakterieveksten hovedsakelig domineres av *B. thermosphacta* og *P. phosphoreum*. Kopperud (2018) observerte ingen antimikrobiell effekt på *B. thermosphacta* og *P. phosphoreum* ved bruk av butareekstrakt. Samtidig som det totale polyfenolinnholdet viser høyere konsentrasjoner. Hvis det er slik at den dominerende bakterien er *B. thermosphacta* og *P. phosphoreum*, kan den fraværende effekten som observeres i figurene 4. 7 – 4. 9 skyldes at florotanniner fra butaren ikke inhiberer vekst av disse bakteriene uavhengig av konsentrasjon på polyfenolene.

Butare er rik på natrium og kalium, som gjør at den er blitt ansett som et god salterstatter i matindustrien (Stévant *et al.*, 2017). Butaren ble ikke skyldt i vann før blansjering og en kan anta at butaren inneholdt en god del salt på overflaten som stammer fra havet. *L. innocua* på

lik linje med *L. monocytogenes* har muligheten til å tilpasse seg og overleve ekstreme miljø som for eksempel høye saltkonsentrasjoner (10 % NaCl) (Buchrieser *et al.*, 2006). *B. thermosphacta* og *P. phosphoreum* har høy salttoleranse (Stanborough *et al.*, 2017; Waters og Lloyd, 1985). Når det kommer til salttoleranse hos melkesyrebakterier, varierer dette mellom slektene, men også mellom artene. Macé *et al.* (2013) observerte vekst av *Lactobacillus* i rå laks. Mauguin og Novel (1994) har isolert *Lactococcus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* og *Cornobacterium* fra sjømat. Narvhus og Axelsson (2003) rapporterte melkesyrebakterienes ulike toleranse mot salt. Resultatene fra rapporten viser at *Lactococcus* ikke vokste ved noen av de utprøvde saltkonsentrasjonene (6,5 og 18 % NaCl). Videre viser resultatene at artene innad i slektene *Lactobacillus* og *Leuconostoc* responderer ulikt ved 6,5 % NaCl. Det ble ikke utført saltanalyse på butaren som ble benyttet i forsøket, men det er tidligere rapportert at makroalger inneholder rundt 3% NaCl (Miura *et al.*, 2014). Etter frysetørking vil den tørkede butaren inneholde rundt 30 % NaCl (Hagen, Finnseth og Sørbo, 2019), og etter tillaging av butarekstrakt (1:9) vil saltkonsentrasjonen i ekstraktet være tilbake til rundt 3 % igjen. Det ble ikke utført sekvensering på bakteriene som vokste på Long & Hammer og MRS, som gjør det vanskelig å vurdere hvilke bakterier som faktisk vokser på laksefiletene, og dermed hvordan de ulike bakteriene responderer på salt. Basert på Macé *et al.* (2013) og Mauguin og Novel (1994) sine funn i kombinasjon med Narvhus og Axelsson (2003) sin karakterisering av melkesyrebakterienes salttoleranse, kan det tenkes at effekten av saltet i butareabsorbenten er det som forårsaker den observerte reduksjonen i melkesyrebakterier.

5.3 Videre arbeid

Bruk av bioaktive komponenter fra brunalger har et stort potensial i sjømatindustrien, men manglende informasjon og forskning ser ut til å være en pådrivende faktor i den begrensede bruken. For kommersialisering av bioaktive absorbenter kreves mer forskning rundt total polyfenolinnhold, fucoxanthininnhold og antioksidantkapasitet i selve absorbenten etter tilsetning av ekstraktet. Da resultatene opparbeidet i denne oppgaven gir uttrykk for å være lokalisasjon- og sesongavhengig blir det viktig å finne optimal innhøstingstid og -lokalisasjon som gir høyt utbytte av bioaktive komponenter.

Videre, hvis bioaktive absorbenter skal kommersialiseres trengs det mer forskning rundt total polyfenolinnhold, fucoxanthininnhold og antioksidantkapasitet som finnes i selve absorbenten etter tilsetning av ekstraktet. Karakterisering av florotanniner i butare vil bidra en god del i å forstå den antimikrobielle og antioksidative effekten. Det vil også være interessant å undersøke den antimikrobielle og antioksidative effekten absorbenten innehar uten påvirkning fra andre faktorer, som for eksempel bruk av modifisert atmosfære.

Utbruddet av covid-19 i mars 2020 påvirket muligheten til å utføre oppgaven slik den var planlagt, og analyse av ATP nedbrytning, biogene aminer og fargeendring ville ha vært nyttig i vurdering av den totale effekten absorbenten har.

6. Konklusjon

Basert på resultatene konkluderes det med at butareekstrakt tilsatt i en aktiv emballaseløsning ikke kan øke mattryggheten og forlenger ikke holdbarheten til modifisert atmosfærepakket laksefilet.

En optimalisering av blansjeringsmetode skulle gjennomføres, hvor ulike tid og temperaturregimer skulle evalueres basert på minst mulig denaturering av polyfenoler og fucoxanthin, samt butarens antioksidantkapasitet. Basert på resultatene til total polyfenolinnhold, fucoxanthininnhold og antioksidantkapasitet var det ingen av blansjeringsmetodene som utmerket seg. Resultatene viste ingen signifikante forskjeller på total polyfenolinnhold. For fucoxanthin, viste butare blansjert ved 70 °C i 180 sekunder signifikant høyere innhold, og for antioksidantkapasitet viste den ublansjerte butaren høyest antioksidantkapasitet basert på signifikant laveste EC50-verdi.

Videre viste lagringsforsøket at butareabsorbenten hadde en effekt på bakterieveksten til melkesyrebakterier, da naturell laks emballert med butareabsorbent viste signifikant lavere bakterievekst sammenlignet med laks emballert med standard absorbent. For aerobe kimtall og *L. innocua* ble det ikke observert forskjeller i bakterievekst for laksefiletene emballert med butareabsorbent og standard absorbent, og det ble ikke observert vekst av *Pseudomonas*. Etter endt lagringsstudie ble det observert aerobe kimtall med en bakteriekonsentrasjon på over 6 log kde/g som overgår grenseverdien for forbrukeraksept. På bakgrunn av dette konkluderes det med at butareabsorbenten ikke har en hemmende effekt på den mikrobielle forringelsen som oppstår under lagring, og øker dermed ikke holdbarheten. Videre konkluderes det med at butareabsorbenten ikke har effekt på mattryggheten når det gjelder *L. monocytogenes*, da absorbenten ikke viser hemmende effekt på den genetisk liknende ikke-patogene bakterien *L. innocua*.

7. Referanseliste

- Aagard, K. (2011) *Artsmangfoldet i Norge - en kunnskapsoversikt anno 2011*. (Utredning for Artsdatabanken 1/2011). Trondheim: Artsdatabanken.
- Abu-Ghannam, N. og Jaiswal, A. (2015) Blanching as a Treatment Process: Effect on Polyphenols and Antioxidant Capacity of Cabbage, i Preedy, V. (red.) *Processing and impact on active components in food*. London: Elsevier, s. 35-43.
- Abu-Ghannam, N. og Shannon, E. (2018) Seaweed Carotenoid, Fucoxanthin, as Functional Food, i Gupta, V., *et al.* (red.) *Microbial Funtional Foods and Nutraceuticals*. 1. utg. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, s. 39-64.
- Adams, R. og Moss, O. (2000) Microbiology of Primary Food Commodities *Food Microbiology*. Storbritannia: Royal Society of Chemistry, s. 121-160.
- Adedeji, A. *et al.* (2008) Effect of Pretreatments on Drying Characteristics of Okra, *Drying Technology*, 26, s. 1251-1256. doi: 10.1080/07373930802307209.
- Agilent (u.å) *E. coli Cell Culture Concentration from OD600 Calculator*. Tilgjengelig fra: <https://www.chem.agilent.com/store/biocalculators/calcODBacterial.jsp> (Hentet: 29.04 2020).
- Ahn, G.-N. *et al.* (2007) Antioxidant activities of phlorotannins purified from Ecklonia cava on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage, *European Food Research and Technology*, 226, s. 71-79. doi: 10.1007/s00217-006-0510-y.
- Aickin, C. og Thomas, R. (1975) Micro-electrode Measurement of the Internal pH of Crab Muscle Fibres, *The Journal of Physiology*, 252, s. 803-815. doi: 10.1113/jphysiol.1975.sp011171.
- Akreml, N. *et al.* (2017) Phytochemical and in vitro antimicrobial and genotoxic activity in the brown algae Dictyopteris membranacea, *South African Journal of Botany*, 108, s. 308-314. doi: 10.1016/j.sajb.2016.08.009.
- Amin, I. og Lee, W. (2005) Effect on different blanching times on antioxidant properties in selected cruciferous vegetables, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, s. 2314-2320. doi: 10.1002/jsfa.2261.
- Amorati, R. og Valgimigli, L. (2015) Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants, *Free Radical Research*, 49, s. 633-649. doi: 10.3109/10715762.2014.996146.
- Asami, D. *et al.* (2003) Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, s. 1237-1241. doi: 10.1021/jf020635c.
- Ashie, I. *et al.* (1996) Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(1-2), s. 87-121. doi: 10.1080/10408399609527720.
- Balboa, E. *et al.* (2013) In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae, *Food Chemistry*, 138, s. 1764-1785. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.026.
- Baldwin, D. (2011) Sous vide cooking: A review, *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1(2012), s. 15-30. doi: [10.1016/j.ijgfs.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2011.11.002).

- Baloch, A., Buckle, K. og Edwards, R. (1977) Effect of processing variables on the quality of dehydrated carrot II. Leaching losses and stability of carrot during dehydration and storage, *International Journal of Food Science & Technology*, 12, s. 295-307. doi: 10.1111/j.1365-2621.1977.tb00110.x.
- Balouiri, M., Sadiki, M. og Ibsouda, S. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, s. 71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Banaszak, A. *et al.* (1998) Relationship between ultraviolet (UV) radiation and mycosporine-like amino acids (MAAS) in marine Organisms, *Bulletin of Marine Science*, 63, s. 617-628.
- Berg, T., Erikson, U. og Nordtvedt, T. (1997) Rigor Mortis Assessment of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) and Effects of Stress, *Journal of Food Science*, 62(3), s. 439-446. doi: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb04402.x.
- Biji, K. *et al.* (2016) Biogenic amines in seafood: a review, *Journal of Food Science and Technology*, 53, s. 2210-2218. doi: 10.1007/s13197-016-2224-x.
- Blainski, A., Lopes, G. og Palazzo de Mello, J. (2013) Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. , *Molecules*, 18(6), s. 6852-6865. doi: 10.3390/molecules18066852.
- Boi, V., Cuong, D. og Vinh, P. (2017) Effects of extraction conditions over the phlorotannin content and antioxidant activity of extract from brown algae *Sargassum serratum* (Nguyen Huu Dai 2004), *Free Radicals and Antioxidants*, 7, s. 115-122. doi: 10.5530/fra.2017.1.17.
- Boisvert, C. *et al.* (2015) Assessment of the Antioxidant and Antibacterial Activities of Three Species of Edible Seaweeds, *Journal of Food Biochemistry*, 39, s. 377-387. doi: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12146>.
- Boziaris, I. og Parlapini, F. (2017) Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish, i Bevilacqua, A., Corbo, M. og Sinigaglia, M. (red.) *The Microbiological Quality of Food*. Cambridge: Woodhead Publishing, s. 61-98.
- Buchrieser, C. *et al.* (2006) Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35, s. 207-213. doi: 10.1016/S0928-8244(02)00448-0.
- Campbell, S., Bité, J. og BurrIDGE, T. (1999) Seasonal Patterns in the Photosynthetic Capacity, Tissue Pigment and Nutrient Content of Different Developmental Stages of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) in Port Phillip Bay, South-Eastern Australia, *Botanica Marina*, 42, s. 231-241. doi: 10.1515/BOT.1999.027.
- Catarino, M. *et al.* (2019) Optimization of Phlorotannins Extraction from *Fucus vesiculosus* and Evaluation of Their Potential to Prevent Metabolic Disorders, *Marine drugs*, 17, s. 162. doi: 10.3390/md17030162.
- ChemSpider (u.å) *Fucoxanthin* [Kjemisk struktur]. Finnes ved ChemSpider; database over kjemikalier og inneholder informasjon om mer en 63 millioner molekyler fra over 280 datakjemikalier. Tilgjengelig fra: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444651.html> (Hentet: 05.04.20).

- Chen, S., Collins, J. og McCarty, I. (1971) Blanching of white potatoes by microwave energy followed by boiling water, *Journal of Food Science*, 36, s. 742-743. doi: 10.1111/j.1365-2621.1971.tb03293.x.
- Cheyrier, V. (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, s. 223S-229S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.223S.
- Cohen, J. (1977) The Significance of a Product Moment rs *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences (Revised Edition)*. 2. utg. New York: Lawrence Erlbaum Associates, s. 75-107.
- Connan, S., Stiger, V. og Deslandes, E. (2004) Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae, *Botanica Marina*, 47, s. 410-416. doi: 10.1515/BOT.2004.057.
- Cox, S., Abu-Ghannam, N. og Gupta, S. (2010) An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds, *International Food Research Journal*, 17, s. 205-220.
- Creis, E., Gall, E. og Potin, P. (2018) Ubiquitous Phlorotannins Prospect and Perspectives, i Barre, S. og Bates, S. (red.) *Blue Biotechnology Production and Use of Marine Molecules*. Weinheim: Wiley, s. 67-116.
- Dai, J. og Mumper, R. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 15, s. 7313-7352. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- Dalgaard, P. (2000) Fresh and Lightly Preserved Seafood, i Man, C. og Jones, A. (red.) *Shelf Life Evaluation of Foods*. Maryland: Aspen Publication, s. 110-139.
- Dalgaard, P. *et al.* (2003) Importance of Photobacterium phosphoreum in relation to spoilage of modified atmosphere-packed fish products, *Letters in Applied Microbiology*, 24, s. 373-378. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00152.x.
- de la Hoz, L. *et al.* (2000) Use of carbon dioxide enriched atmospheres in the refrigerated storage (2°C) of salmon (*Salmo salar*) steaks, *European Food Research and Technology*, 210(3), s. 179-188. doi: 10.1007/PL00005509.
- Dean, R. og Hurd, C. (2007) Seasonal growth, erosion rates, and nitrogen and photosynthetic ecophysiology of *Undaria pinnatifida* (Heterokontophyta) in southern New Zealand, *Journal of Phycology*, 43, s. 1138-1148. doi: 10.1111/j.1529-8817.2007.00416.x.
- Dhargalkar, V. og Pereira, N. (2005) Seaweed: Promising plant of the millenium, *Science and Culture*, 71, s. 60-66.
- Di Ciccio, P. *et al.* (2012) Longitudinal study on the sources of *Listeria monocytogens* contamination in cold-smoked salmon and its processing environment in Italy, *International Journal of Food Microbiology*, 158, s. 79-84. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.016.
- Eklund, M. *et al.* (1995) Incidence and Sources of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Fishery Products and Processing Plants, *Journal of Food Protection*, 58, s. 502-508. doi: 10.4315/0362-028X-58.5.502.
- Emborg, J. *et al.* (2001) Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C, *Journal of Applied Microbiology*, 92, s. 790-799. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01588.x.

- Fairhead, V. *et al.* (2006) Lack of defence or phlorotannin induction by UV radiation or mesograzers in *Desmarestia anceps* and *D. menziesii* (phaeophyceae), *Journal of Phycology*, 42, s. 1174-1183. doi: 10.1111/j.1529-8817.2006.00283.x.
- Farber, J. (1991) Microbiological Aspects of Modified-Atmosphere Packaging Technology - A Review, *Journal of Food Protection*, 54, s. 58-70. doi: 10.4315/0362-028X-54.1.58.
- Farber, J. og Peterkin, P. (1991) *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen, *American Society for Microbiology, Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55, s. 476-511.
- Fellows, P. (2017) Blanching, i Fellows, P. (red.) *Food Processing Technology; Principles and Practice*. Cambridge: Woodhead Publishing Series s. 525-538.
- Fernandez, K., Aspe, E. og Roeckel, M. (2009) Shelf-life extension on fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging, *Food Control*, 20, s. 1036-1042. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.12.010.
- Feroz, B. (2018) Saponins from Marine Macroalgae: A Review, *Journal of Marine Science: Research & Development*, 8(4). doi: 0.4172/2155-9910.1000255.
- Fiskeridirektoratet (2018) *Hvor stor er oppdrettsnæringen i Norge?* Tilgjengelig fra: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Nyheter/2019/0519/Hvor-stor-er-oppdrettsnaeringen-i-Norge> (Hentet: 11.02 2020).
- Foot, C. og Denny, R. (1968) Chemistry of Singlet Oxygen. VIII. Quenching by β -Carotene., *Journal of the American Chemical Society*, 90, s. 6233-6234. doi: 10.1021/ja01024a061.
- Fredersdorf, J. *et al.* (2009) Interactive effects of radiation, temperature and salinity on different life history stages of the Arctic kelp *Alaria esculenta* (Phaeophyceae), *Oecologia*, 160, s. 483-492. doi: 10.1007/s00442-009-1326-9.
- Fuentes-Amaya, L. *et al.* (2016) Sensory, Microbiological and Chemical Changes in Vacuum-Packaged Blue Spotted Emperor (*Lethrinus* sp), Saddletail Snapper (*Lutjanus malabaricus*), Crimson Snapper (*Lutjanus erythropterus*), Barramundi (*Lates calcarifer*) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets Stored at 4°C, *Food Science and Nutrition*, 4, s. 479-489. doi: 10.1002/fsn3.309.
- Fung, A., Hamid, N. og Lu, J. (2013) Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*, *Food Chemistry*, 136(2), s. 1055-1062. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.024.
- Galatto, M. *et al.* (2012) Evaluation of the Effectiveness of a New Antimicrobial Active Packaging for Fresh Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Shelf Life, *Packaging Technology and Science*, 25(6), s. 363-372. doi: 10.1002/pts.981.
- Gamal, A. (2010) Biological importance of marine algae, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), s. 1-25. doi: 10.1016/j.jsps.2009.
- Gammone, M., Riccioni, G. og D'Orazio, N. (2015) Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effect on Human Health, *Marine drugs*, 13, s. 6226-6246. doi: 10.3390/md13106226.
- Gonçalves, E. *et al.* (2010) Carrot (*Daucus carota* L.) peroxidase inactivation, phenolic content and physical changes kinetics due to blanching, *Journal of Food Engineering*, 97, s. 574-581.

- Goss, R. og Jakob, R. (2010) Regulation and Function of Xanthophyll Cycle-Dependent Photoprotection in Algae, *Photosynthesis Research*, 106, s. 103-122. doi: 10.1007/s11120-010-9536-x.
- Gould, L. *et al.* (2013) Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 1998-2008, *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 62, s. 1-34.
- Gram, L. og Huss, H. (1996) Microbial spoilage of fish and fish products, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 33, s. 121-137. doi: 10.1016/0168-1605(96)01134-8.
- Gram, L. og Dalgaard, P. (2002) Fish spoilage bacteria - problems and solutions, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, s. 262-266. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00309-9.
- Gram, L. (2009) Microbiological Spoilage of Fish and Seafood Products, i Sperber, W. og Doyle, M. (red.) *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Griffin: Springer, s. 87-120.
- Greville, R. (1830) *Algae britannicae, or descriptions of the marine and other inarticulated plants of the British islands, belonging to the order Algae; with plates illustrative of the genera*. Edinburgh: MacLachlan & Stewart.
- Gupta, S. *et al.* (2010) Growth Inhibition of Common Food Spoilage and Pathogenic Microorganisms in the Presence of Brown Seaweed Extracts, *Food and Bioprocess Technology*, 5, s. 1907-1916.
- Gupta, S., Rajauria, G. og Abu-Ghannam, N. (2010) Study of the microbial diversity and antimicrobial properties of Irish edible brown seaweeds, *International Journal of Food Science & Technology*, 45, s. 482-489. doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.02149.x.
- Gupta, S. og Abu-Ghannam, N. (2011) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweed, *Trends in Food Science & Technology*, 22, s. 315-326. doi: 10.1016/j.tifs.2011.03.011.
- Hagen, A., Finnseth, C. og Sørbo, S. (2019) *Tørking av sukkertare (Saccharina latissima) En undersøkelse av hvordan ulike tørkemetoder og forbehandlingsprosesser påvirker tørkekinetikk og kvalitet*. Bacheloroppgave, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
- Halliwell, B. og Gutteridge, J. (2015) *Antioxidants from the diet*. 5. utg. Oxford: Oxford University Press.
- Hayes, J. *et al.* (2010) Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties, *Meat Science*, 84, s. 613-620. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.10.020Get rights and content.
- He, C. *et al.* (2012) Antioxidants: Introduction, i Cirillo, G. og Iemma, F. (red.) *Antioxidant Polymers Synthesis, Properties and Applications*. 1. utg. New Jersey: Wiley, s. 1-22.
- Heraz-Ramírez, M. *et al.* (2012) Effect of Blanching and Drying Temperature on Polyphenolic Compound Stability and Antioxidant Capacity of Apple Pomace, *Food and Bioprocess Technology*, 5, s. 2201-2210. doi: 10.1007/s11947-011-0583-x.
- Holdt, S. og Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation, *Journal of Applied Phycology*, 23, s. 543-597. doi: 10.1007/s10811-010-9632-5.
- Hong, H., Regenstein, J. og Luo, Y. (2017) The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavour of post-mortem fish and shellfish muscle: A review, *Critical*

- Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), s. 1787-1798. doi: 10.1080/10408398.2014.1001489.
- Huang, D., Ou, B. og Prior, R. (2005) The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, s. 1841-1856. doi: 10.1021/jf030723c.
- Huang, Y. *et al.* (2016) *Chemical Changes of Bioactive Phytochemicals during Thermal Processing*. Chicago: Elsevier Inc.
- Hui, Y. *et al.* (2006) Biochemistry of Seafood Processing, i Hui, Y. (red.) *Food Biochemistry and Food Processing*. 1. utg. Oxford: Blackwell Publishing, s. 351-378.
- Huss, H. (1995) Post Mortem Changes in Fish, i Huss, H. (red.) *Quality and Quality changes in fresh fish*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/3/V7180E/V7180E06.htm>.
- IBM (u.å) *GLM Univariate Analysis*. Tilgjengelig fra: https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/no/SSLVMB_24.0.0/spss/base/idh_glu.html (Hentet: 19.03 2020).
- Jacobsen, C. *et al.* (2010) Chemical processes responsible for quality deterioration in fish, i Skibsted, L., Risbo, J. og Andersen, M. (red.) *Chemical deterioration and physical instability in food and beverages*. Cambridge: Woodhead Publishing, s. 439-465.
- Jaiswal, A., Gupta, S. og Abu-Ghannam, N. (2012) Kinetic evaluation of colour, texture, polyphenols and antioxidant capacity of Irish York cabbage after blanching treatment, *Food Chemistry*, 131, s. 63-72. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.032.
- Joffraud, J.-J. *et al.* (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon, *International Journal of Food Microbiology*, 66, s. 175-184. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00532-8.
- Kang, H. *et al.* (2004) Inhibitory Phlorotannins from the Edible Brown Alga *Ecklonia stolonifera* on Total Reactive Oxygen Species (ROS) Generation, *Archives of Pharmacal Research*, 27, s. 194-198. doi: 10.1007/BF02980106.
- Katikou, P., Hughes, S. og Robb, D. (2001) Lipid distribution within Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets *Aquaculture*, 202, s. 89-99. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00562-2.
- Kawee-ai, A., Kuntiya, A. og Kim, S. (2013) Anticholinesterase and Antioxidant Activities of Fucoxanthin Purified from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Natural product communication*, 8, s. 1381-1386.
- Kedare, S. og Singh, R. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48, s. 412-422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- Kim, M., Kim, J. og Yoon, K. (2013) Effect on Blanching on Antioxidant Activity and Total Phenolic Content According to Type of Medicinal Plants, *Food Science and Biotechnology*, 22, s. 817-823. doi: 10.1007/s10068-013-0150-5.
- Kim, S. *et al.* (2012) A potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalgae *Phaeodactylum tricornutum*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, s. 1843-1855. doi: 10.1007/s12010-012-9602-2.
- Kirke, D. *et al.* (2017) The chemical and antioxidant stability of isolated low molecular weight phlorotannins, *Food Chemistry*, 221, s. 1104-1112. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.050.

- Kita, S. *et al.* (2015) Characterization of fucoxanthin aggregates in mesopores of silica gel: Electronic absorption and circular dichroism spectroscopies, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 313, s. 3-8. doi: 10.1016/j.jphotochem.2015.05.009.
- Klemetsen, A. *et al.* (2013) Atlantic salmon *Salmo salar* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories, *Ecology of Freshwater Fish*, s. 1-59. doi: 10.1034/j.1600-0633.2003.00010.x.
- Koivikko, R. *et al.* (2005) Contents of Soluble, Cell-wall-bound and Exuded Phlorotannins in the Brown alga *Fucus vesiculosus*, with Implications on their Ecological functions, *Journal of Chemical ecology*, 31, s. 195-212. doi: 10.1007/s10886-005-0984-2.
- Koluman, A. og Dikici, A. (2012) Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: Status quo and global trends, *Critical Reviews in Microbiology*, 39, s. 57-69. doi: 10.3109/1040841X.2012.691458.
- Kopperud, S. (2018) *Utnyttelse av bioaktive komponenter fra butare (Alaria esculenta) for økt kvalitet i et filetprodukt av Atlantisk laks (Salmo salar L) pakket i modifisert atmosfære.* Masteroppgave, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
- Krasnovsky, A. (1983) Interaction of singlet oxygen with carotenoids: rate constants of physical and chemical quenching, *Biophysics*, 28.
- Krinsky, N. (2006) The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, s. 443-447.
- Kumar, S., Hosokawa, M. og Miyashita, K. (2013) Fucoxanthin: A Marine Carotenoid Exerting Anti-Cancer Effects by Affecting Multiple Mechanisms, *Marine drugs*, 11, s. 5130-5147. doi: 10.3390/md11125130.
- Kumar, Y., Mumtaz, S. og Ahmad, M. (2018) HPLC: Principle and Maintenance with Application, *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, 2(5), s. 1618-1626. doi: 10.31142/ijtsrd17134.
- Lamuela-Raventós, R. (2017) Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity, i Apak, R. (red.) *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons, s. 107-115.
- Landsborough, D. (1851) *A popular history of British sea-weeds, comprising their structure, fructification, specific characters, arrangement, and general distribution, with notices of some of the fresh-water Algae.* 2. utg. London: Reeve and Benham.
- Lassen, J. (1999) *Listeria monocytogenes* - en opportunist med alvorlige hensikter, *Tidsskriftet Den norske legeforening*, 119, s. 354.
- Lee, S.-Y. *et al.* (2014) Antibacterial mechanism of *Myagropis myagroides* extract on *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, 42, s. 23-28. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.01.030.
- Lerfall, J. *et al.* (2018) Freeze-dried *Alaria esculenta* as a bioactive drip absorbent in a modified atmosphere packaged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) product, i NTNU (red.) *48th WEFTA meeting*.
- Li, Y.-X. *et al.* (2011) Phlorotannins as bioactive agents from brown algae, *Process Biochemistry*, 46(12), s. 2219-2224. doi: 10.1016/j.procbio.2011.09.015.
- Li, Y. *et al.* (2009) Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, s. 1963-1973. doi: 10.1016/j.bmc.2009.01.031.

- Li, Y. *et al.* (2017) Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell, *Marine drugs*, 15, s. 49. doi: 10.3390/md15020049.
- Liu, X. (2020) *Extraction and Anti-Bacterial Effects of Edible Brown Algae Extracts*. . Doctor of Philosophy, North Carolina State University.
- Lombrana, J. (2009) Fundamentals and Tendencies in Freeze-Drying of Foods, i Ratti, C. (red.) *Advances in Food Dehydration*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, s. 209-235.
- Macé, S. *et al.* (2012) Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR–TTGE, *Food Microbiology*, 30, s. 164-172. doi: 10.1016/j.fm.2011.10.013.
- Macé, S. *et al.* (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(3), s. 227-238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.013.
- Manchini-Filho, J., Vidal-Novoa, A. og Silva, A. (2013) Antioxidant properties of algal components and fractions, i Domínguez, H. (red.) *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, s. 255-286.
- Manivannan, K. *et al.* (2011) Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, s. 114-120. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60007-5.
- Marabi, A. *et al.* (2006) Kinetics of Solids Leaching During Rehydration of Particulate Dry Vegetables, *Journal of Food Science*, 69, s. 91-96. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb13369.x.
- Matportalen (2019) *Matvaretabellen*. Tilgjengelig fra: <https://www.matvaretabellen.no/> (Hentet: 11.02 2020).
- Mauguin, S. og Novel, G. (1994) Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood, *Journal of Applied Bacteriology*, 76, s. 616-625. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01660.x.
- Mędrala, D. *et al.* (2003) Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period, *Food Microbiology*, 20, s. 715-724. doi: 10.1016/S0740-0020(02)00173-9.
- Mei, J., Ma, X. og Xie, J. (2019) Review on Natural Preservatives for Extending Fish Shelf Life, *Foods*, 8(10), s. 490. doi: 10.3390/foods8100490.
- Mikami, K. og Hosokawa, M. (2013) Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, s. 13763-13781. doi: 10.3390/ijms140713763.
- Miura, T. *et al.* (2014) Evaluation of marine sediments as microbial sources for methane production from brown algae under high salinity, *Bioresource Technology*, 169, s. 362-366. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.013.
- Miyashita, K. *et al.* (2011) The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, s. 1166-1174. doi: 10.1002/jsfa.4353.

- Nagayama, K. *et al.* (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6), s. 889-893. doi: 10.1093/jac/dkf222.
- Nakayama, T., Toyoda, T. og Ooi, A. (1993) Physical Property of Carp Muscle during Rigor Tension Generation, *Fisheries Science*, 60(717-721). doi: 10.2331/fishsci.60.717.
- Narvhus, J. og Axelsson, L. (2003) Lactic Acid Bacteria, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, s. 3465-3472. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00673-8.
- Nayyar, D. (2016) *Refrigerated shelf life evaluation and effects of minimal processing on antioxidant capacity of fresh sea vegetables from New England*. Masteroppgave, The University of Maine
- Nenadis, N. og Tsimodou, M. (2017) DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) radical scavenging mixed-mode colorimetric assay(s), i Apak, R. (red.) *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Resent Trends and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons, s. 141-164.
- Nguyen, M., Arason, S. og Eikevik, T. (2014) Drying of Fish, i Boziaris, I. (red.) *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety*. Chichester: John Wiley & Sons, s. 161-175.
- NHI (2019) *Biogene aminer*. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/sykdommer/allergi/matvareallergi-og-intoleranse-kostrad/biogene-aminer/> (Hentet: 26.03 2020).
- NMKL (2006) Kimtal of spesifikke fordærvelsesbakterier i fisk og fiskevarer *nr. 184*.
- NMKL (2010) Prøveudtagning og forbehandling af levnedsmidler og foderstoffer til kvantitativ mikrobiologisk undersøgelse, i Nr. 91, u. (red.).
- Norges sjømatråd (2019) *Sjømateksport for 99 milliarder i 2018*. Tilgjengelig fra: <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-99-milliarder-i-2018/> (Hentet: 11.02. 2020).
- Noseda, B. *et al.* (2014) Packaging of Fish and Fishery Products, i Boziaris, I. (red.) *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety*. Chichester: John Wiley & Sons, s. 237-261.
- Nshimiyumukiza, O. *et al.* (2015) Synergistic Antibacterial Activity of *Ecklonia cava* (Phaeophyceae: Laminariales) against *Listeria monocytogenes* (Bacillales: Listeriaceae), *Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, s. 1-6.
- Oboh, G. (2005) Effect on blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology*, 38, s. 513-517. doi: 10.1016/j.lwt.2004.07.007.
- Olofsson, T., Ahrné, S. og Molin, G. (2007) The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7°C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique, *Journal of Applied Microbiology*, 103, s. 109-119. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03216.x.
- Oma, I. (2018) *Isolation and Characterisation of Bioactive Compoenents from Saccharina latissima and Alaria esculenta and their Effect on Proliferation and Migration of Intestinal Epithelial Cells (RTgutGC) in vitro*. Master, Norwegian University of Life Science.

- Oren, A. og Gunde-Cimerman, N. (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites, *FEMS Microbiology Letters*, 269, s. 1-10. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00650.x.
- Pangestuti, R. og Siahaan, E. (2018) Seaweed-Derived Carotenoids, i Qin, Y. (red.) *Bioactive Seaweeds for Food Applications*. London: Elsevier, s. 95-107.
- Parys, S. *et al.* (2009) Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae), *European Journal of Phycology*, 44, s. 331-338. doi: 10.1080/09670260802578542.
- Pavia, H. og Toth, G. (2000) Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*, *Hydrobiologia*, 440, s. 299-305. doi: 10.1023/A:1004152001370.
- Pedersen, B. (2018) *Sublimasjon*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/sublimasjon> (Hentet: 10.12 2019).
- Peng, J. *et al.* (2011) Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health, *Marine drugs*, 9, s. 1806-1828. doi: 10.3390/md9101806.
- Pereira, H. *et al.* (2012) Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Macroalgae: Potential for Nutritional and Pharmaceutical Applications, *Marine drugs*, 10, s. 1920-1935. doi: 10.3390/md10091920.
- Pothuri, P., Marshall, D. og McMillin, K. (1996) Combined Effects of Packaging Atmosphere and Lactic Acid on Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* in Crayfish Tail Meat at 4°C, *Journal of Food Protection*, 59, s. 253-256. doi: 10.4315/0362-028X-59.3.253.
- Prasanna, R. *et al.* (2007) Potentials and Applications of Algal Pigments in Biology and Industry, *Acta Botanica Hungarica*, 49, s. 131-156. doi: 10.1556/ABot.49.2007.1-2.14.
- Prester, L. (2011) Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(11), s. 1547-1560. doi: 10.1080/19440049.2011.600728.
- Ragan, M. og Craigie, J. (1976) Physodes and the phenolic compounds of brown algae. Isolation and characterization of phloroglucinol polymers from *Fucus vesiculosus*, *Canadian journal of biochemistry*, 54, s. 66-73. doi: 10.1139/o76-011.
- Ragan, M. og Jensen, A. (1978) Quantitative studies on brown algal phenols. II. Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 34, s. 245-258. doi: 10.1016/S0022-0981(78)80006-9.
- Riccioni, G. *et al.* (2011) Marine Carotenoids and Cardiovascular Risk Markers, *Marine drugs*, 9, s. 1166-1175. doi: 10.3390/md9071166.
- Rocha de Souza, M. *et al.* (2007) Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds, *Journal of Applied Phycology*, 19, s. 153-160. doi: 10.1007/s10811-006-9121-z.
- Roleda, M., Wiencke, C. og Lüder, U. (2006) Impact of ultraviolet radiation on cell structure, UV-absorbing compounds, photosynthesis, DNA damage, and germination in zoospores of Arctic *Saccorhiza dermatodea*, *Journal of Experimental Botany*, 57, s. 3847-3856. doi: 10.1093/jxb/erl154.

- Roleda, M. *et al.* (2019) Variations in polyphenol and heavy metal contents of wild-harvested and cultivated seaweed bulk biomass: Health risk assessment and implication for food applications, *Food Control*, 95, s. 121-134. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.07.031.
- Rørvik, L., Yndestad, M. og Skjerve, E. (1991) Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4 °C, *International Journal of Food Microbiology*, 14, s. 111-118. doi: 10.1016/0168-1605(91)90097-9.
- Sachindra, N. *et al.* (2007) Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Marine Carotenoid Fucoxanthin and Its Metabolites, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), s. 8516-5822. doi: 10.1021/jf071848a.
- Salem, M., Galal, H. og Nasr El-deen, F. (2011) Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt), *African Journal of Microbiology Research*, 5, s. 2160-2167.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. og Saura-Calixto, F. (1998) A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, s. 270-276. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9.
- Schiener, P. *et al.* (2015) The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*, *Journal of Applied Phycology*, 27, s. 363-373. doi: 10.1007/s10811-014-0327-1.
- Schmid, M. og Stengel, D. (2014) Intra-thallus differentiation of fatty acid and pigment profiles in some temperate Fucales and Laminariales, *Journal of Phycology*, 51, s. 25-36. doi: 10.1111/jpy.1226825.
- Severini, C. *et al.* (2003) Prevention of enzymatic browning in sliced potatoes by blanching in boiling saline solutions, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology*, 36, s. 657-665. doi: 10.1016/S0023-6438(03)00085-9.
- Shannon, E. og Abu-Ghannam, N. (2016) Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications, *Marine drugs*, 14(4), s. 81. doi: 10.3390/md14040081.
- Shannon, E. og Abu-Ghannam, N. (2017) Optimisation of fucoxanthin extraction from Irish seaweeds by response surface methodology, *Journal of Applied Phycology*, 29, s. 1027-1036. doi: 10.1007/s10811-016-0983-4.
- Shannon, E. og Abu-Ghannam, N. (2018) Enzymatic extraction of fucoxanthin from brown seaweeds, *International Journal of Food Science & Technology*, 53, s. 2195-2204. doi: 10.1111/ijfs.13808.
- Shibata, T. *et al.* (2008) Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae, *Journal of Applied Phycology*, 20, s. 705-711. doi: 10.1007/s10811-007-9254-8.
- Shim, S. (2012) Comparison of Volatile and Non-volatile Compounds as Antioxidant Indicators of Water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.), *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55, s. 297-302. doi: 10.1007/s13765-012-1124-7.
- Siahaan, Y., Cepas, V. og Soto, S. (2018) Seaweeds: Valuable Ingredients for the Pharmaceutical Industries, i Rompelotto, P. og Trincone, A. (red.) *Grand Challenges in Marine Biotechnology*. Cham: Springer.

- Sies, H. og Stahl, W. (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, s. 1315S-1321S. doi: 10.1093/ajcn/62.6.1315S.
- Singh, I. og Sidana, J. (2013) Phlorotannins, i Domínguez, H. (red.) *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, s. 181-204.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W. og Rosnes, J. (2002) A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activities and safety. , *International Journal of Food Science + Technology*, 37(2), s. 107-127. doi: 10.1046/j.1365-2621.2002.00548.x.
- Skadal, M. (2018) *Antimikrobielle og antioksidative egenskaper ved butare (A. Esculenta), og bruk av butare som absorbent ved modifisert atmosfære pakking (MAP) av atlantisk laks (Salmo salar L.)*. Masteroppgave, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
- Stahl, W. og Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids, *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), s. 345-351. doi: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X.
- Stanborough, T. *et al.* (2017) Insight into the Genome of *Brochothrix thermosphacta*, a Problematic Meat Spoilage Bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, 83, s. 1-20. doi: 10.1128/AEM.02786-16.
- Steinhoff, F. *et al.* (2012) Phlorotannin Production and Lipid Oxidation as a Potential Protective Function Against High Photosynthetically Active and UV Radiation in Gametophytes of *Alaria esculenta* (Alariales, Phaeophyceae), *Photochemistry and Photobiology*, 88(1), s. 46-57. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.01004.x.
- Stévant, P. *et al.* (2015) *Kartlegging av kunnskap for tørking av makroalger*. (Kartlegging av kunnskap for utredning av et pilottørkeanlegg for makroalger i Møre og Romsdal 15-10). Ålesund: Møreforskning (Hentet: 30.04.2020).
- Stévant, P. *et al.* (2017) Nutritional value of the kelps *Alaria esculenta* and *Saccharina latissima* and effects of short-term storage on biomass quality, *Journal of Applied Phycology*, 29, s. 2417-2426. doi: 10.1007/s10811-017-1126-2.
- Suriyatem, R. *et al.* (2017) Predictive mathematical modeling for EC50 calculation of antioxidant activity and antibacterial ability of Thai bee products, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7, s. 122-133. doi: 10.7324/JAPS.2017.70917.
- Swanson, D., Block, R. og Mousa, S. (2012) Omega-3 Fatty Acids EPA og DHA: Health Benefits Throughout Life, *Advances in Nutrition*, 3(1), s. 1-7. doi: 10.3945/an.111.000893.
- Tabasco, R. *et al.* (2011) Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism, *Food Microbiology*, 28, s. 1345-1352. doi: 10.1016/j.fm.2011.06.005.
- Takaichi, S. (2011) Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions, *Marine drugs*, 9, s. 1101-1118. doi: 10.3390/md9061101.
- Terasaki, M. *et al.* (2009) Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents, *Journal of Phycology*, 45, s. 974-980. doi: 10.1111/j.1529-8817.2009.00706.x.

- Tibbetts, S., Milley, J. og Lall, S. (2016) Nutritional quality of some wild and cultivated seaweeds: Nutrient composition, total phenolic content and in vitro digestibility, *Journal of Applied Phycology*, 28, s. 3575-3585. doi: 10.1007/s10811-016-0863-y.
- Tirzitis, G. og Bartosz, G. (2010) Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights, *ACTA ABP Biochimica Polonica*, 57(1), s. 139-142.
- Wang, F. *et al.* (2011) Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Major Foodborne Pathogens in imported Seafood, *Journal of Food Protection*, 74, s. 1451-1461. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-146.
- Wang, T., Jónsdóttir, R. og Ólafsdóttir, G. (2009) Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds, *Food Chemistry*, 116, s. 240-248. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.041.
- Wang, T. *et al.* (2012) Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus vesiculosus*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, s. 5874-5883. doi: 10.1021/jf3003653.
- Wang, Y. *et al.* (2016) Oxidative Stress in Diabetes: Molecular Basis for Diet Supplementation, i Mauricio, D. (red.) *Molecular Nutrition and Diabetes*. London: Academic Press, s. 65-72.
- Waters, P. og Lloyd, D. (1985) Salt, pH and Temperature Dependencies of Growth and Bioluminescence of Three Species of Luminous Bacteria Analysed on Gradient Plates, *Journal of General Microbiology*, 131, s. 2865-2869.
- Wei, Y. *et al.* (2016) Damage to the Membrane Permeability and Cell Death of *Vibrio parahaemolyticus* Caused by Phlorotannins with Low Molecular Weight from *Sargassum thunbergii*, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(3), s. 323-333. doi: 10.1080/10498850.2013.851757.
- Wenzel, T. (2019) *Beer's Law*. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/rj6lnfv> (Hentet: 20.05.2020).
- WHO (u.å) Disease-specific recommendations *Population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases*: World Health Organization. Tilgjengelig fra: https://www.who.int/nutrition/topics/5_population_nutrient/en/index12.html.
- Wijesekara, I. og Kim, S.-K. (2010) Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prosepcts in the Pharmaceutical Industry, *Marine drugs*, 8(4), s. 1080-1093. doi: 10.3390/md8041080.
- Wu, L. og Lin, D. (2019) Molecular Aspects of Carotenoid Metabolizing Enzymes and Implications for Ophthalmology, i Preedy, V. og Watson, R. (red.) *Handbook of Nutrition, Diet, and the Eye*. London: Academic Press, s. 415-429.
- Wu, M.-J. *et al.* (2016) Antibacterial Total Phenolic Compounds from a Brown Alga *Hizikia Fusiformis*, *Environment, energy and earth sciences*, s. 418-425. doi: 10.12783/dtees/sses/icfse2016/10685.
- Yamaguchi, T. *et al.* (1998) HPLV Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, s. 1201-1204. doi: 10.1271/bbb.62.1201.
- Yan, X., Nagata, T. og Fan, X. (1998) Antioxidative activities in some common seaweeds, *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, s. 253-262. doi: 10.1023/A:1008007014659.

- Yildirim, S. *et al.* (2017) Active Packaging Applications for Food, *Comprehensive Reviews in Food and Science and Food Safety*, 17(1), s. 165-199. doi: 10.1111/1541-4337.12322.
- Ytrestøyl, T., Aas, T. og Åsgård, T. (2015) Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway, *Aquaculture*, 448, s. 365-374. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.023.
- Zhang, H. *et al.* (2015) Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, s. 1-10. doi: 10.1155/2015/723515.
- Zubia, M. *et al.* (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some phaeophyta from Brittany coasts, *Food Chemistry*, 116, s. 693-701. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.025.

8. Vedlegg

Vedlegg 1 Resultater fra eksterne rapporter opparbeidet gjennom litteraturstudiet

Tabell VI. 1: Oversikt over rapportert tilfeller hvor ulike brunalge-arter har vist inhiberende effekt på bakterier. Figuren inkluderer observert inhibisjon ved bruk av MIC, % inhibisjon eller hemmingssone. I tillegg rapporteres det benyttede ekstraktets konsentrasjon, innhøsting (lokalisasjon, sesong, år), forbehandlingsmetoder som er benyttet samt benyttede ekstraksjonsmetoder, med tilhørende løsemiddel.

Brunalge	Bakterie	Inhibisjon (MIC/% inhibisjon/sonen)	Konsentrasjon ekstrakt (mg/mL)	Høstet	Forbehandling	Ekstraksjonsmetode	Referanse
<i>Myagropsis myagroides</i>	<i>L. monocytogenes</i>	MIC: 0,063 mg/mL		Korea	Tørket ved romtemperatur, pulverisert	99,9% etanol → fordamping → tilsatt destillert vann og n-hexan (1:1) → Eluering med kloroform	(Lee <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Bacillus subtilis</i>	MIC: 0,13 mg/mL					
<i>Laminara digitata</i>	<i>L. monocytogenes</i>	97,5 ± 2,6 %	60	Irland, september 2008	Pulverisert ved hjelp av flytende nitrogen	Metanol (60%)	(Gupta, Rajauria og Abu-Ghannam, 2010)
<i>Himanthalia elongata</i>		98,7 ± 0,8 %	60				
<i>Laminaria Saccharina</i>		90,4 ± 1,1 %	60				
<i>Laminara digitata</i>		100,00 ± 0,0 %	8				
<i>Laminaria Saccharina</i>		93,49 ± 2,00	8				
<i>Himanthalia elongata</i>		100,00 ± 0,0 %	8				(Cox, Abu-Ghannam og Gupta, 2010)

<i>Himanthalia elongata</i>		100%	6		Ikke nevnt		(Gupta <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ecklonia cava</i>	<i>L. monocytogenes</i>	MIC: 0, 256 mg/mL		Ikke nevnt	Ikke nevnt	Metanol (konsentrasjon ikke nevnt)	(Nshimiyumukiza <i>et al.</i> , 2015)
<i>Alaria esculenta</i>	<i>L. innocua</i>	“Antydning til effekt”	~111	Frøya, mai 2017	Frysetørket, pulverisert med mortel og pistill	Etanol (50%)	(Kopperud, 2018; Lerfall <i>et al.</i> , 2018)
	<i>S. putrefaciens</i>	“Antydning til effekt”	~111				
<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>P. fluorescens</i>	MIC 0,851 mg/mL		Maine	Tørket i rom temperatur → vakuum ovn (50 °C), pulverisert	Etanol (70%)	(Liu, 2020)
	<i>S. putrefaciens</i>	MIC 0,718 mg/mL					
<i>Padina gymnospora</i>	<i>P. aeruginosa</i>	MIC: 10 mg/mL		Egypt, juni 2009	Luft tørket, pulverisert	Etyl acetat (konsentrasjon ikke nevnt)	(Salem, Galal og Nasr El-deen, 2011)
	<i>B. cereus</i>	MIC: 50 mg/mL					
<i>Hizikia Fusiformis</i>	<i>Shewanella</i> spp.	Inhibisjonssone: 7- 11 mm (lav antimikrobiell aktivitet)	10	Kina, mai 2010	Luft tørket, pulverisert	Metanol (konsentrasjon ikke nevnt)	(Wu <i>et al.</i> , 2016)
	<i>B. subtilis</i>	Inhibisjonssone 11-16 mm (høy antimikrobiell aktivitet)	10			Etanol (konsentrasjon ikke nevnt)	
<i>Dictyopteris membranacea</i>	<i>B. subtilis</i>	Inhibisjonssone: 19,66 ± 1,2 mm (sterk antimikrobiell aktivitet)	1	Tunisia, juni 2010	Lufttørket, pulverisert	Etanol (konsentrasjon ikke nevnt)	(Akremi <i>et al.</i> , 2017)
<i>Padina gymnospora</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibisjonssone: 15.33±1.36 mm	Ikke nevnt	India	Lufttørket, pulverisert		(Manivannan <i>et al.</i> , 2011)

	<i>Shewanella spp.</i>	Inhibisjonssone 11.33±0.51 mm	Ikke nevnt			Metanol (konsentrasjon ikke nevnt)	
	<i>Bacillus subtilis</i>	Inhibisjonssone 26.33±1.86 mm	Ikke nevnt				
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Inhibisjonssone 17.00±0.89 mm	Ikke nevnt				
<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	30.9 ± 12.8 %	0,125	Canada	Tørket og pulverisert	Etanol (100%), trykk-væske- ekstraksjon	(Boisvert <i>et al.</i> , 2015)

Tabell VI. 2 Rapportert total polyfenolinnhold i butare med tilhørende innhøsting (lokalisasjon, sesong og år), forbehandlingsmetode og ekstraksjonsmetode samt hvilken analyse og standard benyttet.

Total polyfenolinnhold	Høstet (lokasjon, sesong og år)	Forbehandling	Ekstraksjon	Analyse	Referanse
3,07 ± 0,26 g GAE/ 100 g tørrvekt	Bodø, Trondheim, Frankrike Vår 2015-2016	Frysetørket Pulverisert 0,12 mm	Aceton: vann (80:20)	Folin-Ciocalteu, Gallussyre som standard	(Roleda <i>et al.</i> , 2019)
4,96 ± 0,50 g GAE/ 100g tørrvekt	Bodø, Trondheim, Frankrike Høst 2015-2016				
4,28 ± 0,48 g GAE/ 100g tørrvekt	Bodø, Trondheim, Frankrike Sommer 2015-2016				
1,77 g GAE/ 100g tørrvekt	Canada, april, 2010	Frysetørket, pulverisert 0,8 mm (hammermølle)	Aceton (80%) og saltsyre (1%)	Folin-Ciocalteu Gallussyre som standard	(Tibbetts, Milley og Lall, 2016)
1,57 ± 0,03 g GAE/100 g tørrvekt	Frøya, mai, 2017	Frysetørket, pulverisert (mortel og pistil)	Etanol: vann (30:70)	Folin-Ciocalteu Gallussyre som standard	(Kopperud, 2018)
0,31 ± 0,01 % polyfenoler tørrvekt	Skottland, mars, 2011	Frysetørket, pulverisert <1 mm (kaffekvern)	Acetonitril: vann: maursyre (50:49,8:0,2)	Folin-Ciocalteu Gallussyre som standard	(Schiener <i>et al.</i> , 2015)
1,49 ± 0,04 % polyfenoler tørrvekt	Skottland, mai 2011				
0,81 ± 0,02 % polyfenoler tørrvekt	Skottland, juli 2011				

Tabell VI. 3 Rapportert antioksidantkapasitet hos butare med tilhørende innhøsting (lokalisasjon, sesong og år), forbehandlingsmetode og ekstraksjonsmetode samt hvilken analyse og standard benyttet.

Antioksidantkapasitet (EC50)	Høstet (lokasjon, sesong og år)	Forbehandling	Ekstraksjon	Analyse	Referanse
0,11 mg/mL	Island, mai, 2007	Frysetørket, pulverisert	Aceton (70%) → fordamping → oppløst i vann	DPPH (0,25 mg/mL)	(Wang, Jónsdóttir og Ólafsdóttir, 2009)
6,43 mg/mL	Frankrike, mai, 2007	Frysetørket, pulverisert	Diklormetan: metanol (1:1)	DPPH (0,025 mg/mL)	(Zubia <i>et al.</i> , 2009)
1,09 ± 0,4 mg/mL	USA, april, 2016	Blast freezing, frysetørket og pulverisert	Metanol (60%)	DPPH (0,078 mg/mL)	(Nayyar, 2016)
2,1 ± 0,4 mg/mL		Blansjert, blast freezing, frysetørket og pulverisert			
3,0 ± 0,6 mg/mL		Blansjert, fryst, blast freezing, frysetørket og pulverisert			
4,67 ± 0,06 g AH/ g DPPH	Trondheim, mai, 2017	Frysetørket, pulverisert (mortel og pistil)	Etanol: vann (1:1)	DPPH (0,2 mg/mL)	(Kopperud, 2018)
7,41 ± 0,21 g AH/ g DPPH	Trondheim, mai, 2017	Frysetørket, pulverisert (mortel og pistil)	Metanol: vann (60:40)	DPPH (0,045 mg/mL)	(Skadal, 2018)

Tabell VI. 4 Rapportert fucoxanthininnhold hos butare med tilhørende innhøsting (lokalisasjon, sesong og år), forbehandlingsmetode og ekstraksjonsmetode samt hvilken analyse og standard benyttet.

Fucoxanthin (mg/g)	Høstet (lokasjon, sesong og år)	Forbehandling	Ekstraksjon	Analyse	Referanse
0,870 ± 0,030	Irland, juli, 2014	Frysetørket, pulverisert	Aceton (62,2%)	HPLC Mobilfase: Natriumacetat (20 mM) og metanol (100%)	(Shannon og Abu-Ghannam, 2017)
0,871 ± 0,053	Frankrike, mai, 2016	Frysetørket, pulverisert 250 µm (knivmølle)	Etanol: vann (60:40)	HPLC Mobilfase: Acetonitril, metanol og vann	(Stévant <i>et al.</i> , 2017)
0,822	Irland, juli, 2015	Inkubatorovn, pulverisert 1.0 ± 0.2 mm (mekanisk mortel)	Natriumacetat og enzymet viscozyme	HPLC Mobilfase: Acetonitrill: metanol: vann (75:15:10) og 0.1% ammonium acetat	(Shannon og Abu-Ghannam, 2018)
0,48 ± 0,03	Irland, mai, 2013	Frysetørket, pulverisert	Aceton (90%)	HPLC Mobilfase: Metanol: ammoniumacetat (80:20)	(Schmid og Stengel, 2014)
22,97 ± 0,35	Trondheim, mai, 2017	Frysetørket, pulverisert (mortel og pistil)	Etanol: vann (50:50)	HPLC Mobilfase MeOH: aceton (60:40) og aceton: vann (60:40)	(Kopperud, 2018)

Vedlegg 2 Beregning av estimert gallussyre ekvivalenter per 100 gram tørrvekt

For beregning av estimert gram gallussyre ekvivalenter per 100 gram tørrvekt, beregnes i første omgang gallussyre ekvivalenter (GAE). Til beregning av GAE multipliseres stigningstallet til standardkurven, med absorbansen til prøven (ligning 3.1).

$$GAE = Stigningstallet * Abs \quad (3.1)$$

Videre beregnes GAE pr. liter ekstrakt ved å multiplisere GAE med forholdet mellom totalvolum i målekolben og mengden ekstrakt tilsatt målekolben (fortynning) (ligning 3.2).

$$GAE \text{ g pr. liter ekstrakt} = GAE * Fortynning \quad (3.2)$$

Til slutt beregnes GAE/100 g råstoff ved å dividere GAE (mg/l) med konsentrasjonen til ekstraktet (g/l) (ligning 3.3).

$$\frac{GAE}{100g} \text{ råstoff} = \frac{GAE \frac{g}{l}}{Konsentrasjon \text{ i ekstraktet} \frac{g}{l}} * 100 \quad (3.3)$$

Vedlegg 3 Tillaging av Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7,4) og DPPH-løsningen (500 μ M)

For tillaging av Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7,4) ble 500 mL Tris (0,2 M) og 1414 mL HCl (0,2 M) blandet og fortynnet til 1 liter med ionebyttet vann. 0,2 M Tris ble laget ved å fortynne 24,2 g Tris (hydroksymetyl) aminometan (VWR Chemicals, CAS: 77-86-1) til 1 liter med ionebyttet vann. 0,2 M HCl ble laget ved å fortynne 17,2 mL konsentrert HCL (Hydrochloric acid 1 mol/L, VWR Chemicals, CAS: 7647-01-0) til 1 liter med ionebyttet vann. DPPH-løsningen (500 μ M) ble laget ved å blande 10 mg DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, free radical 96 %, Aldrich, CAS: 1898-66-4) med 50 mL etanol (Ethanol 96 % vol, VWR Chemicals, CAS: 64-17-5).

Vedlegg 4 Resultater fra optimalisering av blansjeringsmetoder

Tabell V4. 1 Temperatur og holdetid for de ulike blansjeringsmetodene med tilhørende total polyfenolinnhold (g GAE/ 100g tørrvekt). Opphevede bokstaver indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$

Blansjeringsmetode		Total polyfenolinnhold
Temperatur (°C)	Holdetid (sekunder)	g GAE/ 100g tørrvekt
Ublansjert		0,32 ± 0,05 ^a
60	90	0,43 ± 0,12 ^a
70	90	0,35 ± 0,06 ^a
80	90	0,22 ± 0,02 ^a
90	90	0,23 ± 0,05 ^a
60	180	0,25 ± 0,03 ^a
70	180	0,26 ± 0,02 ^a
80	180	0,25 ± 0,06 ^a
90	180	0,23 ± 0,01 ^a
90	900	0,16 ± 0,00 ^a

Tabell V4. 2 Temperatur og holdetid for blansjeringsmetodene med tilhørende innhold av fucoxanthin. Opphevede bokstaver indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$.

Blansjeringsmetode		Konsentrasjon fucoxanthin
Temperatur (°C)	Holdetid (sekunder)	mg/g
Ublansjert		17,70 ± 1,03 ^b
70	180	29,70 ± 2,78 ^a
90	180	13,98 ± 0,57 ^b

Tabell V4. 3 Temperatur og holdetid for de ulike blansjeringsmetodene med tilhørende antioksidantkapasitet (EC50, g AH/ g DPPH). Opphevede bokstaver indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$

Blansjeringsmetode		EC50
Temperatur (°C)	Holdetid (sekunder)	g AH/ g DPPH
Ublansjert		20,72 ± 3,73 ^c
60	90	31,49 ± 3,73 ^{bc}
70	90	39,63 ± 9,22 ^{abc}
80	90	35,50 ± 6,64 ^{abc}
90	90	45,17 ± 10,47 ^{ab}
60	180	35,91 ± 1,53 ^{abc}
70	180	46,45 ± 5,24 ^{ab}
80	180	43,22 ± 3,85 ^{ab}
90	180	51,43 ± 2,56 ^a

Vedlegg 5 Beregnet bakteriekonsentrasjon log (kde/g) fra lagringsforsøket

Tabell V5. 1 Beregnet bakteriekonsentrasjon log (kde/g) til *Listeria innocua* for de ulike variantene LO, LOK, LU, LUK gjennom lagringsforsøket. Opphevede bokstaver indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$.

Variant	Uttak, Tid (dager)	Bakteriekonsentrasjon log (kde/g)
LO (kontroll)	0	3,31 ± 0,09
LO ^b	3	3,00 ± 0,22
	6	3,21 ± 0,20
	9	3,02 ± 0,14
	12	3,33 ± 0,19
	15	2,85 ± 0,30
	18	3,00 ± 0,35
	21	3,30 ± 0,20
LOK ^{ab}	3	2,69 ± 0,13
	6	3,12 ± 0,10
	9	2,90 ± 0,17
	12	4,27 ± 0,65
	15	2,95 ± 0,05
	18	3,22 ± 0,14
	21	3,17 ± 0,15
LU ^a	3	3,24 ± 0,14
	6	3,21 ± 0,03
	9	3,20 ± 0,09
	12	3,34 ± 0,10
	15	3,36 ± 0,06
	18	3,42 ± 0,12
	21	3,55 ± 0,18
LUK ^{ab}	3	3,20 ± 0,14
	6	3,06 ± 0,18
	9	3,09 ± 0,03
	12	3,15 ± 0,04
	15	3,38 ± 0,10
	18	3,57 ± 0,09
	21	3,27 ± 0,09

Tabell V5. 2 Beregnet bakteriekonsentrasjon log (kde/g) for aerobe kimtall for de ulike variantene LO, LOK, LU, LUK, NMA og NMAK gjennom lagringsforsøket. Opphevede bokstaver indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$.

Variant	Uttak, Tid (dager)	Bakteriekonsentrasjon log (kde/g)
Kontroll (laks inokulert med <i>Listeria innocua</i>)	0	0
LO ^a	3	2,74 ± 1,39
	6	4,09 ± 0,19
	9	5,63 ± 0,17
	12	6,06 ± 0,24
	15	5,92 ± 0,13
	18	6,40 ± 0,07
	21	6,20 ± 0,27
LOK ^a	3	2,30 ± 1,15
	6	4,16 ± 0,14
	9	5,28 ± 0,09
	12	5,97 ± 0,12
	15	6,06 ± 0,02
	18	6,33 ± 0,06
	21	6,34 ± 0,11
LU ^a	3	3,54 ± 0,01
	6	4,76 ± 0,34
	9	5,94 ± 0,28
	12	6,41 ± 0,20
	15	6,27 ± 0,16
	18	6,41 ± 0,15
	21	5,96 ± 0,48
LUK ^a	3	2,51 ± 1,26
	6	4,30 ± 0,18
	9	6,16 ± 0,10
	12	5,98 ± 0,33
	15	6,06 ± 0,09
	18	6,27 ± 0,30
	21	6,18 ± 0,13
Kontroll (naturell laks)	0	0
NMA ^a	3	1,31 ± 1,31
	6	4,89 ± 0,54
	9	6,07 ± 0,07
	12	6,91 ± 0,08
	15	6,55 ± 0,09
	18	6,56 ± 0,08
	21	6,83 ± 0,32
NMAK ^a	3	2,57 ± 1,30
	6	4,77 ± 0,27
	9	6,21 ± 0,48
	12	6,63 ± 0,10
	15	6,61 ± 0,12

	18	6,76 ± 0,16
	21	6,53 ± 0,06

Tabell V5. 3 Beregnet bakteriekonsentrasjon log (kde/g) for melkesyrebakterier for de ulike variantene LO, LOK, LU, LUK, NMA og NMAK gjennom lagringsforsøket. Opphevede bokstaver indikerer statistisk signifikante forskjeller på $\alpha = 0,05$.

Variant	Uttak, Tid (dager)	Bakteriekonsentrasjon log (kde/g)
Kontroll (Laks inokulert med <i>Listeria innocua</i>)	0	4,02 ± 0,14
LO ^a	3	2,92 ± 0,04
	6	3,01 ± 0,23
	9	2,99 ± 0,08
	12	3,03 ± 0,23
	15	3,47 ± 0,38
	18	3,32 ± 0,14
	21	3,46 ± 0,13
LOK ^a	3	2,45 ± 0,23
	6	2,91 ± 0,10
	9	2,77 ± 0,02
	12	2,96 ± 0,11
	15	3,04 ± 0,07
	18	3,78 ± 0,27
	21	3,63 ± 0,04
LU ^a	3	3,14 ± 0,17
	6	2,82 ± 0,05
	9	3,06 ± 0,05
	12	3,35 ± 0,01
	15	3,41 ± 0,04
	18	3,55 ± 0,02
	21	3,73 ± 0,26
LUK ^a	3	3,10 ± 0,05
	6	3,07 ± 0,09
	9	3,16 ± 0,08
	12	3,00 ± 0,15
	15	3,37 ± 0,11
	18	3,79 ± 0,28
	21	3,41 ± 0,12
Kontroll (naturell laks)	0	0
NMA ^c	3	0
	6	0
	9	0
	12	0
	15	1,23 ± 1,23
	18	0
	21	1,14 ± 1,14
NMAK ^b	3	0
	6	0

	9	0
	12	0
	15	0
	18	$2,33 \pm 1,17$
	21	$4,01 \pm 0,47$

Vedlegg 6 Målt CO₂ i frivolum gjennom lagringsstudiet

Tabell V6. 1 Målt % CO₂ nivå i frivolum for de ulike variantene gjennom lagringsstudiet. Tabellen viser gjennomsnitt ± standardavvik

Uttaksdag	% CO ₂					
	NMA	NMAK	LO	LOK	LU	LUK
0						
3	48,1 ± 0,4	47,6 ± 0,3	45,9 ± 0,4	45,1 ± 0,6	46,6 ± 0,3	47,0 ± 0,5
6	45,6 ± 0,3	45,4 ± 0,4	42,3 ± 0,6	41,7 ± 0,3	43,4 ± 0,4	43,5 ± 1,2
9	38,8 ± 0,3	38,6 ± 0,5	36,2 ± 0,3	34,6 ± 3,0	35,3 ± 0,3	36,2 ± 0,1
12	41,3 ± 0,5	42,3 ± 0,4	38,0 ± 1,3	38,1 ± 0,6	39,5 ± 1,8	38,5 ± 1,2
15	42,8 ± 0,8	42,8 ± 0,9	37,3 ± 0,9	37,6 ± 0,5	40,2 ± 0,6	39,3 ± 1,3
18	44,6 ± 0,3	44,8 ± 0,2	41,6 ± 2,3	41,1 ± 0,9	43,9 ± 0,8	42,4 ± 1,0
21	50,6 ± 0,8	51,7 ± 0,4	48,7 ± 0,4	47,9 ± 0,6	49,3 ± 0,3	48,6 ± 0,5

