

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.)

**Markus Lie Skadal**

Mat og teknologi

Innlevert: mai 2018

Hovedveileder: Jørgen Lerfall, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



## Forord

I forbindelse med denne masteroppgaven vil jeg takke førsteamanuensis Jørgen Lerfall (NTNU, Institutt for bioteknologi og matvitenskap) for alt han har hjulpet med som hovedveileder. Jeg vil også takke førsteamanuensis Anita Nordeng Jakobsen (NTNU, Institutt for bioteknologi og matvitenskap) for hennes ekspertise på mikrobiologiske problemstillinger og som biveileder. Som veiledere har de begge hjulpet med planlegging og utførelse ved prosessering av materiale og annet laboratoriearbeid. De har også vært til stor hjelp ved analysering av resultater og skriveprosessen bak denne masteroppgaven.

Jeg vil også takke medstudenter, Anne Marit Holten og Stian Kopperud, samt ingeniør Marit Selbekk Liaklev for hjelp med tekniske oppgaver på laboratoriet.

## Sammendrag

Det ble utført innledende forøk for å undersøke den mikrobiologiske floraen som eksisterer på rå og tørket (usterilisert), samt tørket gammabestrålt (sterilisert) butare. Dette ble undersøkt ved å dyrke prøver av disse algene på åtte ulike medier; Jernagar (total kim), Long and Hammer (total psykrofil flora), MRS (melkesyrebakterier), STAA (*Brochothrix thermosphacta*), *Pseudomonas* agar (*Pseudomonas* spp.), medie for anaerobe sporedannere, petrifilm for *Enterobacteriaceae* og petrifilm for mugg og gjær. Prøvene ble også lagret i modifisert atmosfære (CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>, 60:40) ved 4 °C i inntil 14 dager. Det ble ikke observert signifikant vekst av mikroorganismer på de gammabestrålte algene i dette forsøket. Prøvene som ble dyrket på Jernagar viste størst vekst og disse prøvene viste signifikant ( $\alpha = 0,05$ ) lavere vekst for steriliserte alger i forhold til rå og usterilisert alge.

Målet med denne masteroppgaven var å finne ut om butare hadde potensial for å brukes som absorbent ved lagring av et filetprodukt av atlantisk laks (*Salmo salar* L.). I forbindelse med dette ble det undersøkt hvilken effekt butare hadde, i forhold til en konvensjonell absorbent, på vekst av mikroorganismer på laks. Denne analysen ble gjennomført ved å pakke laks med og uten butare i modifisert atmosfære (CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>, 50:50). Det ble også laget prøver inokulert med *Aeromonas Salmonicida* for å finne ut om butare kunne ha en antimikrobiell effekt på denne bakterien. Alle fire gruppene ble lagret inntil 21 dager ved 4 °C i modifisert atmosfære (CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>, 50:50). Det ble tatt ut prøver på dag 0 og hver påfølgende tredje dag. Prøvene ble analysert for vekst av kolonidannende enheter ved dyrking på tre ulike medier; Jernagar (total kim), stivelse og ampicillin agar (*Aeromonas* spp.) og MRS-medie (melkesyrebakterier). Prøvene med butare som absorbent viste signifikant lavere total kim enn prøvene med konvensjonell absorbent ved dyrking på Jernagar. Særlig ble det funnet en stor forskjell mellom prøvene med og uten butare ved dyrking av de ikke-inokulerte prøvene på Jernagar. For prøvene dyrket på stivelse og ampicillin agar var det kun vekst på de inokulerte prøvene og inokulerte prøver med alge hadde signifikant lavere vekst enn inokulerte prøver uten alge. For prøvene dyrket på MRS-medie var det en tydelig større vekst for prøvene uten alge enn prøvene med alge.

Det ble også utført analyser for total fenol og antioksidantkapasitet for rå og tørket (steril og usteril) butare. Disse analysene ble gjennomført ved å ekstrahere kjemiske komponenter fra

butare med metanol:vann (60:40) som løsemiddel. Ekstraktene ble analysert for totalt fenolinnhold ved sammenlikning med en gallussyre stamløsning og antioksidantkapasiteten ble funnet ved DPPH-metode. Prøver av steril tørket butare viste det høyeste fenolinnholdet og den beste antioksidantkapasiteten.

På bakgrunn av resultatene kan det konkluderes med at butare har en antimikrobiell effekt på den generelle floraen hos et filetprodukt av atlantisk laks. Det kan også konkluderes med at tørket sterilisert butare er bedre egnet som absorbent enn rå eller tørket usterilisert butare. Vi kan også konkludere med at ekstrakter av tørket sterilisert butare vil gi høyere utbytte av fenoler enn ekstrakt av rå butare eller butare som bare er tørket. Man kan også konkludere med at ekstrakter av sterilisert og tørket butare vil ha bedre evne til å binde opp frie radikaler enn ekstrakt av rå butare eller butare som bare er tørket.

## Abstract

Initial tests were made to investigate the microbiological flora that exists on raw and dried, as well as dried gamma-irradiated *Alaria Esculenta*. This was investigated by cultivating samples of these algae on eight different media; Iron agar (total colony count), Long and Hammer (total psychrophile flora), MRS (lactic acid bacteria), STAA (*Brochothrix thermosphacta*), Pseudomonas agar (*Pseudomonas* spp.), anaerobic sporeforming media, petrifilm for *Enterobacteriaceae* and petrifilm for mold and yeast. Samples were also stored in modified atmosphere (CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>, 60:40) at 4 °C for up to 14 days. No significant growth of microorganisms was observed on the gamma-irradiated algae in this experiment. The samples grown on Iron agar showed the greatest growth and these samples showed significantly ( $\alpha = 0.05$ ) lower growth for sterilized algae relative to raw and unsterilized algae.

The aim of this master thesis was to determine if *A. Esculenta* had the potential to be used as an absorbent when storing a salmon fillet product (*Salmo salar* L.). The effect of *A. esculenta* on growth of microorganisms on salmon was compared to the use of a conventional absorbent. This analysis was carried out by packing salmon with and without *A. esculenta* in a modified atmosphere (CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>, 50:50). Also, samples were made inoculated with *Aeromonas Salmonicida* to find out if *A. esculenta* could have an antimicrobial effect on this bacteria. All four groups were stored for 21 days at 4 °C in modified atmosphere (CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>, 50:50). Samples were analyzed on day 0 and every subsequent third day. Samples were analyzed for growth of colony forming units by cultivating on three different media; Iron agar (total colony count), Starch and Ampicillin agar (*Aeromonas* spp.) and MRS-media (lactic acid bacteria). The samples with *A. esculenta* as an absorbent showed a significantly lower total colony count than the conventional absorbent samples, when cultivated on Iron agar. In particular, a large difference between the samples with and without *A. esculenta* was found in the non-inoculated samples cultivated on Iron agar. For samples grown on Starch and Ampicillin agar, there was only growth on the inoculated samples. The inoculated samples with algae showed significantly lower growth than the inoculated samples without algae. For samples grown on MRS-media there was a greater growth for the samples without algae than for the samples with algae.

Analyzes for total phenol and antioxidant capacity were also performed for raw and dried (sterile and nonsterile) *A. esculenta*. These analyzes were carried out by extracting chemical components from *A. esculenta* with methanol:water (60:40) as solvent. The extracts were analyzed for total phenolic content by comparison with a gallic acid stock solution and the antioxidant capacity was found by a DPPH-method. Samples of sterile dried *A. esculenta* showed the highest phenolic content and the best antioxidant capacity.

Based on the results, it can be concluded that *A. esculenta* has an antimicrobial effect on the general flora of an Atlantic salmon fillet product. It can also be concluded that the dried sterilized algae is better suited as an absorbent compared to raw or dried unsterilized algae. It can also be concluded that extracts of dried sterilized *A. esculenta* will yield higher phenolic content than extracts of raw or died unsterilized *A. esculenta*. One can also conclude that extracts of sterilized and dried *A. esculenta* will have better ability to scavenge free radicals than extracts of raw or dried unsterilized *A. esculenta*.

## Forkortelser

JA = Jernagar

LH = Long and Hammer

MRS = de Man, Rogosa and Sharpe

SAA = stivelse og ampicillin Agar

PGE = phloroglucinol equivalents

GAE = gallic acid equivalents

ARP = antiradical power

cfu = colony forming units

TSB = tryptic soya broth

MAP = modifisert atmosfære pakking

OD = optisk tetthet



# Innhold

---

1	Innledning .....	1
2	Teori .....	3
2.1	Råstoff.....	3
2.1.1	Butare (Alaria Escualenta) .....	3
2.1.2	Atlantisk laks.....	7
2.2	Teknologi .....	14
2.2.1	Frysetørrking av alger .....	14
2.2.2	Gammabestråling av alger .....	14
2.2.3	Modifisert atmosfære pakking.....	15
2.3	Metodisk teori .....	17
2.3.1	Optisk tetthet (OD).....	17
3	Material og Metode .....	18
3.1	Material .....	18
3.1.1	Alger .....	18
3.1.2	Atlantisk laks.....	18
3.2	Forbehandling av alger og undersøkelse av rehydreringskapasitet.....	18
3.2.1	Frysetørrking.....	18
3.2.2	Gammabestråling .....	18
3.2.3	Forforsøk – Rehydreringskapasitet .....	19
3.3	Forsøk 1 – Analyser av mikrobiell flora på butare.....	19
3.4	Forsøk 2 – Antimikrobiell effekt av butare .....	21
3.5	Forsøk 3 – Lagringsforsøk med butare som aktiv absorbent for pakking av et filetprodukt av atlantisk laks .....	22
3.6	Metodikk.....	24
3.6.1	Kjemiske metoder .....	24
3.6.2	Mikrobiologiske metoder .....	28
3.6.3	Statistikk .....	30
4	Resultater .....	31
4.1	Resultater av fysiske metoder .....	31
4.1.1	Rehydreringskapasitet.....	31
4.2	Resultater av Mikrobiologiske metoder .....	31
4.2.1	Forsøk 1 – Analyser av mikrobiell flora på butare .....	31

4.2.2	Forsøk 2 – Antimikrobiell effekt av butare.....	35
4.2.3	Forsøk 3 – Lagringsforsøk med butare som aktiv absorbent for pakking av et filetprodukt av atlantisk laks.....	37
4.3	Resultater av Kjemiske metoder .....	43
4.3.1	Total fenol .....	43
4.3.2	Antioksidantkapasitet .....	44
5	Diskusjon .....	45
6	Konklusjon.....	49
7	Referanser .....	50

# 1 INNLEDNING

---

Det skulle undersøkes om butare (*Alaria esculenta*) kunne benyttes som aktiv absorbent i emballasje for sjømat, der absorbentens effekt skulle dokumenteres ved å undersøke faktorer relatert til antioksidative- og antimikrobielle egenskaper. Marine makroalger har et høyt innhold av naturlige bioaktive substanser som kan forbedre produktets kvalitet og holdbarhet. Artene med størst potensial fra havområdene rundt Norge er sukkertare (*Saccharina latissima*) og butare. I de senere årene har det i Europa vært et økende fokus på å finne gode teknologiske løsninger for å få til en storskalaproduksjon av disse algartene. På bakgrunn av dette er det også interessant å forske på aktuelle bruksområder for disse algene (Stévant et al., 2017).

Sjømatprodukter er lettbederlige og det er av den grunn et stort fokus på å se på tiltak som kan forlenge produktenes holdbarhet. Problemstillingen i denne oppgaven ble derfor knyttet opp mot hvordan en absorbent laget av butare kunne påvirke kvalitet og holdbarhet for laksefileter pakket i modifisert atmosfære (MAP). Samtidig som det er et ønske om produkter med lengre holdbarhet er det også viktig å sikre at produktene er trygge å spise. Makroalger inneholder antimikrobielle komponenter som teoretisk både kan hemme forringelsesfloraen og eventuelt kontaminerte patogene bakterier.

Hypoteser:

1.  $H_0$ : Butare har både antioksidative og antimikrobielle egenskaper
2.  $H_0$ : Tørket butare inneholder en naturlig flora som kan ha en negativ effekt på laksens holdbarhet
3.  $H_0$ : Et ferskt lakseprodukt pakket i MAP med butare som en aktiv absorbent vil ha lengre holdbarhet sammenlignet med en kontrollgruppe pakket med en tradisjonell papirabsorbent

Analysene som ble utført i forbindelse med denne masteroppgaven kan deles inn i fysiske, mikrobiologiske og kjemiske. De fysiske analysene gikk ut på frysetørking, gammabestråling

og rehydrering av butare. Gammabestråling ble benyttet for å sterilisere noen butareprøver. Analyser med rehydrering ble gjennomført for å finne ut hvor mye vann butare kunne holde på slik at man kunne anslå en rehydreringskapasitet. Det var viktig å anslå en rehydreringskapasitet fordi frysetørket butare skulle rehydreres i forbindelse med videre analyser. De mikrobiologiske analysene gikk ut på å finne ut hvordan ulike typer bakterier og mikroorganismer reagerer i nærvær av butare samt finne ut mer om hvilke mikroorganismer som finnes i den naturlige floraen på butare. Særlig var det ønskelig å finne ut hvordan nedbrytningsorganismer for laks reagerer i nærvær av butare. De kjemiske analysene gikk ut på å finne ut hvor mye total fenol ulikt behandlede typer butare inneholder. I tillegg ble det gjennomført DPPH-analyser for å anslå butarens antioksidantkapasitet.

## 2 TEORI

---

### 2.1 RÅSTOFF

#### 2.1.1 Butare (*Alaria Escualenta*)

Alger er en heterogen plantegruppe med lang fossil historie. Alger deles som regel inn i to hovedgrupper, mikroalger og makroalger. Mikroalger finnes både i bentiske og littorale vannsoner, vi finner dem også i åpent hav som phytoplankton. Makroalger eller tang og tare, som de også blir kalt, finnes stort sett i den littorale sonen. Makroalger klassifiseres som enten grønn-, rød- eller brunalger, dette er basert på kjemisk sammensetning av de ulike algene. Brunalger inneholder for eksempel mye xantofyllpigment eller fucoxanthin som det kalles, dette stoffet er ansvarlig for fargen på brunalger (Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

Butare (*Alaria Esculenta*) er en type marin brunalge som vokser naturlig med stort mangfold i sublittorale soner av Arktiske, kjølige farvann (Bischof, Hanelt, & Wiencke, 2008). Den er vanlig å finne langs norskekysten med sørlig begrensing ved Mandal (Munda & Lüning, 1977). *A. Esculenta* vokser ikke ved temperaturer over 16 °C (Fische, Rustad, & Aarstad, 2016). *A. Esculenta* ser ut som et langt tynt blad med en stripe på midten og den bli opptil 12 meter lang. Denne algen må tåle store variasjoner i UV-stråling fra solen på grunn av sesongvariasjoner. I tillegg må den kunne stå imot høyt mekanisk stress på grunn bølgeaktivitet, samt store forandringer i temperatur og salinitet på grunn av innstrømning av smeltevann (Bischof et al., 2008).

*A. Esculenta* er økonomisk sett en verdifull makroalge som hovedsakelig blir dyrket for humant konsum. Denne marine algen har blitt kultivert i Irland de siste 15 årene og er økonomisk attraktiv på grunn av sin høye veksthastighet på opptil 10 cm/døgn. Algen brukes også til dyrefôr, kosmetiske produkter og alginatproduksjon (Walls, Edwards, Firth, & Johnson, 2017).

Marine alger inneholder mange verdifulle bioaktive komponenter. Tabell 1 viser en rekke slike stoffer som gjør marine alger til en verdifull ressurs.

Tabell 1: Bioaktive komponenter i marine alger (Dominguez, 2013).

<b>Polysakkarider</b>	Alginat, agar, karragenan
<b>Lipider</b>	Flerumettede fettsyrer
<b>Aminosyrer</b>	Essensielle aminosyrer
<b>Florotanniner</b>	Polyfenoler med antimikrobielle og antioksidative egenskaper
<b>Pigmenter</b>	Klorofyll, karotenoider
<b>Vitaminer</b>	A, D, E, K, B1, B2, B12, C
<b>Mineraler</b>	Ca, Mg, Na, P, K, I, Zn, Fe

Brunalger, som *A. esculenta*, kan inneholde store mengder mineraler og antioksidanter i tillegg til mye karbohydrater. Denne typen makroalger inneholder vanligvis lite proteiner (3-15%) og lipider (<1%) (Fische et al., 2016).

Tidligere forskning viser at butare inneholder mellom 25-89% karbohydrater derav 21-42% alginat, 0-34% laminaran og 4-13% mannitol. I forhold til andre brunalger har butare et relativt høyt proteininnhold (9-18%) og kan fungere som en god kilde for proteiner (Indergaard, 2010). Grunnen til at det er så stor variasjon i næringsinnholdet skyldes hovedsakelig årstid og voksested (Indergaard, 2010).

Variasjoner i næringsinnhold kommer ofte av årstid for de fleste makroalger. Dette begrunnes med endringer i lys- og temperaturforhold. Om vinteren og høsten, når det er lite lys, vokser algene mindre og har et høyere innhold av nitrogenholdige stoffer. Når lysnivået øker begynner algene å vokse og de vil ha et lavere innhold av næringsstoffer. Dette på grunn av at næringsstoffene brukes i vekstprosessen (Fische et al., 2016). Til forskjell fra landlige planter har ikke marine alger røtter, blader eller vaskulært system, men de livnærer seg ved osmotiske prosesser (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). Andre faktorer som påvirker makroalgenes vekst kan være salinitet, bølgeaktivitet og forskjeller i vanddybder (Fische et al., 2016).

Det er vist at makroalger inneholder polyfenoler med unike egenskaper. Disse polyfenolene har gode antioksidierende egenskaper og kan være interessante på mange områder. De kan blant annet ha antibakterielle egenskaper. Butare ble funnet å ha et polyfenol innhold på

9,58 PGE% polyfenol innhold (Zhang et al., 2006). Der PGE står for «phloroglucinol equivalent». Dette ble funnet ved bruk av Folin-Ciocalteu metode (Folin & Ciocalteu, 1927). For å sammenligne med andre arter hadde butare høyere innhold av polyfenoler enn sukkertare (*Laminaria Saccharina*) og lavere enn grisetang (*Ascophyllum nodosum*). PGE% for disse var henholdsvis 2,17 og 38,95 (Zhang et al., 2006).

Marine alger lever i sjøvann som i mange tilfeller inneholder store mengder bakterieceller. Marine alger er tilpasset for å overleve dette og produserer bioaktive kjemikalier som hjelper algen med å tåle slike kontaminerte miljø (Shannon & Abu-Ghannam, 2016). Alger produserer blant annet florotanniner og terpenener som kan hemme dannelse av bakteriell biofilm (Shannon & Abu-Ghannam, 2016).

Marine makroalger har blitt undersøkt for sine hemmende egenskaper i forhold til patogene og forringende bakterier. Gupta, Rajauria, and Abu-Ghannam (2010) har testet den antimikrobielle aktiviteten av tre spiselige brunalger, *Himanthalia elongata*, *Saccharina latissima* og *Laminaria digitata* (fingertare). *H. elongata* viste en hemmende effekt på over 98% mot *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* og *Pseudomonas aeruginosa*. *L. digitata* viste en hemmende effekt på over 90% mot *L. monocytogenes*, *Salmonella abony* og *P. aeruginosa*. *L. digitata* viste en hemmende effekt på 97,5% mot *L. monocytogenes* (Gupta et al., 2010).

Ekstrakter av brunalgen *Himanthalia elongata* ble også testet ved diskdiffusjonsanalyse mot bakteriene *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Salmonella abony*. Resultatene viste at *H. elongata* hadde sterke antimikrobielle egenskaper mot disse gram-positive og gram-negative bakteriene (Rajauria, Jaiswal, Abu-Gannam, & Gupta, 2013).

Forskning gjennomført av Dussault, Vu, Vansach, Horgen, and Lacroix (2016) tok for seg marine alger som finnes på øyer i Stillehavet. Sterkt fortynnede ekstrakter ( $\leq 500 \mu\text{g}$  alge/ml) av brunalgartene *Padina* og *Dictyota* viste en hemmende effekt på veksten av gram-positive *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* og *Staphylococcus aureus*. De samme ekstraktene viste derimot ingen effekt mot gram-negative bakteriearter. Dette ble antatt å være på grunn av de hydrofobe ekstraktens manglende evne til å bryte de hydrofile cellemembranene hos de gram-negative bakteriene (Dussault et al., 2016).

Marine alger som lever i grunne havområder utsettes for mye oksidativt stress. Dette kan innebære UV-stråling, CO<sub>2</sub> begrensning, Fe begrensning og høye konsentrasjoner av Cu<sup>2+</sup> og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En undersøkelse gjennomført av Sunda, Kieber, Kiene, and Huntsman (2002) viste at slikt oksidativt stress førte til økt produksjon av antioksidantene dimetylsulfonylpropionat (DMSO) og dimetylsulfid (DMS) hos ulike marine alger. Dette viser at marine alger har utviklet antioksidative mekanismer for å kunne trives i havområder utsatt for mye oksidativt stress (Sunda et al., 2002).

Marine makroalgers antioksidative egenskaper er også relatert til algenes innhold av polyfenoler. Vanligvis har polyfenoler kun tre sammenhengende fenolringer, men polyfenoler som finnes i makroalger kan ha opptil åtte. Dette gjør dem 10-100 ganger sterkere og mer stabile med tanke på å binde opp frie radikaler (Mohamed, Hashim, & Rahman, 2012).

Formålet med bruken av alger i denne masteroppgaven er ikke direkte konsum for mennesker. Det er likevel verdt å nevne at antioksidanter kan hindre oksidative skader hos mennesker ved direkte inntak. Bioaktive stoffer som for eksempel fenoler har trolig forebyggende effekter i forhold til blod- og karsykdommer, forekomst av kreft og andre betennelses relaterte sykdommer (Tuberoso, Boban, Bifulco, Budimir, & Pirisi, 2013).

Marine alger vekker oppsikt på grunn av deres antioksidative egenskaper og det forskes på hvordan de kan erstatte kommersielle syntetiske antioksidanter. I matindustrien brukes det en del syntetiske antioksidanter som butylert hydroksyanisol (BHA), butylert hydroksytoluen (BHT), tertær-butylhydrokinon (TBHQ) og polyfosfater for å forlenge holdbarhet i mat. Slike antioksidanter har blitt mindre populære blant forbrukere og man ønsker mer bruk av naturlige antioksidanter. Naturlige antioksidanter kan for eksempel være aksorbinsyre, rosmarin ekstrakt, procyanidin fra druer, tokoferoler/Vitamin E (kan også fremstilles syntetisk) og te ekstrakt (Hammond & Skonberg, 2012). Marine alger er også en kilde til naturlige antioksidanter. En studie av Athukorala et al. (2003) viste at ekstrakter av rødalgen *Grateloupia filicina* hadde utmerket evne til å hemme lipid oksidasjon sammenliknet med kommersielle antioksidanter som BHA, BHT og tokoferol (Athukorala et al., 2003).

I denne masteroppgaven har det blitt forsket på hvordan butare kan påvirke holdbarheten til laks. Man vet også at laks er en kilde til omega-3 fettsyrer som eikosapentaensyre (EPA) og



dokosaheksaensyre (DHA). Disse fettsyrene har positive helsemessige effekter for mennesker, men utgjør også en risiko for oksidativ forringelse i fisken. Oksidasjon av fettsyrer fører til dannelse av peroksidforbindelser som videre degraderes til sekundære oksiderte produkter som er forbundet med uønsket lukt og smak av fisken. Endogene antioksidanter som askorbinsyre og tokoferoler hjelper med å forsinke oksidasjonen i fiskemuskelen (Hammond & Skonberg, 2012). Forsøkene med laks i denne masteroppgaven tar stort sett for seg den antimikrobielle effekten ved bruk av butare, men denne bruken av butare kan også ha antioksidative effekter.

### 2.1.2 Atlantisk laks

Lakseoppdrett representerte i 2016 1,5-2% av global fiske og marin oppdrett og i Norge produseres over 50% av all global oppdrettslaks. Omtrent 95% av laksen som produseres i Norge går til eksport og etterspørselen etter atlantisk laks øker fortsatt (Moe, 2017). Ifølge Aandahl (2018) har Norge eksportert 1 million tonn laks i 2017, dette utgjorde en verdi på 64,7 milliarder kroner. Dette er en økning på 5% eller 3,4 milliarder kroner sammenlignet med 2016, og det er den høyeste eksportverdien av laks noensinne (Aandahl, 2018).

For at atlantisk laks skal være et attraktivt og verdifullt produkt er det viktig at den har et godt rykte. Det gjøres derfor mye for at laksen skal opprettholde best mulig kvalitet. Blant annet er holdbarheten til laksen et viktig moment for at laksen skal være et verdifullt produkt.

Holdbarheten på fisk påvirkes av hvordan den behandles både før, under og etter slakting. Før slakting kan holdbarheten påvirkes av fiskens velferd og stressnivået som fisken går gjennom. Ved slakting er det ønskelig at fisken skal lide så lite som mulig, mer lidelse kan dessuten føre til mer stress som igjen kan gå utover kvaliteten på fisken (Poli, Parisi, Scappini, & Zampacavallo, 2005). Etter at en fisk er død skjer det mange endringer i fisken, disse endringene kan deles inn i følgende hovedpunkter: sensoriske-, autolytiske- og bakteriologiske endringer i tillegg til lipidoksidasjon og hydrolyse (Huss et al., 1995).

Den mest dramatiske endringen er når fisken går inn i *rigor mortis* (dødsstivhet). Etter slakt er fisken først avslappet og den beholder sin elastiske tekstur i noen timer før muskelen begynner å trekke seg sammen. Når fisken blir hard og stiv og nærmest ubøyelig er den i *rigor mortis*. Denne tilstanden varer gjerne en dag eller lenger før rigor løser seg. Dette fører

til at fiskemuskelen igjen blir avslappet og bøyelig, men den blir ikke like elastisk som den var før rigor. Varigheten og konsekvensene av rigor varierer fra art til art og påvirkes av temperatur, behandling, størrelse og den fysiske tilstanden til fisken (Huss et al., 1995).

Ifølge Huss et al. (1995) kan karakteristiske endringer i spisekvalitet for fisk lagret på is deles inn i fire faser, se tabell 2.

Tabell 2: Karakterisering av faser fisk går gjennom og hvordan fiskens sensoriske kvalitet påvirkes (Huss et al., 1995).

<b>Fase 1</b>	Fisken er veldig fersk og har en søt, sjøgress-aktig og delikat smak. Smaken kan være litt metallisk.
<b>Fase 2</b>	Fisken mister noe av den karakteristiske lukten og smaken. Kjøttet blir nøytralt, men har ingen avsmaker. Teksturen vil fortsatt være behagelig.
<b>Fase 3</b>	Det er tegn på forringelse og en rekke flyktige, ubehagelige stoffer produseres. Et av disse stoffene er trimetylamin (TMA) som dannes ved bakteriologisk reduksjon av trimetyl-aminoksid (TMAO). TMA har en veldig karakteristisk fiskelukt. Ved begynnelsen av denne fasen kan avsmaken av fisken være litt sur, fruktig og bitter, spesielt i fet fisk. I senere stadier av denne fasen kan fisken avgi en sykkelig søt, kål-aktig, ammoniakk, svovel og/eller harsk lukt. Teksturen blir enten myk og vandig eller hard og tørr.
<b>Fase 4</b>	Fisken karakteriseres som bedervet og råtten.

I det øyeblikk fisken er død slutter blodet å pumpe oksygen til muskelvevet. Siden normal oksygentilførsel opphører, begrenses energiproduksjonen ved fordøyelse av næringsstoffer. For de fleste benfisker er glykolyse den eneste muligheten for energiproduksjon når hjertet slutter å pumpe. Glykolyse er en mer ineffektiv prosess med hovedsakelig melkesyre og pyrodruesyre som sluttprodukter. ATP blir også produsert, men bare 2 mol for hvert mol glukose som blir oksidert. Dette er veldig lite sammenliknet med 36 mol ATP per mol glukose dersom de glykolytiske sluttproduktene oksideres aerobt i mitokondrien for levende dyr. Glykolyse fører til akkumulering av melkesyre når fisken er død som igjen fører til lavere pH i muskelen. Denne reduksjonen av pH i fiskemuskel påvirker muskelens fysiske egenskaper. Etter hvert som pH synker, blir summen av ladningene på muskelproteinene redusert, noe som gjør at de delvis denatureres og mister noe av vannbæringsevnen. Muskel som er i *rigor mortis* mister mye av sitt vanninnhold og blir særlig uegnet for videre prosessering som innebærer varmebehandling, fordi varm denaturering forsterker vanntapet. Tap av vanninnhold har en skadelig effekt på fiskemuskelens tekstur og det har blitt vist av Love (1975) at det er et inverst forhold mellom muskelens hardhet og pH, altså at lavere pH kan føre til hardere/seigere fiskemuskel (Huss et al., 1995).

Mikroorganismer finnes på alle ytre overflater og innvoller på levende og nylig fanget fisk. Antallet mikroorganismer varierer fra  $10^2$  til  $10^7$  cfu (colony forming units)/cm<sup>2</sup> på skinnoverflaten. På gjeller og i innvoller varierer kimtallet fra  $10^3$  til  $10^9$  cfu/g. Mikrofloraen på fisk som lever i tempererte sjøområder domineres av psykrotrofe Gram-negative stavformede bakterier som *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* og *Flavobacterium*. *Vibrio*, *Photobacterium* og *Aeromonas spp.* er også vanlige akvatiske bakterier som er typisk for mikroflora i fisk. Gram-positive organismer som *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* og *Corynebacterium* kan også finnes i varierende mengder, men i hovedsak er det Gram-negative bakterier som dominerer mikrofloraen (Huss et al., 1995).

Eksempelvis isolerte Macé et al. (2013) åtte ulike bakteriestammer fra bedervet laks som hadde vært lagret under modifisert atmosfære. Disse var *Serratia spp.*, *Hafnia alvei*, *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Shewanella baltica*, *Lactococcus piscium*, *Photobacterium phosphoreum* og «andre *Enterobacteriaceae*». Disse stammene ble evaluert i forhold til deres spesifikke forringelsesevne ved inokulering til steril

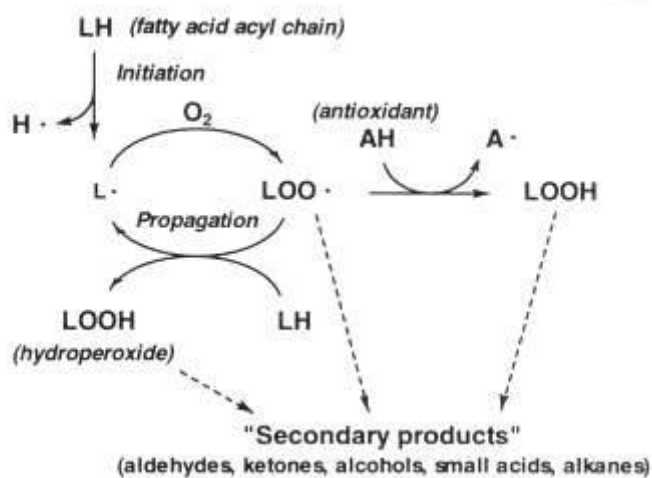
rå laks. Den inokulerte laksen ble lagret over 12 dager med en temperatur på 8 °C. Tre av bakteriestammene, *C. maltaromaticum*, *H. alvei* og *P. phosphoreum*, viste raske og sterke forringende evner (Macé et al., 2013). *H. alvei* er Gram-negative stavformede bakterier (Robinson, 2000). *P. phosphoreum* er også Gram-negative bakterier (Flodgaard et al., 2005) og *C. maltaromaticum* er Gram-positive stavformede melkesyrebakterier (Collins, Farrow, Phillips, Feresu, & Jones, 2008).

Kjøttet på sunn levende eller nyfanget fisk er sterilt fordi immunforsvaret forhindrer vekst av bakterier i kjøttet. Når fisken dør kollapser immunforsvaret og bakterier får spre seg fritt. På skinnoverflaten koloniserer bakteriene i særlig grad lommene under skjellene. Under lagring invaderer bakterier kjøttet ved å bevege seg mellom muskelfibrene. Bakterier på fisk fanget i tempererte vann vil ha en eksponentiell vekst nesten umiddelbart etter at fisken er død. Dette gjelder også for fisk som ligger på is, sannsynligvis fordi bakteriene har tilpasset seg lave temperaturer. Ved is-lagring vil bakterier vokse med en doblingstid på én dag og etter 2-3 uker vil antall bakterier nå  $10^8$ - $10^9$  cfu/g kjøtt eller per  $\text{cm}^2$  på skinnen. Ved lagring i romtemperatur vil bakterier danne nivåer på  $10^7$ - $10^8$  cfu/g i løpet av 24 timer. Store deler av bakteriene som er tilstede på bedervet fisk har ikke hatt noe med forringelsen å gjøre. Det er derfor viktig å skille mellom forringelses flora og forringelses bakterie, den første beskriver bare bakteriene som er tilstede på fisken når den forringes og den andre er den spesifikke gruppen som produserer av-lukter og av-smaker som forbindes med forringelse. Ulike fiskeprodukter har ulike spesifikke forringelses bakterier og mengden av disse, istedenfor det totale antallet bakterier, vil relateres til holdbarheten av fisken (Huss et al., 1995).

Oksidasjon og hydrolyse av lipider i fisk kan føre til produksjon av stoffer med ubehagelig (harsk) smak og lukt. Det kan også føre til endringer i tekstur ved kovalente bindinger til fiskens muskelproteiner. De ulike reaksjonene er enten ikke-enzymatisk eller katalysert av mikrobielle, intracellulære eller fordøyelses enzymer fra fisken. Fet fisk er særlig utsatt for denne typen nedbrytning av lipider. Dette kan få store konsekvenser for fiskens kvalitet, til og med ved temperaturer under 0 °C (Huss et al., 1995).

En stor andel av lipider i fisk er flerumettede fettsyrer noe som gjør dem svært utsatt for oksidasjon ved en autokatalytisk mekanisme (se figur 1). En slik prosess begynner ved at et hydrogenatom avgis fra det sentrale karbonmolekylet i pentadien strukturen som finnes i de fleste fettsyrekjeder med flere enn én dobbeltbinding. Som vi ser på figur 1, dannes det et

lipid radikal ( $L^\cdot$ ). Dette radikalet reagerer veldig hurtig med oksygen slik at et peroksid-radikal ( $LOO^\cdot$ ) blir dannet. Peroksid-radikalet kan reagere med et annet fettsyremolekyl eller med antioksidanter og danne lipidhydroperoksid (LOOH). Sekundær autooksidasjon, katalysert av tunge metall-ion, bryter ned hydroperoksidet til produkter med kortere karbonkjeder som aldehyder, ketoner, alkoholer, små karboksylsyrer og alkaner. Disse ulike stoffene gir opphav til et meget bredt luktspekter og i noen tilfeller kan de føre til en gulaktig misfarging. Antioksidanter kan også motvirke den opprinnelige reaksjonen og føre til at færre lipid radikaler ( $L^\cdot$ ) dannes (Huss et al., 1995).



Figur 1: Autooksidasjon av flerumettet fett (Huss et al., 1995).

Lerøy Seafood spesifiserer på sine hjemmesider at holdbarheten på fersk hel laks er 15 dager etter slaktedato dersom fisken er oppbevart ved 0-4 °C. (Lerøy, 2017).

I forskriften om kvalitet på fisk og fiskevarer kapittel 5 paragraf 10 står det hvilke kvalitetskrav som gjelder for ferske fiskevarer som skal omsettes til humant konsum i Norge. Se tabell 3 for krav til råstoff fra fiskevarer i Norge (punkt a-e er mest aktuelle for denne oppgaven).

Tabell 3: Krav til råstoff fra fiskevarer som skal omsettes ifølge norsk lov ("Forskrift om kvalitet på fisk og fiskevarer," 2013).

- a) Fisken skal være i tiltakende eller fast dødsstivhet. Konsistensen skal være bøyelig, elastisk eller fast og hard. Laksefisk kan være i avtagende dødsstivhet såfremt den oppfyller kravene i bokstavene b) til f),
- b) Lukt og smak skal være frisk og karakteristisk som for nyfanget eller nyslaktet fisk av arten, uten avvikendelukt eller smak fra nedbrytningsprodukter,
- c) Tegn på mangelfull utblødning som røde nakker eller blodfylte årer eller tegn på sein sløying med påvisning av tærte eller gallefargede buker skal ikke forekomme,
- d) Overflater, snittflater og fiskekjøtt skal ha sin naturlige farge og glans som for nyfanget eller nyslaktet fisk av arten uten spor av misfarge,
- e) Slimhuden skal være klar, gjennomskinnelig. Gjeller skal være røde (friske), øynene klare og utstående. Fisk med grå øyne pga. katarakt er å anse som fersk dersom de øvrige kravene er oppfylt,
- f) I magre fiskearter, silde- eller makrellarter skal 100 gram kjøtt, i gjennomsnitt av undersøkte prøver, ikke inneholde mer enn 3 milligram trimetylamin-nitrogen, og ingen enkeltprøver over 5 milligram,
- g) Rogn og melke skal ikke være misfarget,
- h) Rå rogn som skal omsettes til forbruker som kjølt vare, skal ha hel rognsekk. Rogn, lever og melke må ikke komme i direkte kontakt med isen under kjøling/lagring.

Vanligvis er det en spesifikk gruppe forringelsesbakterier som forårsaker mesteparten av forringelsen, denne gruppen kalles ofte for «specific spoilage organisms» (SSOs). Antallet SSOs og konsentrasjonen av deres metabolitter kan brukes til å forutsi holdbarheten. Den maksimale holdbarheten for hel laks på is er omtrent 20 dager. For laksefileter pakket i modifisert atmosfære ved en temperatur på 2-4 °C er det observert holdbarhet på 14-21 dager (Sivertsvik, Rosnes, & Kleiberg, 2006).

Holdbarheten på fisk er også avhengig av næringsinnholdet for fisken og dette varierer for ulike arter. En undersøkelse ble gjennomført i 2015 på atlantisk laks fra oppdrett i Norge for å finne retensjonseffektiviteten fra fôr til laks. Denne undersøkelsen gav også en oversikt

over næringsinnholdet for hel laks og laksefilet fra Lerøy i 2012. Tabell 4 viser denne oversikten (Ytrestøyl, Aas, & Åsgård, 2015).

Tabell 4: Næringsinnhold for hel laks og laksefilet (Ytrestøyl et al., 2015).

	<b>Næringsinnhold hel laks</b>	<b>Næringsinnhold laksefilet</b>
<b>Tørrstoff</b>	41,2%	38,3%
<b>Energi</b>	12,6 MJ/kg	11,5 MJ/kg
<b>Protein</b>	17,5%	19,1%
<b>Lipid</b>	21,3%	18,4%
<b>EPA</b>	0,60%	0,52%
<b>DHA</b>	0,98%	0,85%
<b>Fosfor</b>	0,35%	0,25%

Både holdbarhet og næringshold er kvalitetsaspekter ved fisk, men hva er egentlig kvalitet og hvorfor er kvalitet viktig? Ifølge standarden ISO 8402:1994 er kvalitet definert som «totaliteten av egenskaper et produkt eller en tjeneste har til å tilfredsstille oppgitte eller underforståtte behov» (Gong, 2011).

Fisk er generelt sett veldig lett bederelig mat. Dette gjør at fisk fort kan miste ferskheten som går utover kvaliteten på fisken. Tiden som går etter at fisken har blitt fanget, sammen med temperaturhistorikken for fisken, brukes ofte til å bestemme eller si noe om kvaliteten på fisken. Under lagring av fisk post mortem nedgraderes fiskemuskelen og kvaliteten på kjøttet forringes. Dette kan motvirkes ved gode lagringsprosedyrer (Amanatidou et al., 2000; Ashie, Smith, Simpson, & Haard, 1996). Omfanget og hurtigheten for denne nedbrytningsprosessen varierer for ulike arter av fisk. Nedbrytningsprosessen kommer av komplekse biokjemiske og mikrobielle prosesser som starter med en endring fra aerob til anaerob tilstand. Denne tilstandsendringen fører til en transformasjon av glykogen til melkesyre som igjen fører til lavere pH og aktivering av endogene enzymer som produserer næringsstoffer som bakterier kan livnære og formere seg med (Terova et al., 2011).

Kvalitet for fisk deles ofte inn i fem underkategorier: sensorisk kvalitet, ernæringskvalitet, hygienisk kvalitet, teknologisk kvalitet og etisk kvalitet. For rå laks gjelder hovedsakelig kvalitetsparameterne fileteringsutbytte, fettinnhold i filet, farge, tekstur og filetpalting.

Teksturen på fileten er en av de viktigste kvalitetsparameterne for fisk. Det er en sensorisk parameter for forbruker og en viktig egenskap når det gjelder mekanisk prosessering av fileter. I motsetning til kjøtt fra pattedyr, der man ønsker så mørt kjøtt som mulig, ønsker man at fisken skal være fast og elastisk. Faktorer som kan påvirke kvaliteten for Atlanterhavslaks gjennom verdikjeden er avl og genetikk, fôrsammensetning og fôringsplan, sesong variasjoner, transport, behandling og stress av fisken før slakt, lagringstid og temperatur postrigor/mortem, prosessering og koking/tilberedning (Gong, 2011).

## 2.2 TEKNOLOGI

### 2.2.1 Frysetørking av alger

I arbeidet med denne masteroppgaven ble makroalger frysetørket av flere grunner. Algene ble mye lettere å bearbeide når de var tørket, i forhold til rå alger. Tørkingen av algene gjorde det dermed lettere å pulverisere dem med mort og pistill. I tillegg til dette ble det tenkt at tørkingen ville gjøre algene mindre mottakelige for vekst av mikroorganismer. Med tørkede alger ble det også lettere å ha kontroll på hvor mye vann algene inneholdt når de ble rehydrert under kontrollerte forhold.

Grunnprinsippet bak frysetørking er at vann i fast form (is) vakuumsublimeres til gassform. Det vil si at vannmolekylene ikke gjennomgår det flytende stadiet. Dette gjøres ved at man senker trykket til den grad at man kommer under trippelpunktet i fasediagrammet for vann. Denne prosessen etterlater substratet i en nesten vannfri tilstand (Franks, 1998).

Frysetørkeren som ble brukt i dette arbeidet var en LABCONCO FreeZone 12 (Labconco, USA). Den senker temperaturen til under  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  og trykket til under  $0,133\text{ mBar}$  for å gjennomføre frysetørkingen (Labconco, 2004).

### 2.2.2 Gammabestråling av alger

Makroalgene som ble benyttet i denne masteroppgaven ble gammabestrålt for å sterilisere algene. Dette for at en eventuell mikroflora fra algene ikke skulle kontaminere laksefileter ved lagringsforsøk med algene som absorbent.

I Norge gjelder forskriften om behandling av næringsmidler med ioniserende stråling for produksjon, omsetning og import av næringsmidler og næringsmiddelingsredienser som behandles med ioniserende stråling. Det er tillatt å bestråle tørkede aromatiske urter,



krydder og vegetabiliske smaksgivere som er beregnet for omsetning til forbrukere eller storhusholdning. Den maksimale tillatte strålingsdosen for dette er 10 kiloGray (kGy). For bruk av gammabestråling til forskning gjelder egne regler ("Forskrift om behandling av næringsmidler med ioniserende stråling," 2001).

Ioniserende stråling er svært effektivt ved inaktivering av matbårne patogene bakterier og parasitter i mange ulike matvarer (Fan, Niemira, & Sokorai, 2003).

Bestråling av mat er en fysisk metode for å bevare matvarer. Gammastråling er en foretrukket kilde til stråling på grunn av strålenes penetrerende evne og egenskap til å inaktivere et bredt mangfold av mikroorganismer (Calado, Fernández-Cruz, Cabo Verde, Venâncio, & Abrunhosa, 2018).

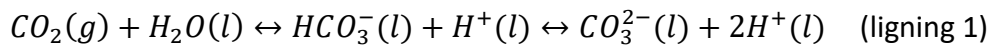
### 2.2.3 Modifisert atmosfære pakking

Prinsippet med modifisert atmosfære pakking (MAP) er å erstatte luft i en innpakning med annen blanding av gasser. CO<sub>2</sub> er den viktigste gassen som brukes ved pakking av fisk. Denne gassen hemmer vekst av mange forringelsesbakterier og effekten av gassen øker desto høyere konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> er i atmosfæren (Sivertsvik, Jeksrud Willy, & Rosnes, 2002).

Blandingen av gasser i MAP er som regel en blanding av O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> og forlengelsen av holdbarhet skyldes i de fleste tilfeller den bakteriehemmende effekten av CO<sub>2</sub>. En viss mengde CO<sub>2</sub> må løses inn i matvaren for at det skal ha en hemmende effekt på bakteriell vekst. CO<sub>2</sub> er generelt sett lettløselig i både muskel- og fettvev, og særlig løselig i rent vann (Abel, Rotabakk, Rustad, & Lerfall, 2018). Denne løseligheten øker dersom temperaturen reduseres. Løseligheten i vann ved 0 °C og 1 atm er 3,38 g CO<sub>2</sub>/kg H<sub>2</sub>O, og ved en temperaturøkning til 20 °C senkes løseligheten til 1,73 g CO<sub>2</sub>/kg H<sub>2</sub>O (Sivertsvik et al., 2002). Denne regelen er ikke helt korrekt for prøver/matvarer som inneholder flytende fett. I noen tilfeller med høyt innhold av fett kan løseligheten av CO<sub>2</sub> øke med økende temperaturer, fordi fettene kan gå fra fast form til flytende og CO<sub>2</sub> har høyere løselighet i flytende fett. Faktorer som påvirker løseligheten for CO<sub>2</sub> kan være pH, lipid innhold, lipid type, salt innhold, mengde CO<sub>2</sub> i den initielle gassblandingen og vanninnhold (Abel et al., 2018).

MAP brukes til å forlenge holdbarheten til fersk fisk og kan forlenge holdbarheten fra 50% til 400%, men denne forlengelsen er bare perioden fra moderat til lav kvalitet. Fiskens beste kvalitet bevares ikke ved MAP. Effekten av MAP påvirkes som regel av mengden CO<sub>2</sub> som er

tilgjengelig i pakningsatmosfæren, tilgang på O<sub>2</sub>, kvaliteten på råstoffet og lagringstemperaturen (Sivertsvik et al., 2006).



Når CO<sub>2</sub> løses i vann i muskelvev dannes karbonsyre (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (se likning 1) som avgir H<sup>+</sup> og senker pH. Denne forsuringen sammen med hemming av enzymer, endring av cellemembranen og fysio-kjemiske endringer av proteiner forklarer delvis den bakteriostatiske effekten ved bruk av CO<sub>2</sub>-gass (Sørheim, 2000).

O<sub>2</sub> vil generelt stimulere vekst av aerob forringelsesflora. Fjerner man oksyngengassen kan man derfor forlenge holdbarheten for matvarer i forhold til mikroflora. I tillegg fremmer O<sub>2</sub> oksidasjon av lipider, fjerner man oksyngengassen fra pakningsatmosfæren kan man også minimere denne oksidasjonen (Sørheim, 2000).

N<sub>2</sub> er en inert gass med lav løselighet i kjøtt. Gassen brukes for å fylle opp tomrom og hindre kollaps i pakninger som kan oppstå dersom høye konsentrasjoner av CO<sub>2</sub> brukes. N<sub>2</sub> har ingen direkte effekter på mikrobiologisk holdbarhet eller farge på mat (Sørheim, 2000).

Kollaps av pakninger kan også forhindres ved å løse CO<sub>2</sub> inn i matvarene før de pakkes. Dette kan gi enda bedre holdbarhet enn MAP og gir potensiale for høyere fyllingsgrad av CO<sub>2</sub>. Dette kalles «soluble gas stabilization» (SGS) (Rotabakk, Wyller, Lekang, & Sivertsvik, 2008).

I en atmosfære bestående av 100% CO<sub>2</sub>, kan fisk holdes fersk 2-3 ganger lenger enn fisk lagret i luft ved samme temperatur. Fersk hyse, torsk, sjøtunge, hvitting og rødspette har blitt effektivt preservert ved CO<sub>2</sub> konsentrasjoner på 20-100% med optimale forhold ved ca. 40-50% CO<sub>2</sub> (Sivertsvik et al., 2002). Reddy, Solomon, Yep, Roman, and Rhodehamel (1997) påstår at laksefileter pakket i 75% CO<sub>2</sub> og 25% N<sub>2</sub> ved 4 °C kan ha en holdbarhet på 55-62 dager (Reddy et al., 1997). Tidligere har det også blitt rapportert at laksefileter lagret med 90% CO<sub>2</sub> ved 0 °C kan ha en holdbarhet på 21 dager (Barnett et al., 1982). Dette viser at det er stor variasjon i påstandene rundt den holdbarhetsforlengende effekten man kan oppnå ved bruk av MAP. Optimale forhold for MAP er vanskelig å anslå fordi det er så mange faktorer som spiller en rolle. Høykvalitets råmateriale og lagringstemperatur er viktige parametere. Med en fisk som laks med høyt innhold av lipider er det viktig å ekskludere oksygen for å unngå oksidasjon av lipidene. Dette kan gjøres ved vakuumpakking, «gas flushing» med en inert gass som nitrogen eller ved bruk av en oksygenabsorbent i

pakningen. Deretter kan holdbarheten videre forlenges ved å tilsette CO<sub>2</sub>. Desto mer CO<sub>2</sub> som tilsettes inntil produktet er mettet med CO<sub>2</sub> vil gi en mer hemmende effekt på bakterier og en mindre potent forringelses flora. Tilsettes for mye CO<sub>2</sub> kan det resultere i ubehagelige karboniserte smaker. Fletcher, Summers, Corrigan, Johanson, and Hedderley (2005) laget en formel som viste at den optimale gassblandingen for laks ved 0 °C var 60% CO<sub>2</sub> og 40% N<sub>2</sub> ved en gass/produkt rate på 1,77 (Fletcher et al., 2005).

## 2.3 METODISK TEORI

### 2.3.1 Optisk tetthet (OD)

Måling av optisk tetthet er en lysspredningsteknikk som brukes for å gi en indikasjon på hvor mange organismer som befinner seg i en væske. Denne teknikken brukes ofte før man skal foreta en inokulering med en mikroorganisme og kan være veldig effektivt for å følge konsentrasjonen av en mikrokultur med tanke på veksthastighet og at det ikke dreper celler. Teknikken er ikke helt presis fordi den måler hverken CFU eller antall celler. Denne teknikken kan sammenliknes med måling av cellenes vekt og den tar ikke hensyn til størrelsen på celler. Det er nødvendig å dyrke kulturer på plater før man måler optisk tetthet, slik at man har en viss forståelse for hvor mange celler mediet inneholder. Måling av optisk tetthet gjøres ved at lys sendes gjennom en væske med innhold av en mengde celler. Det lyset som ikke absorberes spres når det treffer partikler i løsningen og tilslutt reflekteres noe lys tilbake til kilden hvor det måles. Graden av lysets spredning i væsken gir en indikasjon på biomassen i løsningen. Generelt sett justeres bølgelengden mellom 420-550 nm ved bruk av et spektrofotometer (Sutton, 2011).

## 3 MATERIAL OG METODE

---

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Alger

Makroalgene som ble brukt i denne oppgaven var butare (*Alaria Esculenta*) levert av Seaweed Energy Solution AS på Frøya. Disse algene ble dyrket på tau i åpent vann og høstet 24.05.2017. Algene ble oppbevart ved -80 °C frem til det ble startet forsøk med algene.

#### 3.1.2 Atlantisk laks

Laksen som ble brukt i denne oppgaven var atlantisk laks fra Nils Williksen AS, Røyrvik, Norge. Laksen ble slaktet torsdag den 01.03.2018. Laksen ankom skolen mandag 05.03.18 der den ble filetert og klargjort for oppstart av forsøk. Vekten for en hel laks var i gjennomsnitt på 4,6 kg.

### 3.2 FORBEHANDLING AV ALGER OG UNDERSØKELSE AV REHYDRERINGSKAPASITET

#### 3.2.1 Frysetørking

Det ble brukt en frysetørker fra Labconco av typen FreeZone 12 (Labconco, USA) til frysetørking av all butare i denne masteroppgaven. Partier med alger ble fryst til -80 °C, 1 kg per parti. Deretter ble algene delvis tint slik at det var lettere å dele opp algene til passende store deler før frysetørking. Frysetørkingen ble gjennomført i 72 timer før den ble vakuumpakket. Vakuumpakkingen ble utført ved bruk av en Webomatic SuperMax (Webomatic, Tyskland) vakuumpakkemaskin. Vekten på 1 kg alge ble redusert til ca. 100 gram på grunn av vannet som fjernes ved frysetørkingen.

#### 3.2.2 Gammabestråling

Det ble frysetørket to partier med butare. To ganger 100 gram tørket vakuumpakket alge ble sendt til Kjeller (Institutt for energiteknikk) for å bli behandlet med gammabestråling. Bestrålingen ble startet den 9. november 2017 og avsluttet den 12. desember 2017. Grunnen til det lange tidsrommet var en feil med anlegget. Strålingsdosen ble målt til 26,4 kGy.

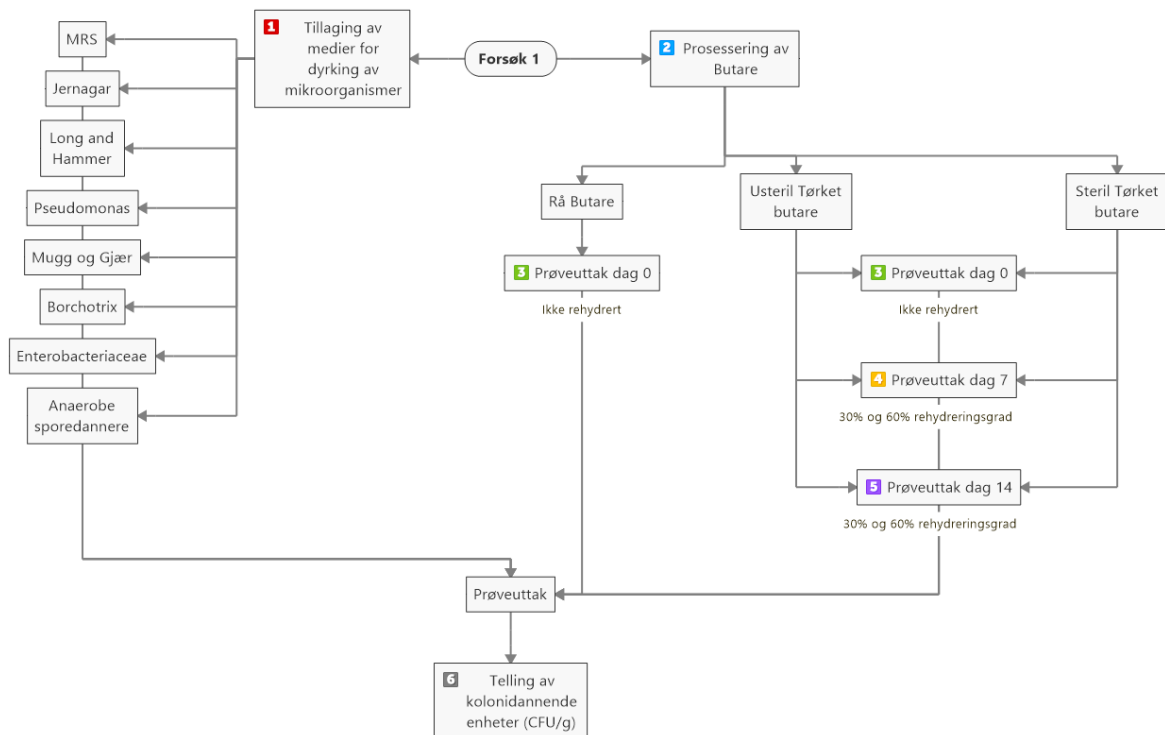
Anlegget på Kjeller er Norges eneste gammabestrålingsanlegg. Det eies og drives av Institutt for energiteknikk, og har vært i drift siden 1970. På anlegget bedrives det bestråling av krydder og andre smaksgivere, matvarer (kun forskning), medisinsk utstyr og legemidler. I tillegg driver de med modifisering av materialegenskaper i polymere kunststoffer og testing av strålingstoleranse til elektronisk utstyr brukt i satellitter. Gammabestrålingsanlegget på Kjeller baseres på stråling fra  $^{60}\text{Co}$  formet som sylindriske stenger (Institutt for energiteknikk, 2018).

### 3.2.3 Forforsøk – Rehydreringskapasitet

Det ble brukt rå butare som hadde blitt fryst til  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  og deretter tint for å finne frem til rehydreringskapasiteten for butare. Åtte paralleller med omtrent 30 gram rå butare ble veid ut. Prøvene ble igjen fryst ned til  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  og satt til frysetørking over 72 timer. Den tørkede massen ble veid opp og vanntapet ble regnet ut. Vanntapet ble dividert på vekten av den tørkede massen for å komme frem til et tall på hvor mye vann ett gram alge kunne holde på. Gjennomsnittet av dette tallet for de åtte parallellene ble antatt å være den totale rehydreringskapasiteten for butare.

## 3.3 FORSØK 1 – ANALYSER AV MIKROBIELL FLORA PÅ BUTARE

Før forsøket begynte ble det laget til medier for uttak av 0-prøver. Grunnen til at alle medier ikke ble laget klar før forsøket var at noen av mediene kunne gå ut på dato i løpet av forsøket. Mediene som ble laget var Long and Hammer (LH) agar, Jernagar (JA), MRS agar, Brochothrix agar, Pseudomonas agar og agar for anaerobe sporedannere. For dyrking av Enterobacteriaceae og mugg/gjær ble det brukt petrifilm. For mer informasjon om medier se kap. 3.6.2.



Figur 2: Illustrasjon av stegene som ble gått gjennom i Forsøk 1. Tallene 1-6 viser kronologisk rekkefølge for utførelsen av stegene.

Forsøket ble startet tirsdag 16. januar 2018. Det ble da pakket prøver med usterilisert alge som skulle lagres i 7 og 14 dager. I tillegg ble det pakket rå og usterilisert alge for uttak av 0-prøver, disse ble tatt ut samme dag. Det ble bestemt at 0-prøvene ikke trengte å bli rehydrert ettersom de ikke skulle lagres og likevel tilsettes peptonvann ved uttaket. For prøvene som skulle lagres ble det laget fire paralleller for hver gruppe og det var altså fire grupper. De fire gruppene er vist i tabell 5. Det ble brukt 3 gram alge for hver parallell. Rehydreringkapasiteten (se kap. 4.1.1) ble brukt til å beregne at det måtte tilsettes 6,64 g vann for 30% rehydrering og 13,28 g vann for 60% rehydrering av 3 g alge. Det ble notert hvor mye vann som ble tilsatt hver prøve. Vannet som ble brukt til rehydrering var sterilisert ved autoklaving og grunnleggende sterilteknikk ble brukt ved rehydrering av prøvene. Prøvene ble lagt i 230 ml plastskåler (HICPET Sort, Faerch plastic, Danmark) der de ble tilsatt vann for rehydrering. Deretter ble prøvene pakket med modifisert atmosfære (MA) ved bruk av en skålpakker (Webomatic Traysealer TL250, Tyskland). Gasskonsentrasjonen som ble brukt var 60% CO<sub>2</sub>, 0% O<sub>2</sub> og 40% N<sub>2</sub>. Når prøvene var ferdig pakket ble de merket med

parallellnummer, rehydreringsgrad og antall dager prøvene skulle lagres. Prøvene ble lagret på kjølerom med temperatur på 4 °C.

Prøvene for de sterile algene ble pakket onsdag 17. januar 2018. I tillegg ble det gjennomført uttak av 0-prøver for steril alge. Prøvene for steril alge ble behandlet på samme måte som prøvene for usteril alge, eneste forskjellen var at pakkingen og uttakene ble gjennomført med en dags mellomrom slik at arbeidet ble mer jevnt fordelt.

Uttak av prøvene ble gjennomført ved å overføre innholdet i plastskålene til stomacherposer (Separator 400, Grade Products LTD, England) og veie prøvene. Prøvene ble deretter fortynnet (forhold 1:10) med peptonvann og blandet med et stomacherapparat (Masticator, IUL, Spania) i ett minutt. Deretter ble prøvene videre fortynnet i sentrifugerør (forhold 1:10) til passende fortynningsgrad. Så ble prøvene spredt ut på ulike medier i petriskåler (VWR International, USA) og petrifilmer. Prøvene ble dyrket på medier av JA, LH, MRS agar, Brochothrix agar, Pseudomonas agar, agar for anaerobe sporedannere, petrifilm for mugg og gjær og petrifilm for enterobacteriaceae. Mediene ble satt til inkubasjon med ulik temperatur og varighet (se kap. 3.6.2). Når inkubasjonen var ferdig ble det telt antall kolonidannende enheter (cfu) som hadde vokst på de ulike mediene.

Tabell 5: Oversikt over grupper i forsøk 1 og navngiving av gruppene.

<b>Grupper forsøk 1</b>	<b>Sterilisert alge</b>	<b>Usterilisert alge</b>
<b>30% rehydrering</b>	Gruppe 1 – Steril 30%	Gruppe 2 – Usteril 30%
<b>60% rehydrering</b>	Gruppe 3 – Steril 60%	Gruppe 4 – Usteril 60%

### 3.4 FORSØK 2 – ANTIMIKROBIELL EFFEKT AV BUTARE

Det ble gjennomført antimikrobielle tester for å undersøke effekten av butare i direkte kontakt med en rekke ulike forringende og patogene bakterier. Bakteriene som ble brukt var *Shewanella putrefaciens* (CCUG 13452), *Photobacterium phosphoreum* (CCUG 16288), *Brochothrix thermosphacta* (CCUG 35132), *Aeromonas hydrophilia* (CCUG 14551), *Aeromonas salmonicida* SU2 (Miljø), *Staphylococcus aureus* (CCUG 51870), *Listeria innocua* (CCUG 15531), *Escheria coli* (CCUG 49263), *Pseudomonas* spp. (Miljø/isolert fra sei) og *Pseudomonas fluorescens* (CCUG 369).

Stammer av de nevnte bakteriene ble overført til tryptisk soyabuljong (TSB) for oppdyrking. Deretter ble hver stamme pipetert over på petriskåler med Müller Hinton agar. På hver skål ble det lagt fire biter med 30% rehydrert butaremasse spredt til hvert sitt hjørne. Butaren som ble brukt var ikke sterilisert ved gammabestråling. Skålene ble deretter inkubert ved optimale temperaturer i 1-2 dager (se tabell 6) til de ulike bakteriene hadde vokst som et tett teppe av kolonier på agaren. Skålene ble deretter undersøkt for koloni-frie soner rundt butaren.

Tabell 6: Oversikt over ulike bakterier som ble brukt til antimikrobielle tester (forsøk 2).

Bakterie	Gram +/-	ID	Ink. Temp.	Ink. Tid	OD600
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	CCUG 13452	25 °C	48 t	0,196
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	CCUG 369	25 °C	48 t	0,205
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	+	CCUG 35132	20 °C	24 t	0,187
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	-	CCUG 16288	20 °C	48 t	0,202
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	-	CCUG 14551	37 °C	24 t	0,226
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	CCUG 51870	37 °C	24 t	0,198
<i>Escherichia coli</i>	-	CCUG 49263	37 °C	24 t	0,255
<i>Listeria innocua</i>	+	CCUG 15531	37 °C	24 t	0,205
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	Miljø	25 °C	48 t	0,202
<i>Aeromonas salmonicida SU2</i>	-	Miljø	37 °C	24 t	0,274

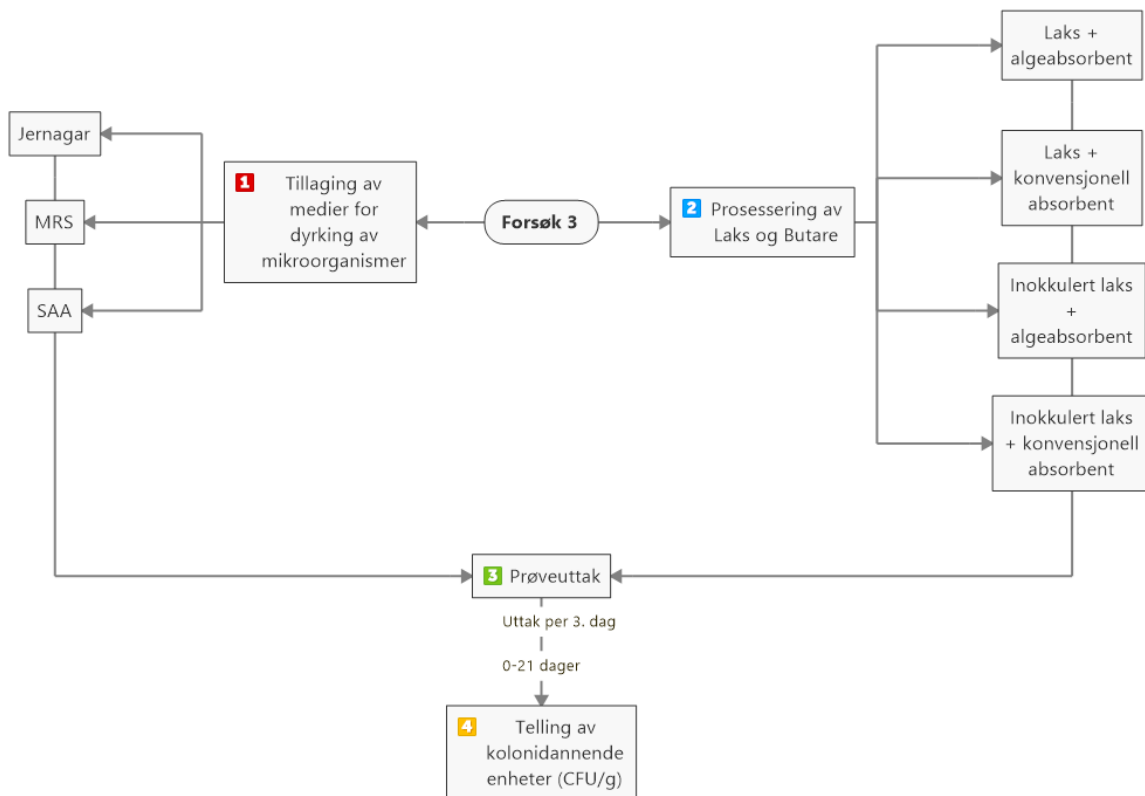
### 3.5 FORSØK 3 – LAGRINGSFORSØK MED BUTARE SOM AKTIV ABSORBENT FOR PAKKING AV ET FILETPRODUKT AV ATLANTISK LAKS

Medier ble laget til for analyser med JA, SAA og MRS (se kap. 3.6.2) på forhånd av forsøket.

Forsøket begynte med prosessering av alger og laks mandag 5. Mars 2018. Laksen ble delt slik at høyre side av laksen ble brukt i prøver med alge, og venstre side av laksen ble brukt i prøver uten alge. Dette ble utført på denne måten fordi forskjeller mellom sidene på laksen ikke skulle påvirke forskjeller innad i gruppene. Det ble brukt 3 gram alge som absorbent for



hver parallell. Algene ble veid ut i 230 ml plastskåler og deretter rehydrert med autoklavert vann. I dette forsøket ble 30% rehydreringsgrad brukt for alle prøvene. Det ble også laget til skåler for prøver uten alger. I disse skålene ble det lagt en tradisjonell absorbent av, se vedlegg 5 for spesifikasjoner på denne absorbenten. Denne absorbenten ble ikke rehydrert.



Figur 3: Illustrasjon av stegene som ble gått gjennom i Forsøk 3. Tallene 1-4 viser kronologisk rekkefølge for utførelsen av stegene.

Laksen ble filetert og delt opp i biter på omtrent 10 gram. For prøvene som ikke skulle inokuleres ble det lagt 2 biter laks i hver plastskål. For prøvene som skulle inokuleres ble det pipettert 80 µL av inokulenten på hvert laksestykke. Inokulenten ble pipettert på den siden av laksestykket som skulle ligge ned mot algen. De inokulerte laksestykkene ble lagt to og to i hver plastskål. Grunnen til at det ble lagt to og to stykker i hver plastskål var i tilfelle man ønsket å utføre flere analyser i ettertid.

Alle prøvene ble pakket med modifisert atmosfære. Gasskonsentrasjonen for MA pakkingen var 50: 0: 50 henholdsvis for CO<sub>2</sub>: O<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>. Prøvene ble merket med kode for gruppe (AN, UN,

AI og UI) (se tabell 7) og ID-nummer fra 1 til 48 for hver gruppe. Deretter ble prøvene satt til lagring på kjølerom med temperatur på 4 °C.

Tabell 7: Oversikt over grupper forsøk 3 og navngivning for gruppene.

<b>Grupper forsøk 3</b>	<b>Alge som absorberent</b>	<b>Tradisjonell absorberent</b>
<b>Naturell</b>	Gruppe 1 – Alge naturell (AN)	Gruppe 2 – Uten alge naturell (UN)
<b>Inokulert</b>	Gruppe 3 – Alge inokulert (AI)	Gruppe 4 – Uten alge inokulert (AN)

0-uttaket ble gjennomført samme dag som prosesseringen av prøvene. Deretter ble det gjennomført uttak hver tredje dag. Ved hvert uttak ble det tatt ut 3 paralleller av hver gruppe. Først ble gasskonsentrasjonen i pakningene målt for å analysere endringer i gasskonsentrasjoner. Deretter ble én filet fra hver pakke plassert i en stomacherpose. Prøvene ble fortynnet med peptonvann med forholdet 1:10 (10 g pepton vann/g prøve). Videre ble prøvene blandet med et stomacher-apparat.

Prøvene ble overført til fortynningsrør for videre fortynning. Dette foregikk ved at 9 ml av 1:10 fortynningen ble overført til et fortynningsrør. 1 ml fra dette røret ble overført til et nytt fortynningsrør med 9 ml peptonvann slik at den neste fortynningen ble 10 ganger mer fortynnet enn den forrige. Dette ble gjentatt helt til den lavest ønskede fortynningen var oppnådd. Deretter ble prøvene spredt ut på ulike medier i petriskåler. Mediene som ble benyttet var JA, SAA og MRS agar. Mediene ble satt til inkubasjon med ulik temperatur og varighet (se kap. 3.6.2). Når inkubasjonen var ferdig ble det telt antall kolonidannende enheter (cfu) som hadde blitt dannet på de ulike mediene.

## 3.6 METODIKK

### 3.6.1 Kjemiske metoder

#### *Ekstraksjon av bioaktive komponenter fra butare*

Det ble laget ekstrakter av rå, steril og usteril butare. Ekstraktene ble laget ved at ca. 5 gram alge ble kvernet/homogenisert for hånd med morter og pistill. Deretter ble ca. ett gram av

alge overført til hver av tre parallelle sentrifugerør (Sarstedt, Tyskland). Hvert sentrifugerør ble tilsatt 9 ml av en 60:40 metanol:vann løsning som løsemiddel. Denne blandingen ble så homogenisert i ca. ett minutt ved bruk av et Ultra-Turrax apparat (ULTRA-TURRAX T 25 basic, IKA) og satt i ultralydbad av typen Branson 5800 (Branson Bransonic CPX5800H-E, Emerson, USA) i 60 minutter. Løsningene ble sentrifugert med en Kubota 1700 (Kubota, Japan) i 15 minutter ved 12000 rpm og 4 °C. Tilslutt ble ekstraktene filtrert over i kimaxrør ved bruk av sprøyter med 0,2 µm filter. Prøvene ble satt i -80 °C fryser for lagring inntil de ble brukt for videre analyser.

### *Total fenol – Standardkurve*

En standardkurve ble laget med 6 stamløsninger av ulike konsentrasjoner. Stammløsningene ble laget med gallussyre (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid monohydrate, Sigma-Aldrich, USA) som kilde til fenol og en blanding av Folin-Ciocalteu (Folin-ciocalteu's reagent for analysis of phenols, VWR Chemicals, USA) og natriumkarbonat ( $\text{NaCO}_3$ , Merck, Tyskland) som fargeindikator.

Stamløsningen av gallussyre ble laget av 0,012 g gallussyre løst i 100 ml ionebyttet vann. Konsentrasjonen på løsningen ble da 120 mg/l.

Det ble også laget en 7% natriumkarbonatløsning. Denne ble laget av 35,0 g natriumkarbonat fortynnet i 500 ml ionebyttet vann.

Folin-ciocalteu løsningen var ferdig laget på flaske fra produsent.

Det ble tilsatt 5 ml ionebyttet vann til hver av seks 100 ml målekolber. Deretter ble det tilsatt gallussyre av ulikt volum til hver av målekolbene. Volumet som ble tilsatt er vist i tabell 8.

Tabell 8: Volum stamløsning i 100 ml målekolber.

Kolbe nr.	Konsentrasjon av gallussyre (mg/l)	Volum stamløsning (ml)
1	0	0
2	0,6	0,5
3	1,2	1,0
4	1,8	1,5
5	3,6	3,0
6	6,0	5,0

Hver målekolbe ble så tilsatt 1 ml Folin-Ciocalteu reagens. Inholdet i målekolbene ble blandet og fikk stå i ca. 5 minutter før det ble tilsatt 10 ml av 7% natriumkarbonatløsning til hver målekolbe. Deretter ble målekolbene fylt med ionebyttet vann til merket. Løsningene fikk stå i 2 timer før absorbans ble målt. Absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 720 nm. Spektrofotometeret (UV-1800 UV Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) ble nullstilt med ionebyttet vann.

#### *Totalfenol – Butare ekstrakter*

Totalfenolinnholdet ble analysert for ekstrakter av rå og frysetørket, steril og usteril, butare med 3 paralleller for hver av dem. Dette ble gjennomført ved at ni 100 ml malekolber ble tilsatt 5 ml ionebyttet vann. Det ble tatt ut 0,5 ml av de ulike parallelle ekstraktene til hver sin målekolbe. Deretter ble 1 ml Folin-Ciocalteu reagens tilsatt hver målekolbe. Prøvene ble blandet og fikk stå i ca. 5 minutter. 10 ml av 7% natriumkarbonatløsning ble så tilsatt hver målekolbe og kolbene ble fylt til merket med ionebyttet vann. Målekolbene fikk deretter stå i 2 timer før absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 750 nm. Spektrofotometeret ble nullstilt med ionebyttet vann. Absorbansen ble brukt til å regne ut gallussyreekvivalenter (GAE). Videre ble det regnet om til mg GAE/g butare.

#### *Antioksidantkapasitet*

På forhånd av analysen ble det laget til løsninger av DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, USA) og Tris-HCl buffer (Tris(hydroksymetyl)aminometan-hydrogenklorid buffer, Sigma-Aldrich, USA) samt en 60:40 metanol:vann løsning.

En 45,0 µg/mL DPPH-løsning ble laget ved å ta 11,3 mg DPPH over i en 250 ml målekolbe og tilsette etanol (96%) til merket. Løsningen ble laget til 24 timer på forhånd slik at alt DPPH-pulveret fikk løst seg fullstendig.

For å lage 100 mM Tris-HCl buffer ble det først laget en 0,2 M Tris-løsning og en 0,2 M HCl-løsning. Tris-løsningen ble laget ved å ta ut 24,2 g Tris(hydroksymetyl)aminometan til en 1 L målekolbe løse det med ionebyttet vann til merket. HCl-løsningen ble laget ved å ta ut 17,2 mL konsentrert HCl til en 1 L målekolbe og fortynne med ionebyttet vann til merket. Deretter ble 500 mL 0,2 M Tris-løsning og 414 mL 0,2 M HCl-løsning overført til en ny 1 L målekolbe og løsningen ble fortynnet med ionebyttet vann til merket.

Antioksidantkapasiteten for ekstrakter av rå og tørket, steril og usteril, butare ble analysert ved bruk av DPPH-metode. For å gjennomføre denne analysen var det nødvendig å fortynne ekstraktene til passende konsentrasjoner i forhold til DPPH-løsningen som ble tillaget. Det ble derfor regnet ut konsentrasjon av butare per gram DPPH som ville være i prøvene ved tilsetning av 0,4 µL butare-ekstrakt, denne ble beregnet til ca. 500 g/g DPPH. Passende konsentrasjoner av ekstraktene er vist i tabell 9. For å nå frem til de passende konsentrasjonene ble ulike volum av butare-ekstraktene overført til 10 ml målekolber, tabell x viser en oversikt over dette. Deretter ble målekolbene fylt til merket med 60:40 metanol:vann-løsning.

Når DPPH-løsningen, Tris-HCl bufferen og fortynningene av ekstraktene var laget ble det satt opp serier med kimaxrør for tre paralleller og seks fortynninger for de tre ulike butare-ekstraktene. Altså 18 kimaxrør for rå-ekstrakt, 18 kimaxrør for steril ekstrakt og 18 kimaxrør for usteril ekstrakt. Hvert kimaxrør ble tilsatt 400 µL med angitt parallell og konsentrasjon av de ulike butare-ekstraktene. Deretter ble 1,6 mL Tris-HCl buffer og 2,0 mL DPPH-løsning tilsatt hvert kimaxrør. Blandingene ble ristet på whirlmixer i ca. 5 sekunder og satt i et mørkt skap i 60 minutter før absorbans ble målt spektrofotometrisk for hver løsning. Absorbansen ble målt med bølglengde på 520 nm og spektrofotometeret ble nullstilt med 100 mM Tris-HCl buffer.

Tabell 9: Oversikt over ønskede konsentrasjoner og volum tatt ut til fortynning av butare-ekstrakter av rå og tørket (steril og usteril) butare ved analyse av antioksidantkapasitet.

<b>Prøve nr.</b>	<b>Passende konsentrasjoner (g/g DPPH)</b>	<b>Volum tatt ut (ml)</b>
1	0,5	0,05
2	1,0	0,11
3	3,0	0,33
4	5,0	0,55
5	7,5	0,83
6	10.0	1,11

Absorbansen av prøvene ble brukt til å regne ut «Radical Scavenging Effekt» (RSE) som ble plottet mot konsentrasjonen av prøvene. Deretter ble det lest av den teoretiske konsentrasjonen der RSE = 50%. Denne konsentrasjonen ble satt som «half maximal effective concentration» (EC<sub>50</sub>) verdi.

### 3.6.2 Mikrobiologiske metoder

#### *Sterilteknikk*

Normal sterilteknikk ble benyttet for uttak av prøver og tillaging av medier. Det ble brukt nitrilhansker ved all kontakt med instrumenter og løsninger. Alle overflater som var i kontakt med utstyr ble spritet før bruk. Hver gang en flaske eller et sentrifugerør ble åpnet ble topp og kork brent av med gassbrenner. Alle pipettespisser ble autoklavert før bruk, og alle medier ble autoklavert før de ble helt over på petriskåler. Helling av medier over på petriskåler ble utført i avtrekkskap.

#### *Medier*

Tillaging av Jernagar (JA)-medier ble utført i henhold til NMKL No. 184 (NMKL, 2006). Medier av JA ble inkubert ved 22 °C i 72 timer.

Tillaging av Long and Hammer (LH)-medier ble utført i henhold til NMKL No. 184 (NMKL, 2006). Medier av LH ble inkubert ved 15 °C i 6 døgn.

Tillaging av MRS (de Man, Rogosa og Sharpe)-medier ble utført i henhold til NMKL No. 140 2nd Ed. (NMKL, 2007). I NMKL metoden stod det at man kunne tilsette Amphotericin B, dette supplementet ble ikke tilsatt ved tillaging av disse mediene. Medier av MRS ble inkubert ved 25 °C i 5 døgn.

Tillaging av *Brochothrix* (STAA agar base)-medier ble utført i henhold til standard for tillaging av «STAA Agar Base» (Oxoid, 2016a). I standarden stod det at man kunne tilsette STAA selektivt supplement med kode enten SR0151 og/eller SR0162. Her ble det tilsatt selektivt supplement SR0162. *Brochothrix*-medier ble inkubert ved 22 °C i 48 timer.

Tillaging av *Pseudomonas*-medier ble utført i henhold til standard for tillaging av «Pseudomonas Agar Base» (Oxoid, 2016b). I standarden kunne man velge mellom CN agar eller CFC agar ved å tilsette henholdsvis CN supplement (SR0102) eller CFC supplement (SR0103). Her ble det tilsatt CFC supplement (SR0103). *Pseudomonas*-medier ble inkubert ved 25 °C i 48 timer.

Tillaging av medier for anaerobe sporedannere ble utført i henhold til NMKL No. 56 4. Ed. (NMKL, 2008). Medier for anaerobe sporedannere ble inkubert ved 15 °C i 5 døgn.

For dyrking av mugg og gjær ble det brukt petrifilm fra Sanita-kun, disse ble kjøpt gjennom Labolytic AS, Norge. Petrifilmene ble brukt i henhold til 3M sin «Interpretation Guide» (3M, 2017). Medier for mugg og gjær ble inkubert ved 25 °C i 48 timer.

For dyrking av *Enterobacteriaceae* ble det brukt petrifilm fra 3M. Petrifilmene ble brukt i henhold til 3M sin «Interpretation Guide» (3M, 2017). Medier for enterobacteriaceae ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

Tillaging av stivelse og ampicillin agar (SAA) ble utført i henhold til NMKL No. 150 3rd ed. (NMKL, 2004). SAA ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

Tillaging av Müller-Hinton-medier ble utført i henhold til standard for tillaging av Müller-Hinton Agar (Oxoid, 2016c). Inkubering av Müller-Hinton medier ble utført ved ulike temperatur og varighet avhengig av de ulike bakteriene som det ble inokulert med (se kap. 3.4, tabell 6).

### 3.6.3 Statistikk

Statistiske forskjeller ble undersøkt ved bruk av dataprogrammet IBM SPSS Statistics Version 25 (SPSS). Det ble laget matriser for de forskjellige forsøkene og dataene ble lagt inn i SPSS. Den analytiske metoden som ble brukt var Univariate General Linear Model (GLM) som er en type To-veis ANOVA. Det ble benyttet post-hoc-test (Tukey) og signifikansnivå på 0,05.

Det ble beregnet korrelasjoner mellom ulike medier og ulike metoder. Disse korrelasjonene ble beregnet ved bruk av Dataanalyseverktøy i Microsoft Excel (Microsoft Excel 2016, Microsoft Corporation, USA).



## 4 RESULTATER

---

### 4.1 RESULTATER AV FYSISKE METODER

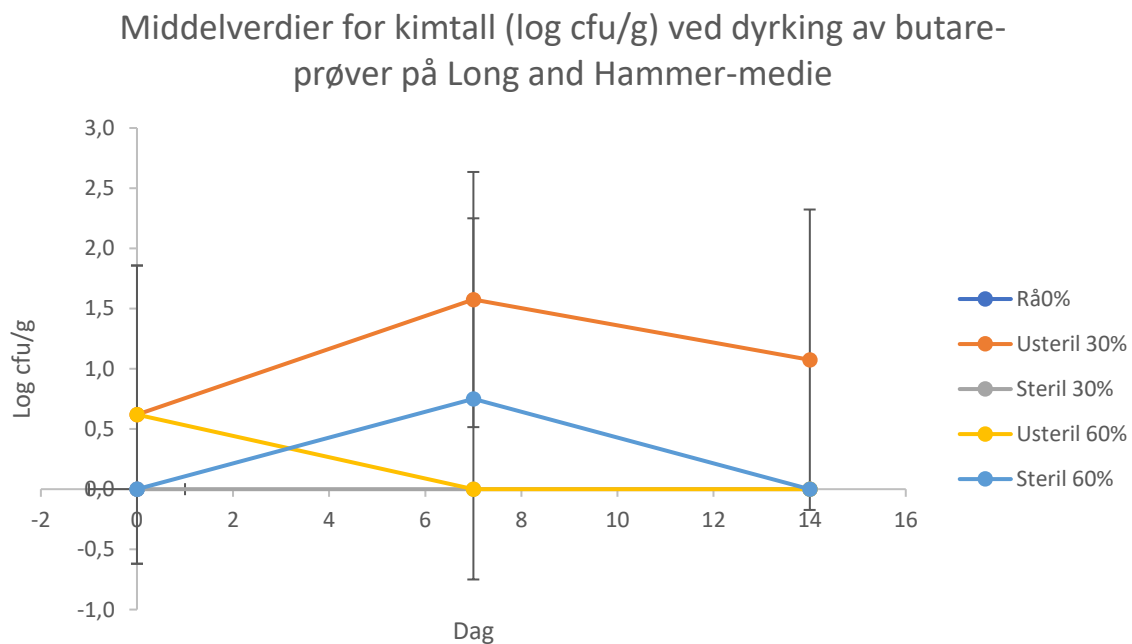
#### 4.1.1 Rehydreringskapasitet

Rehydreringskapasiteten ble funnet å være  $7,38 \pm 0,51$  g vann/g butare for 100% rehydrering, som tilsvarer  $2,21 \pm 0,15$  g vann/g butare og  $4,43 \pm 0,31$  g vann/g butare for henholdsvis 30% og 60% rehydrering.

### 4.2 RESULTATER AV MIKROBIOLOGISKE METODER

#### 4.2.1 Forsøk 1 – Analyser av mikrobiell flora på butare

*Vekst av mikroorganismer ved dyrking på LH-medie*

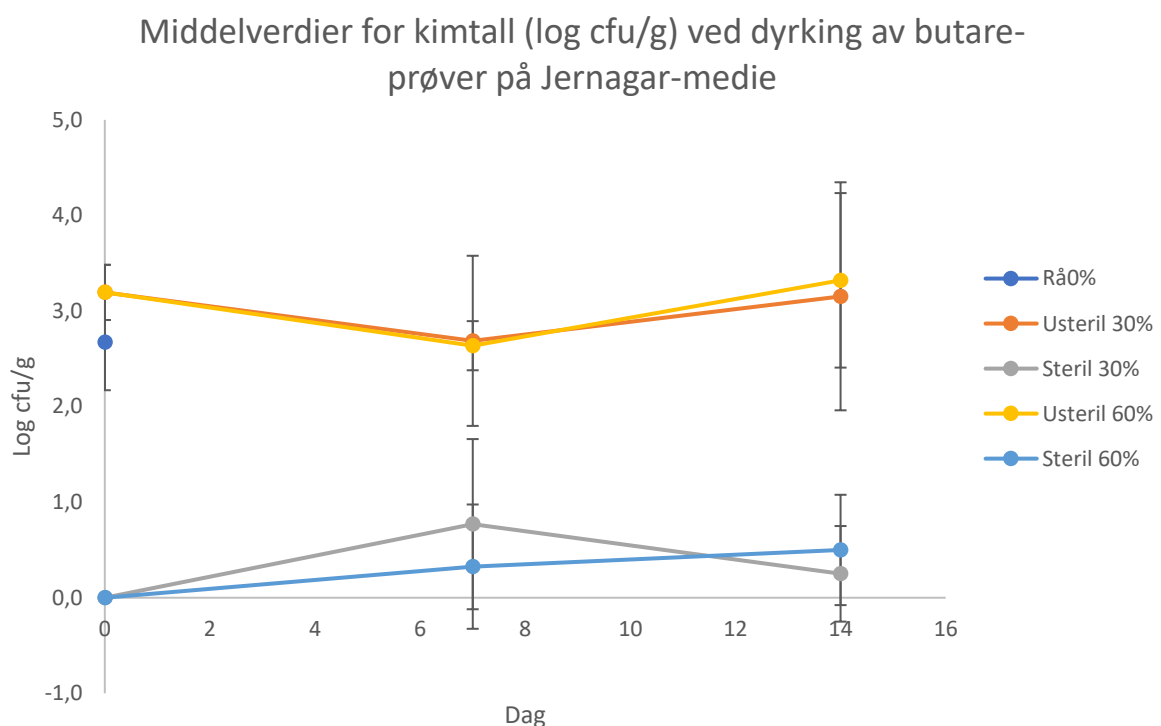


Figur 4: Vekstkurver med gjennomsnittsverdier  $\pm$  SD på kimtall (log cfu/g) ved dyrking av butare-prøver på Long and Hammer-medie (GLM:  $P_{modell} = 0,084$ ,  $P_{gruppe} = 0,015$ ,  $P_{dag} = 0,48$ ).

Algene som gav utslag ved dyrking på LH-medie var usterilisert alge med 30% og 60% rehydrering i tillegg til sterilisert alge med 60% rehydrering. Den totale middelveidien for usterilisert 30% rehydrert butare var  $1,09 \pm 1,15$  log cfu/g. Den totale middelveidien for usterilisert 60% rehydrert butare var  $0,21 \pm 0,72$  log cfu/g. Den totale middelveidien for sterilisert 60% rehydrert butare var  $0,25 \pm 0,87$  log cfu/g.

Middelveidene for dyrking av butare-prøver på LH-medie viste ingen signifikante forskjeller i vekst av mikroorganismer mellom rå alge og de tørkede algene, men til tross for at modellen ikke viste noen signifikante forskjeller det ble funnet en signifikant forskjell mellom «Usteril 30%» og «Steril 30%» ( $P = 0,013$ ). Mikrobiell vekst var altså signifikant høyere for usteril 30% rehydrert alge enn for steril 30% rehydrert alge. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom noen av de andre middelveidene ved dyrking av prøver på LH-medie.

#### Vekst av mikroorganismer ved dyrking på JA-medie



Figur 5: Vekstkurver med middelveidier  $\pm$  SD på kimtall (log cfu/g) ved dyrking av butare-prøver på Jernagar-medie (GLM:  $P_{modell} < 0,001$ ,  $P_{gruppe} < 0,001$ ,  $P_{dag} = 0,58$ ).

Alle butare-gruppene gav utslag ved dyrking på JA-medie. Den totale middelveidien for rå 0% rehydrert butare var  $2,67 \pm 0,50$  log cfu/g. Den totale middelveidien for usterilisert 30% rehydrert butare var  $3,01 \pm 0,83$  log cfu/g. Den totale middelveidien for sterilisert 30% rehydrert butare var  $0,34 \pm 0,63$  log cfu/g. Den totale middelveidien for usterilisert 60% rehydrert butare var  $3,05 \pm 0,60$  log cfu/g. Den totale middelveidien for sterilisert 60% rehydrert butare var  $0,28 \pm 0,50$  log cfu/g.

Prøver av rå alge var signifikant høyere enn både 30% og 60% rehydrert sterilisert butare ( $P < 0,001$  for begge) ved dyrking på JA-medie. De usterile algene hadde signifikant høyere kimtall enn de sterile algene ( $P < 0,001$  for alle kombinasjoner) ved dyrking på JA-medie.

#### *Vekst av mikroorganismer ved dyrking på MRS-medie*

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom de ulike butare-prøvene ved dyrking på MRS-medie.

#### *Vekst av mikroorganismer ved dyrking på Enterobacteriaceae-medie*

Ingen av prøvene gav vekst ved dyrking på Enterobacteriaceae-medie.

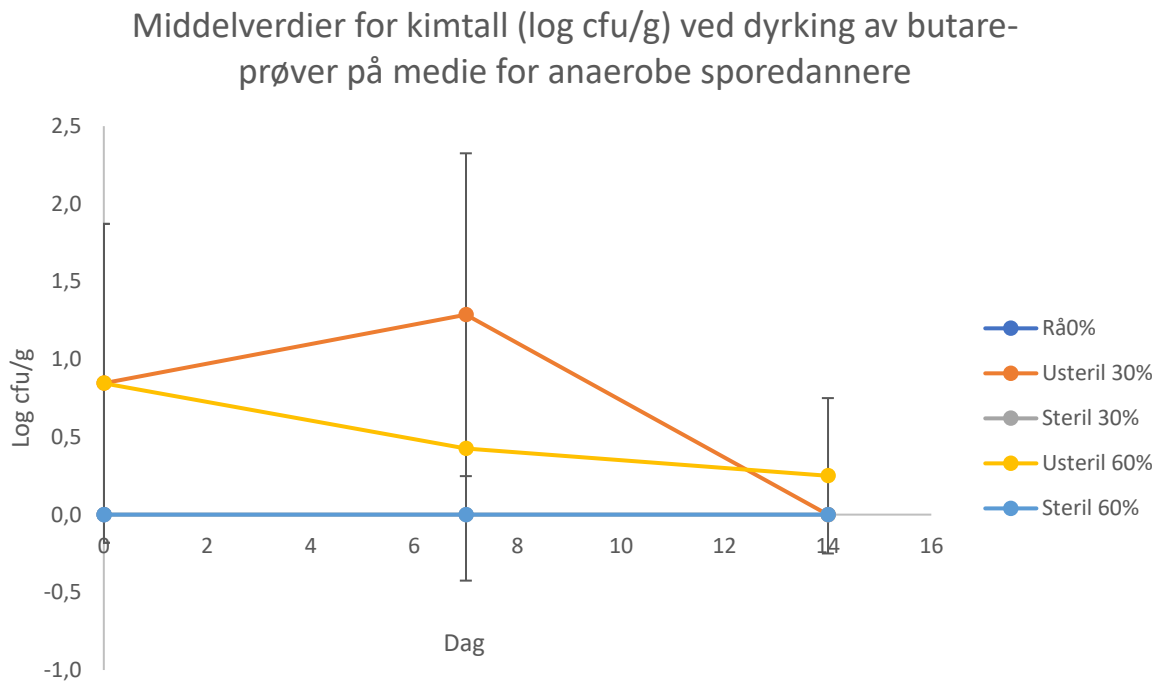
#### *Vekst av mikroorganismer ved dyrking på Brochothrix-medie*

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom de ulike butare-prøvene ved dyrking på Brochothrix-medie.

#### *Vekst av mikroorganismer ved dyrking på Pseudomonas-medie*

Ingen av prøvene gav vekst ved dyrking på Pseudomonas-medie.

## Vekst av mikroorganismer ved dyrking på medie for anaerobe sporedannende bakterier



Figur 6: Vekstkurver med middelerdier  $\pm$  SD på kimtall (log cfu/g) ved dyrking av butare-prøver på Jernagar-medie (GLM:  $P_{modell} = 0,020$ ,  $P_{gruppe} < 0,0071$ ,  $P_{dag} = 0,13$ ).

Bare de usteriliserte algene gav utslag ved dyrking på medie for anaerobe sporedannere.

Den totale middelerdien for usterilisert 30% rehydrert butare var  $0,71 \pm 0,94$  log cfu/g. Den totale middelerdien for usterilisert 60% rehydrert butare var  $0,51 \pm 0,79$  log cfu/g.

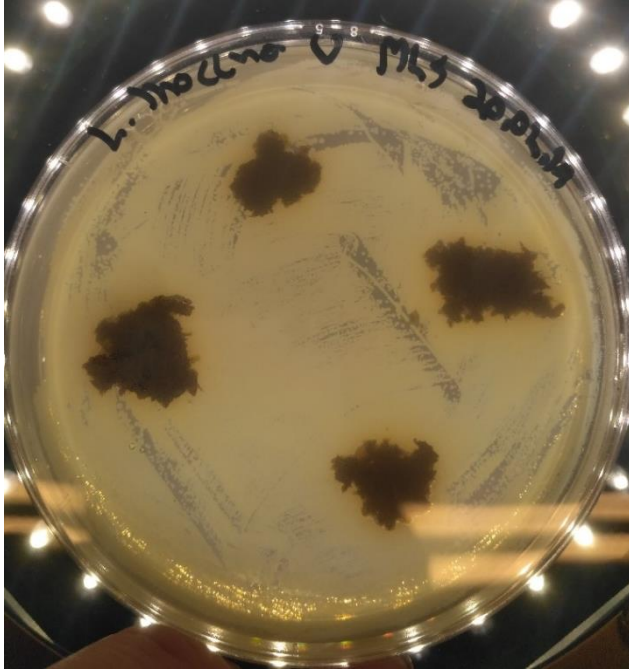
Usteril 30% rehydrert alge var signifikant høyere enn både 30% og 60% rehydrert steril alge ( $P = 0,029$  for begge) ved dyrking på medie for anaerobe sporedannere.

## Vekst av mikroorganismer ved dyrking på medie for mugg og gjær

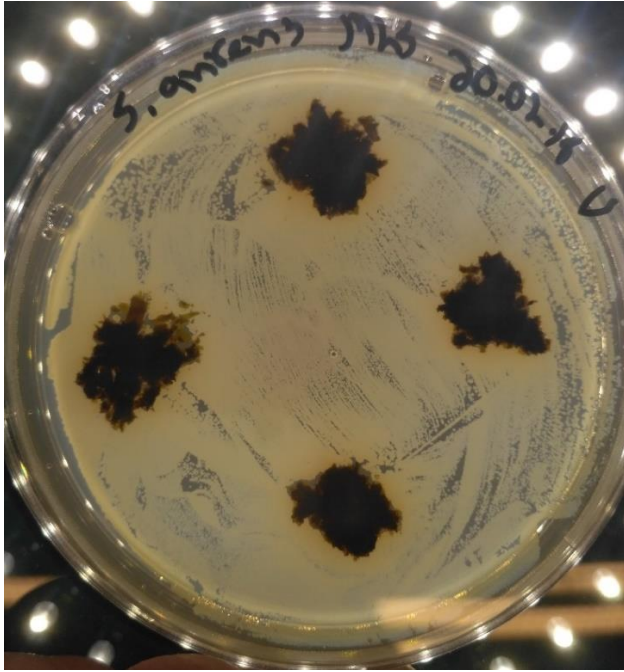
Ingen av prøvene gav vekst ved dyrking på medie for mugg og gjær.

#### 4.2.2 Forsøk 2 – Antimikrobiell effekt av butare

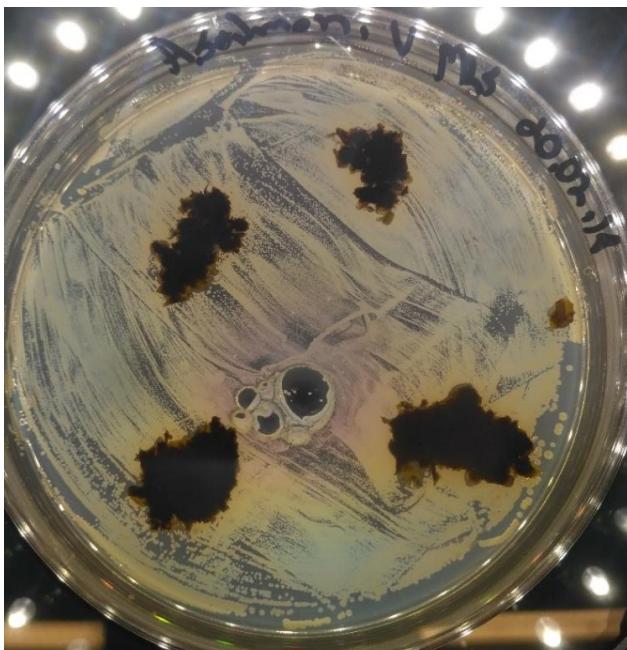
De antimikrobielle testene viste ingen tegn på hemmende effekter på bakteriell vekst. Det ble ikke funnet bakteriefrie soner i nærheten av algene på noen av skålene. Dette er vist med tre eksempler, se bilde 1 – 3.



Bilde 1: Bilde av petriskål med Müller Hinton-agar inokulert med *Listeria innocua*. De mørke bitene er klumper av butare-alge lagt på mediet etter inokulenten hadde blitt tilført. Bildet viser ingen tegn til bakteriefrie soner rundt algene.



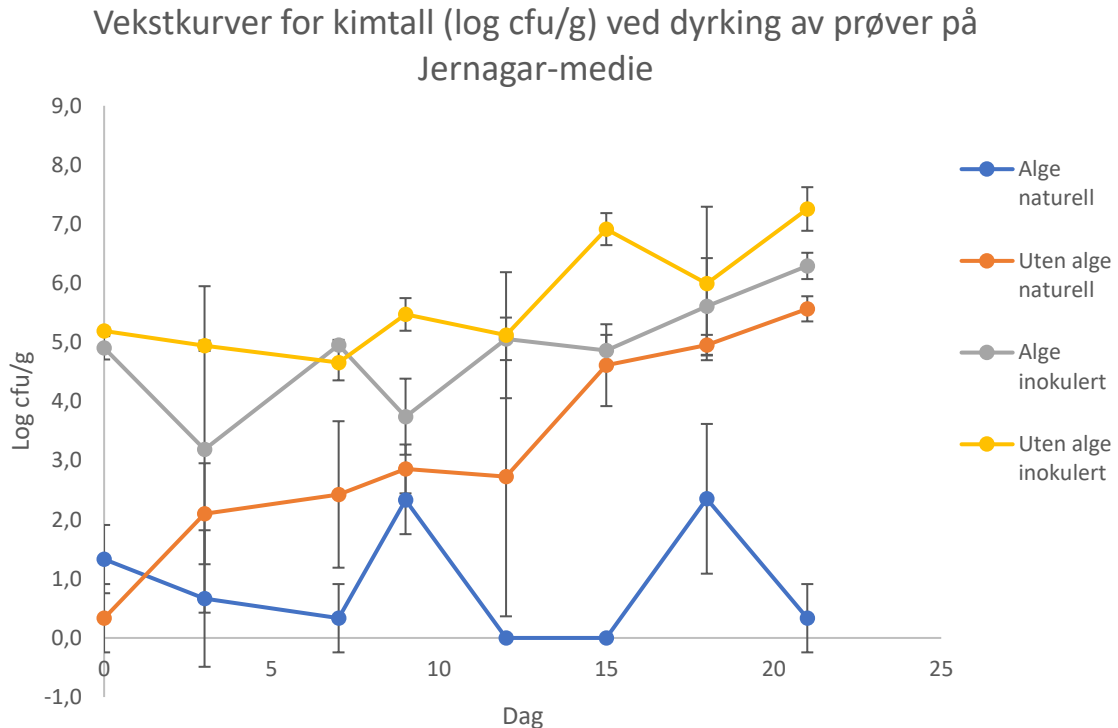
Bilde 2: Bilde av petriskål med Müller Hinton-agar inokulert med *Staphylococcus aureus*. De mørke delene er klumper av butare-alge lagt på mediet etter inokulenten hadde blitt tilført. Bildet viser ingen tegn til bakteriefrie soner rundt algene.



Bilde 3: Bilde av petriskål med Müller Hinton-agar inokulert med *Aeromonas salmonicida* (samme bakterie som det ble inokulert med i forsøk 3). De mørke delene er klumper av butare-alge lagt på mediet etter inokulenten hadde blitt tilført. Bildet viser ingen tegn til bakteriefrie soner rundt algene.

#### 4.2.3 Forsøk 3 – Lagringsforsøk med butare som aktiv absorbent for pakking av et filetprodukt av atlantisk laks

##### Vekst av mikroorganismer ved dyrking på JA-medie



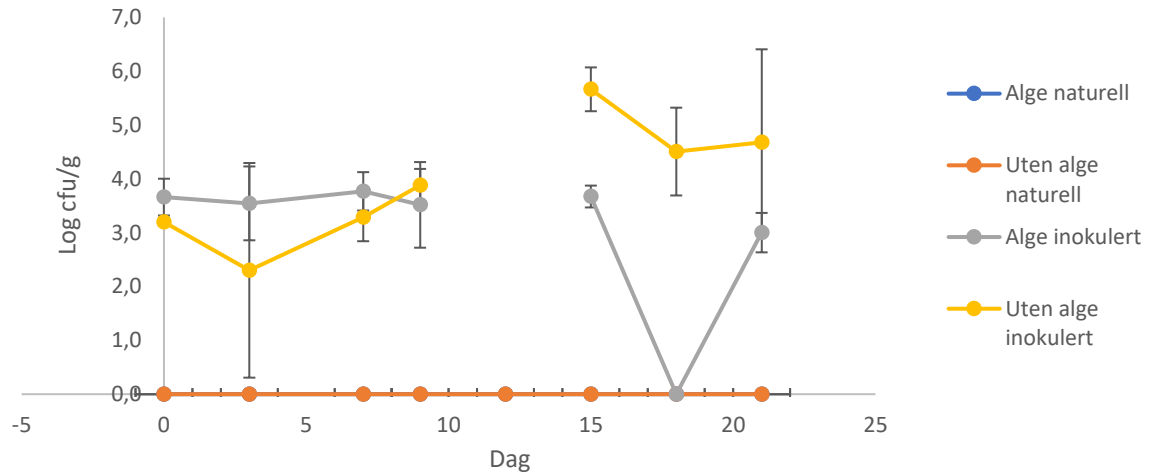
Figur 7: Middelerdier  $\pm$  SD for kimtall (log cfu/g) ved dyrking av prøver (laks lagret med og uten alge) på Jernagar medie (GLM:  $P_{\text{modell}} < 0,001$ ,  $P_{\text{gruppe}} < 0,001$ ,  $P_{\text{dag}} < 0,001$ ).

Alle gruppene gav utslag ved dyrking på JA-medie. Total middelerdi for «alge naturell» var  $0,92 \pm 1,11$  log cfu/g. Total middelerdi for «uten alge naturell» var  $3,20 \pm 1,88$  log cfu/g. Total middelerdi for «alge inokulert» var  $4,83 \pm 1,29$  log cfu/g. Total middelerdi for «uten alge inokulert» var  $5,69 \pm 1,05$  log cfu/g.

Middelerdier for kimtall ved dyrking på JA-medie var signifikant lavere for «Alge naturell» enn tilsvarende verdier for «Uten alge naturell» ( $P < 0,001$ ). Middelerdier for kimtall ved dyrking på JA-medie var signifikant lavere for «Alge inokulert» enn tilsvarende verdier for «Uten alge inokulert» ( $P = 0,0068$ ).

## Vekst av mikroorganismer ved dyrking på SAA-medie

### Vekstkurver for kimtall (log cfu/g) ved dyrking av prøver på stivelse og ampicillin agar



Figur 8: Middelerverdi  $\pm$  SD for kimtall (log cfu/g) ved dyrking av prøver (laks lagret med og uten alge) på stivelse og ampicillin-medie (GLM:  $P_{\text{modell}} < 0,001$ ,  $P_{\text{gruppe}} < 0,001$ ,  $P_{\text{dag}} < 0,001$ ).

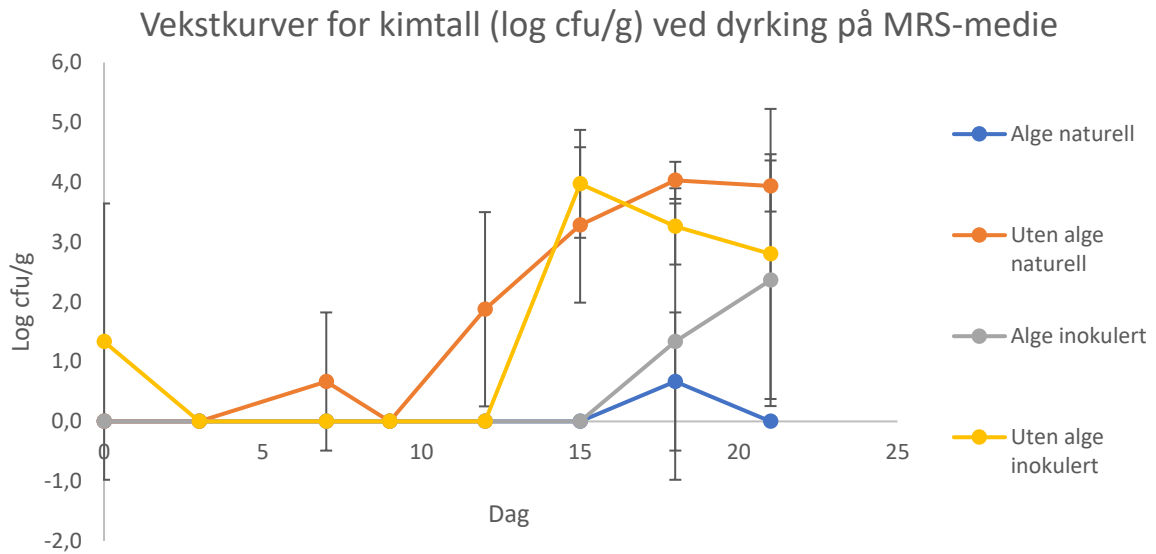
Verdiene for «alge inokulert» og «uten alge inokulert» på dag 12 ble fjernet fra datasettet. Årsaken til dette spesifiseres i kap. 5.

Det var bare gruppene «alge inokulert» og «uten alge inokulert» som gav utslag ved dyrking på SAA-medie. Total middelerverdi for «alge inokulert» var  $3,00 \pm 1,36$  log cfu/g. Total middelerverdi for «uten alge inokulert» var  $3,93 \pm 1,43$  log cfu/g.

Verdier for kimtall ved dyrking på SAA-medie var signifikant lavere for «Alge inokulert» enn «Uten alge inokulert» ( $P < 0,001$ ).



## Vekst av mikroorganismer ved dyrking på MRS-medie



Figur 9: Middelerverdi  $\pm$  SD for kimtall (log cfu/g) ved dyrking av prøver (laks lagret med og uten alge) på MRS-medie (GLM:  $P_{\text{modell}} < 0,001$ ,  $P_{\text{gruppe}} < 0,001$ ,  $P_{\text{dag}} < 0,001$ ).

Alle gruppene gav utslag ved dyrking på MRS-medie. Total middelerverdi for «alge naturell» var  $0,083 \pm 0,41$  log cfu/g. Total middelerverdi for «uten alge naturell» var  $1,72 \pm 1,86$  log cfu/g. Total middelerverdi for «alge inokulert» var  $0,46 \pm 1,26$  log cfu/g. Total middelerverdi for «uten alge inokulert» var  $1,42 \pm 1,92$  log cfu/g.

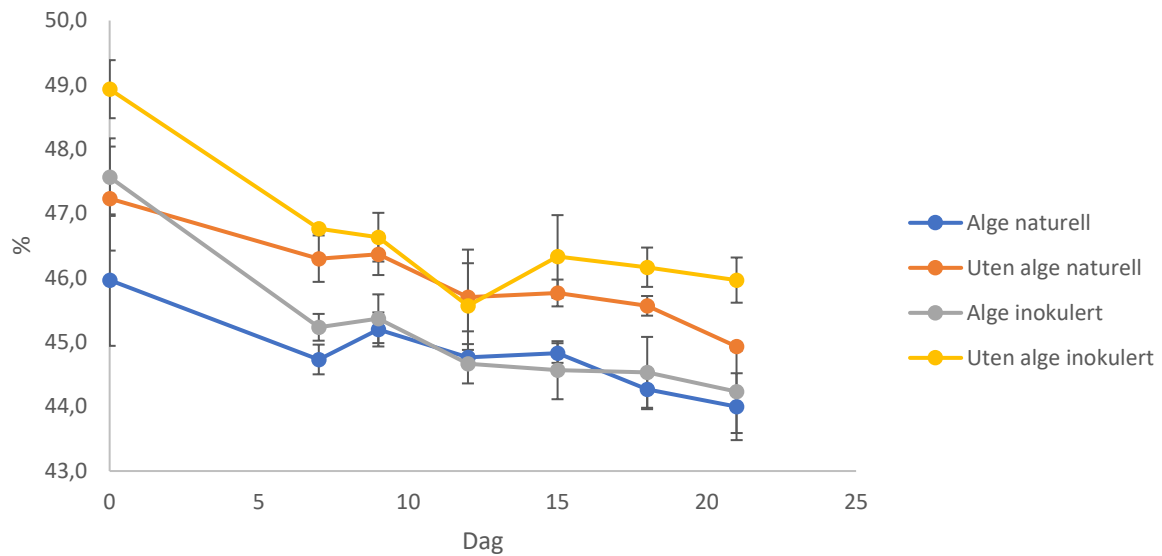
Verdier for kimtall ved dyrking på MRS-medie var signifikant lavere for «Alge naturell» enn «Uten alge naturell» ( $P < 0,001$ ). Verdier for kimtall ved dyrking på MRS-medie var signifikant lavere for «Alge inokulert» enn «Uten alge inokulert» ( $P = 0,0052$ ).

### Gasskonsentrasjon ved prosessering og uttak

Gasskonsentrasjonene som ble målt ved prosessering av prøvene til forsøk 3 viste en middelerverdi på  $0,25 \pm 0,27\%$  for  $O_2$ ,  $50,75 \pm 0,88\%$  for  $CO_2$  og  $49,01 \pm 0,65\%$  for  $N_2$ .

Ved uttak ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller på konsentrasjonene av  $O_2$ , men det ble funnet signifikante forskjeller på konsentrasjonene av  $CO_2$  og  $N_2$  (GLM:  $P_{\text{modell}} < 0,001$ ,  $P_{\text{gruppe}} < 0,001$ ,  $P_{\text{dag}} < 0,001$ ).

### Gasskonsentrasjon av CO<sub>2</sub> ved uttak av laks lagret med og uten alge (Butare)

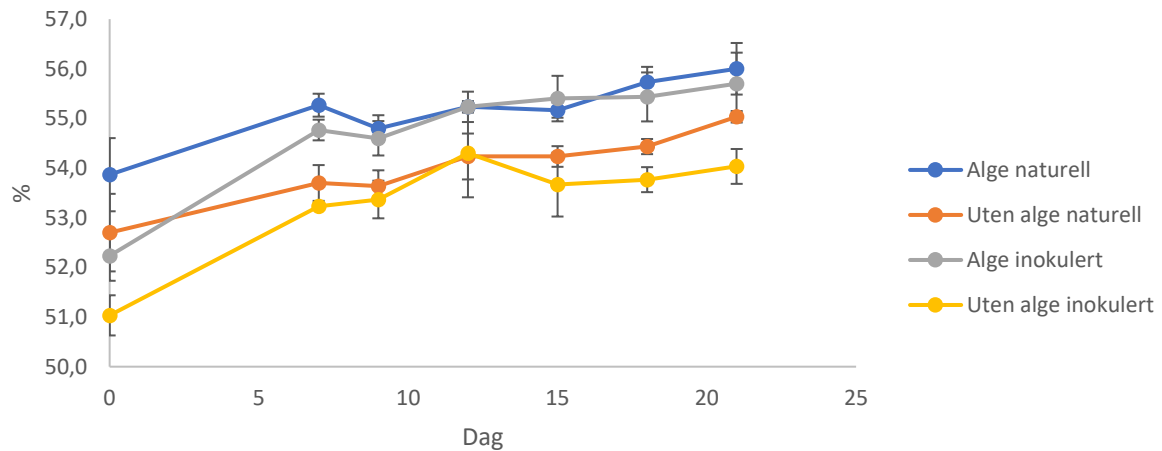


Figur 10: Gasskonsentrasjon av CO<sub>2</sub> ved uttak av laks lagret med og uten alge (butare) (GLM: P<sub>modell</sub> < 0,001, P<sub>gruppe</sub> < 0,001, P<sub>dag</sub> < 0,001).

Den totale gasskonsentrasjonen av CO<sub>2</sub> ved uttak av «alge naturell» var 44,82 ± 0,72%. Den totale gasskonsentrasjonen av CO<sub>2</sub> ved uttak av «uten alge naturell» var 45,98 ± 0,78%. Den totale gasskonsentrasjonen av CO<sub>2</sub> ved uttak av «alge inokulert» var 45,17 ± 1,14%. Den totale gasskonsentrasjonen av CO<sub>2</sub> ved uttak av «uten alge inokulert» var 46,62 ± 1,12%.

Gasskonsentrasjonen av CO<sub>2</sub> ved uttak av «alge naturell» og «alge inokulert» var signifikant lavere enn ved uttak av «uten alge naturell» og «uten alge inokulert» (P < 0,001 for alle). I tillegg var gasskonsentrasjonen av CO<sub>2</sub> ved uttak av «uten alge naturell» signifikant lavere enn ved uttak av «uten alge inokulert» (P < 0,001).

### Gasskonsentrasjon av N<sub>2</sub> ved uttak av laks lagret med og uten alge (butare)



Figur 11: Gasskonsentrasjon av N<sub>2</sub> ved uttak av laks lagret med og uten alge (butare) (GLM: P<sub>modell</sub> < 0,001, P<sub>gruppe</sub> < 0,001, P<sub>dag</sub> < 0,001).

Den totale gasskonsentrasjonen av N<sub>2</sub> ved uttak av «alge naturell» var 55,15 ± 0,73%. Den totale gasskonsentrasjonen av N<sub>2</sub> ved uttak av «uten alge naturell» var 54,00 ± 0,78%. Den totale gasskonsentrasjonen av N<sub>2</sub> ved uttak av «alge inokulert» var 54,77 ± 1,18%. Den totale gasskonsentrasjonen av N<sub>2</sub> ved uttak av «uten alge inokulert» var 53,34 ± 1,11%.

Gasskonsentrasjonen av N<sub>2</sub> ved uttak av «alge naturell» og «alge inokulert» var signifikant høyere enn ved uttak av «uten alge naturell» og «uten alge inokulert» (P < 0,001 for alle). I tillegg var gasskonsentrasjonen av N<sub>2</sub> ved uttak av «uten alge naturell» signifikant høyere enn ved uttak av «uten alge inokulert» (P < 0,001).

### Observasjoner

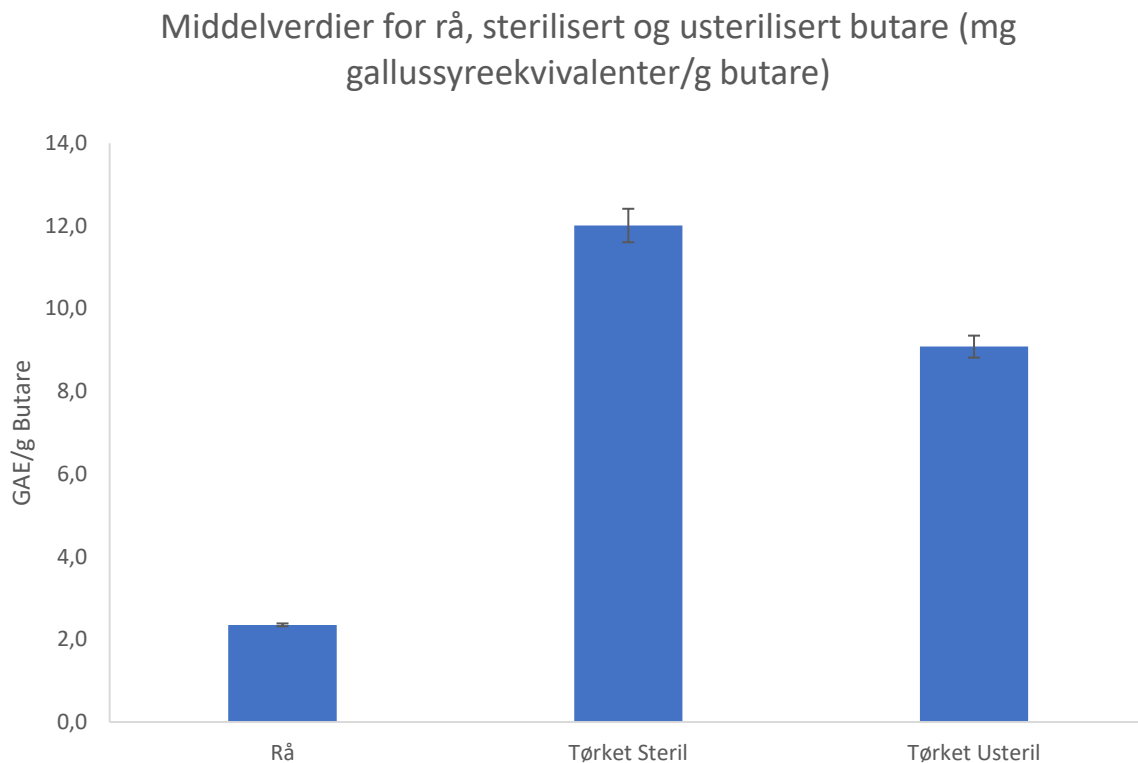
Fargeforskjeller ble observert på laksen ved uttak 6 dag 15 i forsøk 3. Disse fargeforskjellene ble også observert ved uttak 7 og 8. Fargeforskjellene ble observert på både inokulert og naturell laks.



Bilde 4: Bilde av laks uten alge (til venstre) og med alge (til høyre). Bildet illustrerer fargeforskjeller som ble observert på laks inokulert med *Aeromonas salmonicida* ved uttak 7 dag 18 i forsøk 3.

## 4.3 RESULTATER AV KJEMISKE METODER

### 4.3.1 Total fenol



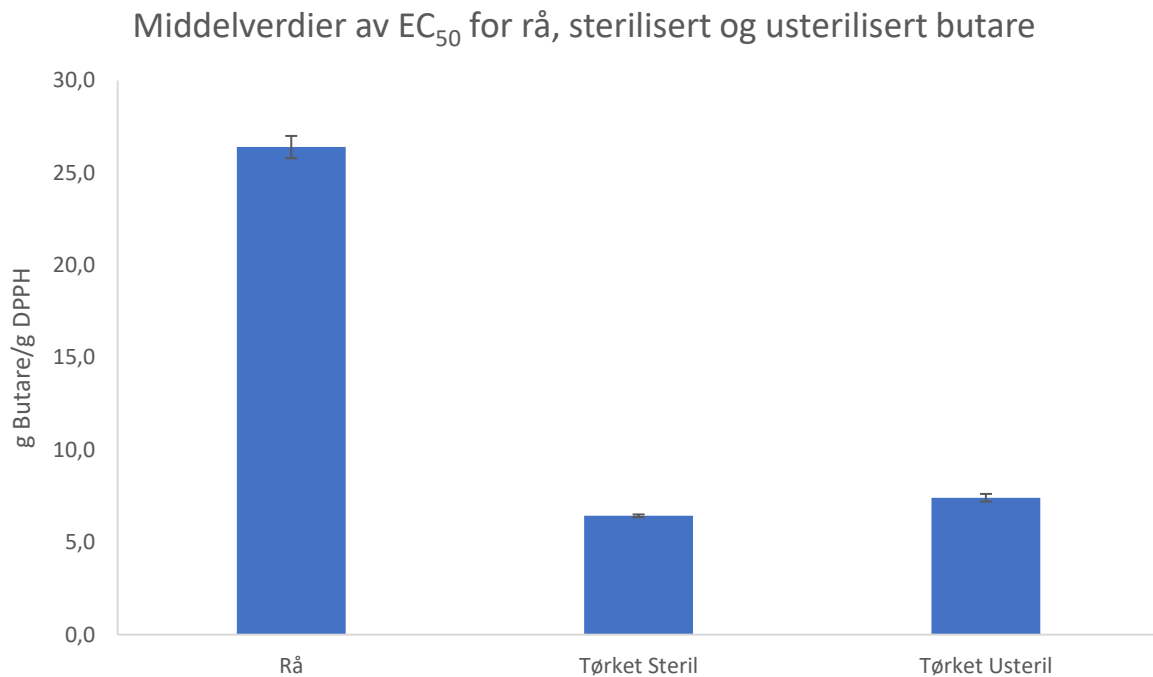
Figur 12: Middelverdier  $\pm$  SD av gallussyreekvivalenter/g ekstrakt for rå, sterilisert og usterilisert butare (GLM:  $P_{modell} < 0,001$ ,  $P_{gruppe} < 0,001$ ).

Middelverdien for total fenol i rå butare ble funnet til å være  $2,35 \pm 0,034$  GAE/g butare.

Middelverdien for total fenol i sterilisert butare ble funnet til å være  $12,01 \pm 0,40$  GAE/g butare. Middelverdien for total fenol i usterilisert butare ble funnet til å være  $9,08 \pm 0,27$  GAE/g butare.

Det ble funnet signifikante forskjeller (GLM:  $P_{modell} < 0,001$ ,  $P_{gruppe} < 0,001$ ) mellom GAE for rå, steril og usteril butare. Totalfenol i rå butare var signifikant lavere enn både sterilisert og usterilisert butare ( $P < 0,001$  for begge). Total fenol i sterilisert butare var signifikant høyere enn usterilisert butare ( $P < 0,001$ ).

### 4.3.2 Antioksidantkapasitet



Figur 13: Middelverdier  $\pm$  SD av  $EC_{50}$  for rå, sterilisert og usterilisert butare.

Middelverdien for  $EC_{50}$  i rå butare ble funnet til å være  $26,40 \pm 0,61$  g butare/g DPPH.

Middelverdien for  $EC_{50}$  i sterilisert butare ble funnet til å være  $6,44 \pm 0,074$  g butare/g DPPH.

Middelverdien for  $EC_{50}$  i usterilisert butare ble funnet til å være  $7,41 \pm 0,21$  g butare/g DPPH.

Det ble funnet signifikante forskjeller (GLM:  $P_{modell} < 0,001$ ,  $P_{gruppe} < 0,001$ ) mellom  $EC_{50}$ -verdiene for rå, sterilisert og usterilisert butare.  $EC_{50}$ -verdiene for rå butare var signifikant høyere enn verdiene for både sterilisert og usterilisert butare ( $P < 0,001$  for begge).  $EC_{50}$ -verdiene for sterilisert butare var signifikant lavere enn for usterilisert butare ( $P = 0,041$ ).

## 5 DISKUSJON

---

I forsøk 3 ble det funnet signifikante forskjeller mellom prøvene med og uten alge ved dyrking på JA. Hvis vi ser på vekstkurven (figur 7) ser vi at den tydeligste forskjellen er mellom de naturlige prøvene. Det er en betydelig større vekst av mikroorganismer på prøvene uten alge enn prøvene med alge. Dette er en positiv indikasjon på at algene kan øke holdbarheten på laks. Det ble også funnet signifikante forskjeller mellom de inokulerte prøvene. Vekstkurven viser at inokulerte prøver med og uten alge har relativt høye kimtall, men det er ikke like store forskjeller som for de naturlige prøvene. De høye kimtallene skyldes sannsynligvis de inokulerte *Aeromonas salmonicida* bakteriene. Det faktum at det ikke er like store forskjeller mellom de inokulerte prøvene som mellom de naturlige prøvene kan tyde på at algene ikke har særlig god antimikrobiell effekt på *A. salmonicida*, til tross for at det ble funnet signifikante forskjeller mellom gruppene «Alge inokulert» og «Uten alge inokulert». Resultatene fra forsøk 2 viste også at algen ikke hadde noen effekt på veksten av *A. Salmonicida* (se bilde 4). I tillegg gjennomførte Bansemir, Blume, Schröder, and Lindequist (2006) en undersøkelse der ingen av brunalgene, blant annet sukkertare (*L. saccharina*), hadde antimikrobiell effekt mot *A. salmonicida*. Mange rødalger (*Rhodophyceae*) viste derimot antimikrobiell effekt mot blant annet *A. salmonicida* (Bansemir et al., 2006).

I forsøk 3 ble det også funnet signifikante forskjeller mellom prøver med og uten alger ved dyrking på SAA. Dette mediet skal gi gode vekstvilkår for *A. salmonicida* og koloniene som blir funnet her antas å være fra inokulanten. Vekstkurven for SAA i forsøk 3 (figur 8) viser at det ble fjernet data for «alge inokulert» og «uten alge inokulert» på dag 12 fra datasettet. Grunnen til dette var mistanke om feil med SAA-mediet som ble brukt til uttak denne dagen. SAA-mediene som ble brukt dag 12 var mye rødere i fargen enn de mediene som hadde blitt brukt tidligere. Dette kan tyde på at det hadde blitt brukt for mye fenolrødt ved tillaging av mediene. I tillegg gav disse mediene ingen vekst på noen av prøvene, noe som førte til utslag på signifikansnivået mellom prøver med alge og uten alge. Hadde dataene ikke blitt fjernet ville det ikke vært signifikant forskjell på inokulerte prøver med og uten alge. Med slike resultater er det vanskelig å konkludere med at *A. salmonicida* vokser dårligere på prøver med alge. Spesielt når andre analyser tilsier at algen ikke har noen effekt på denne bakterien. Det kan foreslås at dette forsøket kan gjøres på nytt uten noen endringer i designet, bare det sørges for at den samme feilen med mediene ikke gjentas. Dersom man

tar utgangspunkt i resultatene slik de er nå ser man at algene har hemmet veksten av *A. salmonicida* i signifikant grad ( $P < 0,001$ ). Vekstkurven (figur 8) viser at de inokulerte prøvene fra dag 0 til og med 9 har ganske like verdier for kimtall ved dyrking på SAA-medie, men ved dag 15 til og med dag 21 er det større forskjeller.

Ser vi på vekstkurven for prøver dyrket på MRS-medie i forsøk 3 (figur 9) er det nesten ingen vekst for prøvene med alge. Prøvene uten alge har derimot relativt høy vekst i forhold til prøvene med alge. Vi ser at prøvene med alge ser ut til å få en økning i vekst fra dag 18 og prøvene uten alge får en økende vekst rundt dag 12. Det kan tyde på at algene fører til en forsinkelse i veksten av melkesyrebakterier. Det ble også funnet en korrelasjon på 0,86 mellom verdiene for inokulerte prøver uten alge dyrket på SAA og MRS medie. Dette kan tyde på at det er *A. salmonicida* som vokser på MRS mediet og ikke melkesyrebakterier.

I forsøk 1 ble det funnet signifikante forskjeller mellom sterilisert, usterilisert og rå butare ved dyrking på LH-medie, JA-medie og medie for anaerobe sporedannere. Dersom vi ser på resultatene ved dyrking på LH-medie (se kap. 4.2.1) er det ikke signifikant forskjell i modellen. På bakgrunn av at modellen ikke viser signifikante forskjeller basert på designet skal man være forsiktig med å trekke en bastant konklusjon her. Vekstkurven for dyrking på JA-medie (figur 5) viser at det er tilnærmet ingen mikroorganismer på de steriliserte prøvene mens det er betydelig høyere antall mikroorganismer på rå og usteriliserte. Dette kan brukes som et argument for at man bør sterilisere alger dersom man skal bruke dem til å forbedre holdbarhet eller mattryggheten for matvarer. JA og LH er generelle medier og disse resultatene sier lite om hvilke mikroorganismer som finnes på algene. Resultatene fra mediene for anaerobe sporedannere kan tyde på at det finnes mikroorganismer med evner til å danne sporer på de usteriliserte prøvene.

De antimikrobielle testene viste ikke noen tegn til antimikrobiell effekt. Det var ikke forventet at algen skulle ha antibakteriell effekt på alle bakteriene, men tidligere forsøk (ikke publisert) som har blitt gjennomført med butare-ekstrakter viste bakteriefrie soner ved inokulering med noen av bakteriestammene som ble brukt her. Ingen antibakteriell effekt kan tyde på for gode vekstvilkår for bakteriene. Det kan for eksempel være at bakteriefloraen har etablert seg såpass godt i TSB-mediet at de ikke hindres i stor nok grad av antimikrobielle stoffer fra algen. Det kan også skyldes at de antimikrobielle stoffene i



algen ikke er tilgjengelige i tilstrekkelig grad. Antimikrobielle stoffer kan være bundet opp i algen slik at de ikke fungerer på samme måte som når de blir ekstrahert fra algen.

Resultatene viser at mange av verdiene for kimtall har store standardavvik. Dette skyldes store variasjoner i veksten av de ulike prøvene. Prøver som har gitt indikasjoner på økende vekst har ved flere anledninger vist redusert vekst ved neste uttak. Dette gjorde det vanskelig å forutse veksten på de ulike prøvene. Disse svingningene i vekst kan skyldes feilkilder som for eksempel kontaminasjoner fra uønskede kilder, defekte medier eller feil ved tillaging av medier. Det kan også skyldes feil ved prosessering av prøver, som for eksempel kontaminert utstyr ved filetering av laksen eller ved overføring av alger til plastskålene.

En annen feilkilde som kan ha påvirket veksten på de ulike mediene er forskjellene i gasskonsentrasjon som ble målt ved uttak av prøvene i forsøk 3. Resultatene viser at det er signifikante forskjeller i konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> mellom prøver med og uten alge. Grunnen til disse forskjellene er sannsynligvis vannet som ble tilsatt ved rehydrering av algene. Dette vannet gjør at prøvene med alge har bedre evne til å løse CO<sub>2</sub> fra atmosfæren i pakningene. Hvis vi ser nærmere på konsentrasjonene av CO<sub>2</sub> ser vi at det dreier som en forskjell på ca. 1-2%. Det er vanskelig å si hvor mye en slik forskjell har å si for veksten av mikroorganismer.

Figur 12 viser et betydelig høyere innhold av GAE for de frysetørkede algene enn for rå alge. I tillegg ser vi at figur 13 viser at EC<sub>50</sub> verdiene for de frysetørkede algene er mye lavere enn for rå alge. Verdiene for GAE og EC<sub>50</sub> har en korrelasjon på -0,97. Dette betyr at verdiene for total fenol er nesten perfekt negativt korrelert med verdiene for EC<sub>50</sub>. Resultatene viser at tørkede alger har høyere total fenol og bedre antioksidantkapasitet enn rå alger. Dette skyldes mest sannsynlig at man får knust algene bedre med mortar og pistill når de er tørket. Dermed får man en mer effektiv separasjon av fenoler fra algemassen videre i ekstraksjonsprosessen. De høyeste verdiene for total fenol er ved sterilisert tørket alge. Middelveiden for sterilisert tørket alge er 12,01±0,40 mg GAE/g tørket butare, dette er ca. 25% høyere enn middelveiden for usterilisert alge. Grunnen til denne forskjellen kan skyldes endringer i molekylstrukturen ved gammabestrålingen av algene. Dersom gammabestrålingen fører til en polarisering av molekylene i algen vil det føre til bedre ekstraksjon med metanol:vann på grunn av polariteten til dette løsemiddelet. I følge Chandini, Ganesan, and Bhaskar (2008) hadde brunalgene *Sargassum marginatum*, *Padina*

*tetrastomatica* og *Turbinaria conoides* henholdsvis totale fenolverdier på  $11,00 \pm 0,10$ ,  $11,10 \pm 0,19$  og  $29,01 \pm 0,50$  (mg GAE/g ekstrakt) (Chandini et al., 2008). Dersom resultatene for sterilisert tørket butare transformeres til mg GAE per g ekstrakt får vi verdien  $1,33 \pm 0,05$  mg GAE/g ekstrakt. Vi ser altså at verdiene for butare ligger rundt 10 ganger lavere enn verdiene for *S. marginatum* og *P. tetrastomatica*. Dette kan skyldes ulike ekstraksjonsmetoder, utstyr og ulike konsentrasjoner av reagenser. Nwosu et al. (2011) har funnet fenolinnholdet av *A. esculenta* ved tre ulike ekstraksjonsmetoder og resultatene viser vidt forskjellige verdier. Verdiene for de tre ulike ekstraksjonsmetodene strekker seg fra  $28,0 \pm 0,5$   $\mu\text{g/g}$  tørrvekt til  $114,65$   $\mu\text{g/g}$  tørrvekt (Nwosu et al., 2011). Dette bekrefter at ulike ekstraksjonsmetoder kan gi svært ulike resultater. I følge Wang, Jónsdóttir, and Ólafsdóttir (2009) har *A. esculenta* et relativt lavt innhold av fenoler i forhold til andre brunalgearter, her nevnes det også at *A. esculenta* er blant artene med svak radikal «scavenging» evne. Wang et al. (2009) oppgir antioksidantkapasitet i «antiradical power» (ARP,  $\text{ARP}=1/\text{EC}_{50}$ ). Regner vi om til ARP-verdi for «tørket sterilisert alge» får vi  $0,16 \pm 0,0018$ . Dette er omtrent 600 ganger svakere enn ARP-verdien for *Fucus vesiculosus* (som var den algen med høyest ARP-verdi), men det er også omtrent 60 ganger svakere enn verdiene (Wang et al., 2009) fant for *A. esculenta* (Wang et al., 2009). Disse forskjellene kan skyldes ulike ekstraksjonsmetoder, utstyr, utregningsmetoder og ulike konsentrasjoner av reagenser. Det brukes utallige måter å finne verdier for total fenol og antioksidant kapasitet. Forskjellig bruk av ulike reagenser, kalibreringskurver, konsentrasjoner og forskjellige innstillinger på utstyr gjør det vanskelig å sammenligne resultater fra ulike undersøkelser. Det blir derfor vanskelig å konkludere med annet enn det som er gjennomført innad i denne undersøkelsen.

Det ble også oppdaget synlige endringer på laksen ved lagringsforsøk (se bilde 4).

Fargeforskjeller ble observert på laksen ved uttak 6 dag 15 i forsøk 3. Disse fargeforskjellene ble også observert ved uttak 7 og 8. Fargeforskjellene ble observert på både inokulert og naturell laks. Dette kan skyldes en form for depigmentering. Vi har derimot ikke utført noen analyse som kan støtte opp under dette, men det kan eventuelt utføres i ettertid da sekundære prøver er lagret på  $-80$  °C i fryser.

## 6 KONKLUSJON

---

Basert på resultatene har vi konkludert med at den steriliserte algen hadde lavere kimtall enn både rå og tørket usterilisert alge. Dersom butare skal brukes for å minimere risikoen for mikrobiell kontaminasjon vil det være best å både tørke og sterilisere algen før den brukes. Dette på grunn av at butaren viser tegn til å inneholde en naturlig bakterieflora, noe som bekrefter hypotese nr. 2 (se kap. 1).

Vi kan videre konkludere med at butare har en antimikrobiell effekt på den generelle floraen hos et filetprodukt av atlantisk laks. Butare viste også tegn til å ha en antimikrobiell effekt på *A. salmonicida*, men det bør gjøres videre forskning for å fastslå dette nærmere. I tillegg viste butaren tegn til å utsette veksten av melkesyrebakterier, uten at vi kan konkludere med dette. Dette fordi vi ikke vet om det er *A. salmonicida* som har vokst opp på MRS-medier.

Fra de kjemiske testene kan man konkludere med at ekstrakter av sterilisert og tørket butare vil gi høyere utbytte av fenoler enn ekstrakt av rå butare eller butare som bare er tørket.

Man kan også konkludere med at ekstrakter av sterilisert og tørket butare vil ha bedre evne til å binde opp frie radikaler enn ekstrakt av rå butare eller butare som bare er tørket.

Hypotese nr. 1 (se kap. 1) er bekreftet fordi vi ser at alle butare-prøvene inneholder fenoler og de har antioksidierende egenskaper.

Hypotese nr. 3 er ikke bekreftet fordi vi ikke kan si med sikkerhet at en absorbent av butare kan øke holdbarheten ved modifisert atmosfære pakking av laks i forhold til konvensjonelle absorbenter. Dette delvis på grunn av fargeforskjeller som ble observert på lakseproduktene. Dersom det skal gjøres videre forskning på butare, og denne algens egenskaper til å øke holdbarheten på laks kan det foreslås å finne ut hva som forårsaker fargeforandringene som ble observert på laksen. Det kan også være interessant å innkapsle alger i en papirabsorbent.

## 7 REFERANSER

---

- 3M. (2017). Interpretation Guide. In. <https://multimedia.3m.com>: 3M.
- Aandahl, P. T. (2018). En million tonn laks for 64,7 milliarder i 2017. Retrieved from <http://www.mynewsdesk.com/no/seafood/pressreleases/en-million-tonn-laks-for-647-milliard-er-i-2017-2361515>
- Abel, N., Rotabakk, B. T., Rustad, T., & Lerfall, J. (2018). The influence of lipid composition, storage temperature, and modified atmospheric gas combinations on the solubility of CO<sub>2</sub> in a seafood model product. *Journal of Food Engineering*, 216, 151-158. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.020>
- Amanatidou, A., Schlüter, O., Lemkau, K., Gorris, L. G. M., Smid, E. J., & Knorr, D. (2000). Effect of combined application of high pressure treatment and modified atmospheres on the shelf life of fresh Atlantic salmon. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2), 87-98. doi:[https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00007-2)
- Ashie, I., Smith, J., Simpson, B., & Haard, N. F. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(1-2), 87-121.
- Athukorala, Y., Lee, K. W., Shahidi, F., Heu, M. S., Kim, H. T., Lee, J. S., & Jeon, Y. J. (2003). ANTIOXIDANT EFFICACY OF EXTRACTS OF AN EDIBLE RED ALGA (GRATELOUPIA FILICINA) IN LINOLEIC ACID AND FISH OIL. *Journal of Food Lipids*, 10(4), 313-327. doi:10.1111/j.1745-4522.2003.tb00024.x
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., & Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252(1), 79-84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.051>
- Barnett, H. J., Stone, F. E., Roberts, G. C., Hunter, P. J., Nelson, R. W., & Kwok, J. (1982). A study in the use of a high concentration of CO<sub>2</sub> in a modified atmosphere to preserve fresh salmon. *Marine Fisheries Review*, 44, 7.
- Bischof, K., Hanelt, D., & Wiencke, C. (2008). Acclimation of Maximal Quantum Yield of Photosynthesis in the Brown Alga *Alaria esculenta* under High Light and UV Radiation. *Plant Biology*, 1(4), 435-444. doi:10.1111/j.1438-8677.1999.tb00726.x
- Calado, T., Fernández-Cruz, M. L., Cabo Verde, S., Venâncio, A., & Abrunhosa, L. s. (2018). Gamma irradiation effects on ochratoxin A: Degradation, cytotoxicity and application in food. *Food Chemistry*, 240, 463-471. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.136
- Chandini, S. K., Ganesan, P., & Bhaskar, N. (2008). In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry*, 107(2), 707-713. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.081>
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Feresu, S., & Jones, D. (2008). Erratum: Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium* (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11), 2672. doi:10.1099/ijs.0.66155-0
- Dominguez, H. (2013). *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*: Elsevier.
- Dussault, D., Vu, K. D., Vansach, T., Horgen, F. D., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effects of marine algal extracts and cyanobacterial pure compounds against five foodborne pathogens. *Food Chemistry*, 199, 114-118. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.119>
- Institutt for energiteknikk (2018). Institutt for energiteknikk. Retrieved from <https://www.ife.no/no/ife/avdelinger/reaktordrift/gammaanlegget>
- Fan, X., Niemira, B. A., & Sokorai, K. J. B. (2003). Sensorial, nutritional and microbiological quality of fresh cilantro leaves as influenced by ionizing radiation and storage. *Food Research International*, 36(7), 713-719. doi:10.1016/S0963-9969(03)00051-6

- Fische, S. M. R., Rustad, T., & Aarstad, O. A. (2016). Characterization of three Macroalgae: *Saccharina latissima*, *Alaria esculenta* and *Palmaria palmata* - Effect of Different Harvesting Conditions. In: NTNU.
- Fletcher, G. C., Summers, G., Corrigan, V. K., Johanson, M. R., & Hedderley, D. (2005). Optimizing Gas Mixtures for Modified Atmosphere Packaging of Fresh King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(4), 5-28. doi:10.1300/J030v13n04\_02
- Flodgaard, L. R., Dalgaard, P., Andersen, J. B., Nielsen, K. F., Givskov, M., & Gram, L. (2005). Nonbioluminescent Strains of *Photobacterium phosphoreum* Produce the Cell-to-Cell Communication Signal N-(3-Hydroxyoctanoyl)homoserine Lactone. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2113-2120. doi:10.1128/AEM.71.4.2113-2120.2005
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry*, 73(2), 627-650.
- Forskrift om behandling av næringsmidler med ioniserende stråling, FOR-2001-03-20-504 C.F.R. (2001).
- Forskrift om kvalitet på fisk og fiskevarer, (2013).
- Franks, F. (1998). Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45(3), 221-229. doi:https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00004-6
- Gong, Y. (2011). *Fillet quality of Atlantic salmon (Salmo salar L.) : relevance of dietary amino acid supplementation and acclimation temperature before slaughter : master thesis in Feed manufacturing technology*. In a. Universitetet for miljø- og biovitenskap Institutt for husdyr- og (Ed.).
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 315-326. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011
- Gupta, S., Rajauria, G., & Abu-Ghannam, N. (2010). Study of the microbial diversity and antimicrobial properties of Irish edible brown seaweeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 482-489. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02149.x
- Hammond, M. D., & Skonberg, D. I. (2012). Antioxidant Properties of Chitosan Coatings on Frozen Atlantic Salmon Fillet Portions. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(4), 351-361. doi:10.1080/10498850.2011.601536
- Huss, H. H., Boerresen, T., Dalgaard, P., Gram, L., Jensen, B., Joergensen, B., . . . Lupin, H. M. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *Quality and quality changes in fresh fish*(348).
- Indergaard, M. (2010). Tang og tare-i hovedsak norske brunalger: Forekomster, forskning og anvendelse.
- Labconco. (2004). User's Manual - FreeZone® 4.5 Liter Freeze Dry Systems. In. <http://www.labconco.com/>: Labconco Corporation
- Lerøy. (2017). Laks. Retrieved from <https://www.leroyseafood.com/no/smakfull-sjomat/ravarer/laks/>
- Love, R. M. (1975). Variability in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) from the Northeast Atlantic: a Review of Seasonal and Environmental Influences on Various Attributes of the Flesh. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32(12), 2333-2342. doi:10.1139/f75-269
- Macé, S., Joffraud, J.-J., Cardinal, M., Malcheva, M., Cornet, J., Lalanne, V., . . . Dousset, X. (2013). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 227-238. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.013
- Moe, E. (2017). *The Norwegian aquaculture analysis 2017*. Retrieved from [www.ey.com: http://www.ey.com/Publication/vwLUAssets/EY\\_-\\_The\\_Norwegian\\_Aquaculture\\_Analysis\\_2017/\\$FILE/EY-Norwegian-Aquaculture-Analysis-2017.pdf](http://www.ey.com/Publication/vwLUAssets/EY_-_The_Norwegian_Aquaculture_Analysis_2017/$FILE/EY-Norwegian-Aquaculture-Analysis-2017.pdf)

- Mohamed, S., Hashim, S. N., & Rahman, H. A. (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology*, 23(2), 83-96. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.001>
- Munda, I. M., & Lüning, K. (1977). Growth performance of *Alaria esculenta* off helgoland. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 29(3), 311-314. doi:10.1007/bf01614267
- NMKL. (2004). Mesophilic aeromonas species. Quantification in foods and feeds. In (Vol. No. 150 3rd ed.): Nordic Committee on food analysis.
- NMKL. (2006). Aerobic count and specific spoilage organisms in fish and fish products. In (Vol. Nr. 184 2006): Nordic committee on food analysis.
- NMKL. (2007). Lactic acid bacteria. Determination in food in association with food spoilage. In (Vol. No. 140 2nd. ed.): Nordic committee of food analysis.
- NMKL. (2008). Anaerobic sulphite-reducing bacteria. Determination in foods. In (Vol. No. 56 4. Ed.): Nordic Committee on food analysis.
- Nwosu, F., Morris, J., Lund, V. A., Stewart, D., Ross, H. A., & McDougall, G. J. (2011). Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*, 126(3), 1006-1012. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.111>
- Oxoid. (2016a). Dehydrated Culture Media. In *STAA Agar Base* (Vol. CM0881): Thermo Scientific.
- Oxoid. (2016b). Dehydrated Culture Media. In *Pseudomonas Agar Base* (Vol. CM0559): Thermo Scientific.
- Oxoid. (2016c). Dehydrated Culture Media. In *Mueller-Hinton Agar* (Vol. CM0337): Thermo Scientific.
- Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., & Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13(1), 29-49. doi:10.1007/s10499-004-9035-1
- Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Gannam, N., & Gupta, S. (2013). Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown seaweed *Himanthalia elongata* from western coast of Ireland. *Journal of Food Biochemistry*, 37(3), 322-335.
- Reddy, N. R., Solomon, H. M., Yep, H., Roman, M. G., & Rhodehamel, E. J. (1997). Shelf life and toxin development by *Clostridium botulinum* during storage of modified-atmosphere-packaged fresh aquacultured salmon fillets. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1055-1063. doi:10.4315/0362-028X-60.9.1055
- Robinson, R. K. (2000). Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3. In: Elsevier.
- Rotabakk, B. T., Wyller, J., Lekang, O. I., & Sivertsvik, M. (2008). A mathematical method for determining equilibrium gas composition in modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization systems for non-respiring foods. *Journal of Food Engineering*, 85(4), 479-490. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.08.010>
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. *Marine Drugs*, 14(4), 81. doi:10.3390/md14040081
- Sivertsvik, M., Jeksrud Willy, K., & Rosnes, J. T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 107-127. doi:10.1046/j.1365-2621.2002.00548.x
- Sivertsvik, M., Rosnes, J. T., & Kleiberg, G. H. (2006). Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the Microbial and Sensory Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets. *Journal of Food Science*, 68(4), 1467-1472. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb09668.x
- Stévant, P., Marfaing, H., Rustad, T., Sandbakken, I., Fleurence, J., & Chapman, A. (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(5), 2417-2426. doi:10.1007/s10811-017-1126-2
- Sunda, W., Kieber, D. J., Kiene, R. P., & Huntsman, S. (2002). An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature*, 418, 317. doi:10.1038/nature00851

- <https://www.nature.com/articles/nature00851#supplementary-information>
- Sutton, S. (2011). Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology*, 17(1), 46-49.
- Sørheim, O. (2000). *Effects of modified atmosphere packaging on colour and microbiological shelf life of red meats*. MATFORSK - Norwegian Food Research Institute, Γ...s.
- Terova, G., Preziosa, E., Marelli, S., Gornati, R., Bernardini, G., & Saroglia, M. (2011). Applying transcriptomics to better understand the molecular mechanisms underlying fish filet quality. *Food Chemistry*, 124(3), 1268-1276. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.061>
- Tuberoso, C. I. G., Boban, M., Bifulco, E., Budimir, D., & Pirisi, F. M. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chemistry*, 140(4), 686-691. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.071>
- Walls, A., Edwards, M., Firth, L., & Johnson, M. (2017). Successional changes of epibiont fouling communities of the cultivated kelp *Alaria esculenta*: predictability and influences.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240-248. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>
- Ytrestøyl, T., Aas, T. S., & Åsgård, T. (2015). Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448, 365-374. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.023>
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A., & Barrow, C. J. (2006). A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18(3), 445-450. doi:[10.1007/s10811-006-9048-4](https://doi.org/10.1007/s10811-006-9048-4)