



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 30 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Mikrobiota, vekst og metabolismestudier av rekesalat pakket i modifisert atmosfære (MAP)

Microbiota, growth and metabolism studies of shrimp
salad packaged in modified atmosphere (MAP)

Ingrid Strand Kristiansen

Matvitenskap

Forord

Denne oppgaven ble skrevet som en avslutning på min mastergrad i matvitenskap, retning matvaretrygghet, -kvalitet og -hygiene ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Tidlig i studiet ble jeg spesielt interessert i det mikrobiologiske aspektet innen matproduksjon. Å velge en masteroppgave som gav meg muligheten til å fordype meg i et allerede eksisterende produkt med et spesielt fokus på den mikrobiologiske kvaliteten var derfor viktig for meg. Arbeidet med denne oppgaven har gitt meg et større innblikk i hvorfor det er så viktig med god forståelse innen dette når det kommer til kvaliteten i ferdig produkt.

Jeg vil starte med å takke næringsmiddelbedriften som har gitt meg muligheten til å jobbe med et eksisterende produkt og gitt meg et større innblikk i næringsmiddelindustrien. Jeg vil spesielt takke veilederen min derfra for et godt samarbeid og raske svar på mine mange spørsmål om produktet. Videre vil jeg takke min hovedveileder førsteamanuensis Hilde M. Østlie for all praktisk hjelp og konstruktive tilbakemeldinger på mitt arbeid. Jeg vil også takke min biveileder førsteamanuensis Davide Porcellato for hjelp når det kommer til de bioinformatiske analysene og tolkning av de molekylærbiologiske analysene. Jeg vil spesielt takke avdelingsingeniør Ahmed Abdelghani for hyggelige samtaler, råd, praktisk hjelp og veiledning av arbeidet på laboratoriet. Du har vært optimistisk og engasjert i arbeidet og resultatene, noe som har vært veldig motiverende og til stor hjelp. Til slutt vil jeg takke resterende ansatte på laboratoriet på KBM for all praktisk hjelp og gode samtaler.

Jeg vil også rette en stor takk til familie for støtte, oppmuntring og gjennomlesing underveis i skrivingen. Til slutt vil jeg takke venner og spesielt kollektivet mitt som har holdt ut med meg i denne perioden. Dere har vært engasjerte i oppgaven min, selv om dere egentlig ikke har skjønt så mye av det jeg har snakket om. Takk for at dere har dratt meg ut av masterboblen ved å få meg med ut på sosiale ting slik at jeg har kunnet koble av og fått avbrekk fra skrivingen. Det har vært utrolig avgjørende for motivasjonen og humøret mitt i denne stressende perioden.

Ås, mai 2023

Ingrid Strand Kristiansen

Sammendrag

Maten vi spiser er sjeldent steril og kan inneholde mikroorganismer som finnes naturlig i råvarene, eller ved at de tilføres under bearbeiding og produksjon. I noen tilfeller kan mikroorganismer føre til dårlig kvalitet i form av lukt og smak, forråtnelse og i noen tilfeller sykdom. Mat er et godt egnet vekstmedium for mikroorganismer, hvor indre faktorer som pH, vannaktivitet og tilsetningsstoffer påvirker vekst av mikroorganismer. Blant ytre faktorer er temperatur og atmosfære viktige og bestemmer i stor grad hvilke mikroorganismer som kan vokse. Vanlige Gram-negative kvalitetsforringende bakterier i kjølelagret mat inkluderer *Pseudomonas* spp. og *Photobacterium* spp., mens Gram-positive kvalitetsforringende bakterier i modifisert atmosfærepakket mat kan være ulike melkesyrebakterier (MSB). Melkesyrebakterier er naturlig tilstede i fermenterte produkter og produserer hovedsakelig melkesyre ved fermentering av karbohydrater. I produkter hvor disse karakteristikaene ikke er ønsket kan det føre til en uakseptabel endring av produktet.

I denne studien ble en norskprodusert modifisert atmosfærepakket rekesalat og ingrediensene fra tre ulike produksjoner analysert og sammenlignet gjennom holdbarhetstiden. Prøvene ble analysert for celletall, karbohydrater og organiske syrer (HPLC), pH og identifisering av isolat ved Sanger sekvensering og mikrobielle samfunn ved bruk av Illumina sekvensering. Resultatet viste at det var forskjell i den mikrobielle sammensetningen i rekesalat fra de tre produksjonene. Spesielt produksjon 2 og 3 hadde en høyere vekst av MSB, og en dominans av *Pediococcus parvulus* gjennom holdbarhetstiden. Produksjon 1 hadde derimot en dominans av *Periweissella fabalis/ghanensis*, men *Ped. parvulus* var også tilstede.

Metabolismeforsøket ved bruk av HPLC og måling av pH viste forskjeller i omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer. Produksjon 2 og 3 hadde høyest innhold av maltose ved uke 0 og høyest produksjon av melkesyre med ca. 2700 ppm og 3000 ppm ved uke 7. Dette førte til en nedgang i pH i produksjon 2 og 3 fra ca. pH 4,8 og 4,7 til pH 4,4 og 4,2 mot slutten av holdbarhetstiden. Produksjon 1 hadde høyere innhold av glukose og fruktose i uke 0, men en lavere omsetning og dermed mindre produksjon av melkesyre (fra ca. 250 ppm i uke 0 til ca. 750 ppm i uke 7) som resulterte i at pH lå i området pH 4,8 og 4,7 gjennom hele holdbarhetstiden.

Resultatet fra denne studien tyder på at produksjon av melkesyre i rekesalat i stor grad påvirkes av tilgjengelig substrat i kombinasjon med hvilke mikroorganismer som dominerer. Hvilke mikroorganismer som er tilstede i ingrediensene, samt hvilke karbohydrater de bidrar med vil dermed sannsynligvis ha stor betydning for veksten av bakterier i ferdig produkt.

Abstract

The food we consume is rarely sterile and may contain microorganisms that occur naturally in the raw materials or are introduced during processing and production. In some cases, these microorganisms can lead to poor quality such as of bad odour and taste, spoilage, and even illness. Food is a suitable growth medium for microorganisms, where intrinsic factors such as pH, water activity and additives affect the growth of microorganisms. Among extrinsic factors, temperature and atmosphere are essential and they largely determine which microorganisms that may grow. Common Gram-negative spoilage bacteria in cold stored food include *Pseudomonas* spp. and *Photobacterium* spp., while Gram-positive spoilage bacteria in modified atmosphere packaged food include various lactic acid bacteria (LAB). Lactic acid bacteria are naturally present in fermented food products and produce lactic acid by fermentation of carbohydrates. In products where these characteristics are not desired, these bacteria can lead to unacceptable changes in the food.

In this study, a Norwegian-produced modified atmosphere packaged shrimp salad and the ingredients from three different productions were analysed and compared through their shelf life. The samples were analysed for cell count, carbohydrates and organic acids (HPLC), pH, identification of isolates by Sanger sequencing, and microbial communities using Illumina sequencing. The results showed that there were differences in the microbial composition of shrimp salad from the three productions. Specifically, production 2 and 3 had a higher growth of LAB and a dominance of *Pediococcus parvulus* throughout the shelf life. For production 1, on the other hand, *Periweissella fabalis/ghanensis* was the dominant bacteria, however *Ped. parvulus* was also present.

By investigating the metabolism using HPLC and pH, the analysis showed a difference in the metabolism of carbohydrates and the production of organic acids. Production 2 and 3 had the highest content of maltose and the highest production of lactic acid of approximately 2700 ppm and 3000 ppm at week 7. This led to a lower pH in production 2 and 3 from approx. pH 4,8 and 4,7 to pH 4,4 and 4,2 towards the end of their shelf life. Production 1 had a higher content of glucose and fructose at week 0, but a lower metabolization of carbohydrates and thus, less production of lactic acid (from 250 ppm in week 0 to 750 ppm in week 7), resulting in a pH around 4,8 and 4,7 throughout the entire shelf life.

The results of this study suggest that the production of lactic acid in shrimp salad is largely influenced by the substrates available in combination with the dominating microorganisms. Therefore, the microorganisms that are present in the ingredients, as well as the carbohydrates they contribute, will likely have a significant impact on the growth of bacteria in the final product.

Innholdsfortegnelse

1 INNLEDNING	1
1.1 HENSIKT MED OPPGAVEN.....	1
2 TEORI	3
2.1 NÆRINGSMIDDEL SOM VEKSTMEDIUM.....	3
2.2 INDRE FAKTORER SOM PÅVIRKER VEKST	3
2.2.1 pH.....	4
2.2.2 Vannaktivitet	5
2.3 YTRE FAKTORER SOM PÅVIRKER VEKST	6
2.3.1 Temperatur.....	6
2.3.2 Atmosfære.....	7
2.4 KJEMISKE KONSERVERINGSMIDLER.....	7
2.5 MODIFISERT ATMOSFÆREPAKKING.....	8
2.6 KVALITETSFORRINGENDE BAKTERIER	10
2.6.1 <i>Photobacterium spp.</i>	11
2.6.2 <i>Pseudomonas spp.</i>	12
2.7 MELKESYREBAKTERIER.....	12
2.7.1 <i>Lactobacillus spp.</i>	16
2.7.2 <i>Pediococcus spp.</i>	16
2.7.3 <i>Periweissella spp.</i>	17
2.8 GENOTYPISK IDENTIFISERING AV BAKTERIER.....	17
2.8.1 DNA-ekstraksjon	17
2.8.2 Polymerasekjedereaksjon.....	18
2.8.3 Sekvensering.....	19
2.8.3.1 Sanger sekvensering	20
2.8.3.2 Illumina sekvensering.....	20
3 MATERIALER OG METODER.....	23
3.1 ETABLERING OG OPPBEVARING AV PRØVER.....	23
3.2 ISOLERING OG IDENTIFISERING AV MELKESYREBAKTERIER.....	25
3.2.1 Vekstmedier.....	25
3.2.2 Bearbeiding av prøver	26
3.2.3 Isolering	26
3.2.4 Genotypisk identifisering av renkultur ved Sanger sekvensering	27
3.2.4.1 DNA ekstraksjon	27
3.2.4.2 PCR.....	27
3.2.4.3 Agarose gelelektroforese	28
3.2.4.4 Rensing av PCR-produkt.....	28
3.2.4.5 Sanger sekvensering og bearbeiding av data.....	28
3.3 MIKROBIELL SAMMENSETNING VED ILLUMINA SEKVENSERING	29

3.3.1 DNA ekstraksjon	29
3.3.2 qPCR for 16S rRNA amplifisering	30
3.3.3 Illumina Index PCR.....	31
3.3.4 Bioinformatisk analyse.....	33
3.4 «HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY»	33
3.5 pH-MÅLING	34
4 RESULTATER	35
4.1 CELLETALL	35
4.2 METABOLISME.....	37
4.2.1 pH.....	37
4.2.2 Omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer.....	39
4.3 «PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS»	46
4.4 GENOTYPISK IDENTIFISERING AV BAKTERIEISOLATER.....	47
4.5 MIKROBIOTA-ANALYSE VED ILLUMINA SEKVENSERING	49
4.5.1 Identifisering av bakterier.....	49
5 DISKUSJON	54
5.1 MIKROBIELL SAMMENSETNING.....	54
5.1.1 Mikrobielle forskjeller i produksjonene.....	54
5.1.2 Modifisert atmosfære	57
5.2 VEKST OG METABOLISME	59
5.2.1 pH.....	59
5.2.2 Karbohydrater og organiske syrer.....	60
5.2.3 Temperatur og holdbarhet	63
6 OPPSUMMERING OG VIDERE ARBEID	64
7 REFERANSELISTE	66
VEDLEGG	74

1 Innledning

Maten vi spiser er sjeldent steril og kan inneholde ulike mikroorganismer som finnes naturlig i råvarene, eller ved at de har blitt tilført under bearbeiding og produksjon. Stort sett er det trygt å konsumere maten vi kjøper, men i noen tilfeller kan mikroorganismer føre til dårlig kvalitet i form av lukt og smak, forråtnelse og i noen tilfeller sykdom.

I 2020 ble det i Norge kastet 454 350 tonn spiselig mat (Regjeringen, 2021), og husholdningene står for halvparten av dette. Det er mange årsaker til matsvinn, men hos forbruker er hovedårsaken at mat blir glemt i kjøleskapet og går ut på dato. I matindustrien skyldes matsvinnet at råvare- og ferdigvarekvalitet ikke er optimale til formålet, omlegging eller stopp i produksjonen og retur fra kunden. FN har estimert at en tredjedel av all mat som produseres i verden aldri blir spist, noe som er problematisk både fra et etisk og miljømessig perspektiv. FNs bærekraftsmål pkt. 12.3 har et mål om å halvere matsvinnet målt i kilo per innbygger innen 2030 (FN, 2023). For en forbruker vil lengre holdbarhet kunne bidra til at mindre mat kastes. Det er da viktig at næringsmiddellets sensoriske krav opprettholdes gjennom holdbarhetstiden, noe som igjen påvirkes av den mikrobiologiske kvaliteten.

Å sikre at maten vi spiser er trygg og produsert effektivt er blant de største utfordringene for næringsmiddelindustrien. Forringet mat kan oppstå av en rekke årsaker, inkludert forurensning av mikroorganismer. Melkesyrebakterier spiller ofte en positiv rolle i næringsmiddelindustrien, men kan også forårsake ødeleggelse av matvarer.

Kvalitetsødeleggelse forårsaket av melkesyrebakterier inkluderer blant annet misfarging av kjøtt, gassdannelse i ost og bismak i matprodukter (Kalschne et al., 2015). Å få kontroll på uønsket vekst av melkesyrebakterier i næringsmidler vil dermed kunne bidra til at mindre mat kastes.

1.1 Hensikt med oppgaven

Bakgrunnen for denne oppgaven skyldes at en norsk næringsmiddelbedrift i noen tilfeller har hatt modifisert atmosfærepakket rekesalat med dårlig sensorisk kvalitet gjennom holdbarhetstiden. Det har samtidig blitt observert at disse salatene har hatt en høyere vekst av melkesyrebakterier enn prøver med tilfredsstillende sensorisk kvalitet.

Hensikten med denne oppgaven var å kartlegge og beskrive endringen i vekst av mikroorganismer i modifisert atomsfærepakket rekesalat gjennom holdbarhetstiden med spesielt fokus på melkesyrebakterier, samt hver enkel ingrediens som ble benyttet under produksjonen. Den mikrobielle sammensetningen i rekesalat ble studert ved både dyrkingsavhengige og dyrkingsuavhengige metoder. Rekesalat som ble analysert i denne oppgaven ble produsert i perioden november 2022 til januar 2023.

2 Teori

2.1 Næringsmiddel som vekstmedium

Mat er et godt egnet vekstmedium for mikroorganismer. De er i likhet med andre levende organismer avhengige av at miljøet rundt imøtekommer deres spesifikke behov og essensielle næringsstoffer for vekst. Næringsstoffer kan blant annet være karbohydrater, lipider og proteiner, hvor ulike mikroorganismer har ulike behov (Sevindik & Uysal, 2021; Adams & Moss, 2008).

Foringelse av mat er en kompleks prosess, og store mengder mat går tapt grunnet mikrobiell ødeleggelse, selv med dagens konserveringsteknikker. Maten skal ha god/tilfredsstillende kvalitet, men samtidig være trygg å konsumere. Forringelse er subjektivt, men karakteriseres som en endring i et matprodukt som er uakseptabel for konsumenten utfra et sensorisk perspektiv. Dette kan være fysisk ødeleggelse, kjemiske endringer (oksidering, fargeendring) eller dårlig lukt og smak grunnet vekst av mikroorganismer. Hvilke mikroorganismer som dominerer og ødelegger et næringsmiddel kan til en viss grad forutsees med tanke på råstoff og foredling. Det er mange faktorer som påvirker mikrobiell vekst i mat og som kan påvirke kvalitetsødeleggelse og helserisiko i et produkt. Disse faktorene kan være direkte knyttet til maten (indre faktorer), lagringsbetingelser (ytre faktorer) eller prosesseringsbetingelser. Opprinnelse til råstoffet, substrat, temperatur, pH, vannaktivitet (a_w) og atmosfære er viktige faktorer som påvirker den mikrobielle sammensetningen i et produkt. Matforringelse er en metabolsk prosess som gjør at mat er uønsket eller uakseptabelt for konsum på grunn av endringer i sensoriske egenskaper. Næringsmiddelet kan være trygt å spise, dvs. at maten ikke forårsaker sykdom grunnet patogene bakterier eller toksiner tilstede, men har endringer i tekstur, lukt, smak eller utseende som fører til at maten ikke blir spist (Sevindik & Uysal, 2021; Adams & Moss 2008). Det kan også være motsatt, at maten er utrygg, men likevel blir spist fordi det ikke er observerbare endringer på maten til tross for patogener/toksiner tilstede. Det er derfor viktig at maten både er av god sensorisk kvalitet og samtidig er trygg.

2.2 Indre faktorer som påvirker vekst

I næringsmidler er det flere indre faktorer som kan påvirke vekst av mikroorganismer. pH, vannaktivitet og tilsetningsstoffer er noen faktorer i næringsmidlet som kan hemme eller fremme vekst (Sevindik & Uysal, 2021; Adams & Moss, 2008).

2.2.1 pH

pH vil i kombinasjon med andre parametere påvirke mikrofloraen i matprodukter. Surheten til et produkt kan ha viktige implikasjoner for dets mikrobielle økologi, samt hastigheten og karakteren av dens ødeleggelse.

Alle mikroorganismer har en minimum, maksimum og optimum pH-verdi for vekst. Sopp vokser ved en lavere pH enn bakterier, og vekst av sopp dominerer i for eksempel frukt hvor pH generelt sett er lav. En oversikt over pH-verdier for vekst hos ulike grupper mikroorganismer vises i Tabell 2.1. Gram-negative bakterier er mer sensitive til lav pH sammenlignet med Gram-positive bakterier. Derimot er det forskjell både mellom ulike slekter og arter ved hvilket pH-område som er optimalt for vekst (Adams & Moss, 2008). Et produkts pH vil være med på å selektere for gruppen mikroorganismer som vil dominere. For eksempel vil en hovedsakelig finne bakterier i meieriprodukter, kjøtt og sjømat, mens mugg og gjær dominerer i frukt. pH-verdien i grønnsaker er litt høyere enn i frukt som gjør at både bakterier og sopp kan vokse (Dorres, 2020).

Tabell 2.1. pH-område for vekst av mikroorganismer (Adams & Moss, 2008).

Gruppe av mikroorganismer	pH for vekst
Gram-positive bakterier	4,0-8,5
Gram-negative bakterier	4,5-9,0
Sopp	1,5-9,0

Ved å øke matvarens surhet, kan vekst av mikroorganismer effektivt hemmes. Dette kan gjøres ved for eksempel melkesyrefermentering. Derimot vil matens bufferkapasitet påvirke pH-verdien i maten og derved i hvor stor grad pH senkes og mikroorganismers vekst hemmes. Det skilles mellom sterke og svake syrer, hvor sterke syrer fullstendig dissosierer i vann, mens en svak syre delvis dissosierer i vann. Saltsyre (HCl) er et eksempel på en sterk syre, mens eddiksyre er en svak organisk syre. Sterke syrer er mindre effektive enn svake syrer ved samme pH-verdi, og spesielt ved lav pH. Dette er fordi effekten ikke bare skyldes dannelse av ekstracellulær $[H^+]$, men også pH utenfor cellen. Grunnen er at den svake organiske syren vil foreligge med høyere andel ikke-dissosiert syre enn den sterke syren, og kan transporteres over cellemembranen og inn i cellen. Inne i cellen vil syren dissosiere på grunn av en høyere pH, noe som vil føre til at H^+ dannes og pH senkes. Cellene må da bruke energi (ATP) for å bli kvitt H^+ , slik at pH inne i cellen opprettholdes. Etter en stund blir dette for belastende for cellen og den vil dø. pK_a -verdi er den negative logaritmen til dissosiasjonskonstanten til et

molekyl. Det er et mål på styrken til en sur eller basisk funksjonell gruppe i en forbindelse. Jo lavere pK_a -verdi, jo sterkere er syren, og motsatt. pK_a -verdien hjelper til å forutsi oppførselen til forbindelser i ulike miljøer og reaksjoner. Når pH er lik en syres pK_a , vil halvparten av syren være udisosiert og halvparten disosiert. Hvis pH øker, vil dissosiering av syren øke. Tabell 2.2 viser en oversikt over noen relevante organiske syrer som ofte brukes i mat og deres pK_a -verdier. Ulike mikroorganismer har ulik toleranse for syrer. Melkesyrebakterier er for eksempel tolerante mot svake lipofile syrer, og produserer også disse som et biprodukt gjennom sin metabolisme (Dorres, 2020; Adams & Moss, 2008).

Tabell 2.2. pK_a -verdier for noen vanlige syrer som benyttes i mat (Adams & Moss, 2008).

Syre	pK_a
Eddiksyre	4,75
Propionsyre	4,87
Melkesyre	3,86
Sorbinsyre	4,75
Sitronsyre	3,14, 4,77, 6,39

2.2.2 Vannaktivitet

Vann er ofte hovedbestanddelen i matvarer, og nærmest alle prosesser i biologiske systemer avhenger av denne bestanddelen. Mikroorganismer trenger vann for å vokse. Vannaktivitet (a_w) er mengden fritt vann som er tilgjengelig i et næringsmiddel og angis som en a_w -verdi mellom 0 og 1, hvor 0 er absolutt tørrhet og 1 er 100% relativ fuktighet. Det er mengden fritt vann i et produkt som påvirker mikrobiell vekst. Tabell 2.2 viser minimum vannaktivitet hvor aktiv vekst i næringsmidler kan forekomme (Adams & Moss, 2008). Når a_w går ned, reduseres antall mikroorganismer som har mulighet til å vokse.

Tabell 2.2. Minimum vannaktivitet (a_w) for ulike grupper av mikroorganismer med hensyn til aktiv vekst i næringsmidler (Adams & Moss, 2008).

Gruppe av mikroorganismer	Minimum a_w
Gram-negative bakterier	0,97
Gram-positive bakterier	0,90
Gjær	0,88
Filamentøs sopp	0,80
Halofile bakterier	0,75
Xerofile mugg	0,61

2.3 Ytre faktorer som påvirker vekst

I likhet med indre faktorer vil også ytre faktorer påvirke mikrobiell vekst. Temperatur, atmosfære og relativ fuktighet er noen ytre faktorer som er viktige.

2.3.1 Temperatur

Temperatur vil i stor grad påvirke mikrobiell vekst. Dersom vann er i flytende form, vil mikrobiell vekst kunne forekomme ved temperaturer mellom -8°C og 100°C . Ulike mikroorganismer vil derimot vokse ved ulike temperaturer, hvor de har en minimumstemperatur, optimumstemperatur og maksimumstemperatur for vekst. De fleste mikroorganismer vokser i et temperaturområde på $30-35^{\circ}\text{C}$. Basert på disse kan mikroorganismer klassifiseres i ulike fysiologiske grupper (Adams & Moss, 2008).

Psykrofile bakterier har en optimumstemperatur på $12-15^{\circ}\text{C}$ og en maksimumstemperatur på $15-20^{\circ}\text{C}$. Psykrotrofe bakterier har en optimumstemperatur på $25-30^{\circ}\text{C}$ og en maksimumstemperatur på rundt $30-35^{\circ}\text{C}$. Både psykrofile og psykrotrofe bakterier kan vokse ved 0°C , men veksten vil være kraftig redusert ved så lave temperaturer. Mesofile bakterier har en optimumstemperatur på $30-40^{\circ}\text{C}$, hvor mesofile bakterier med 37°C som optimumstemperatur ofte stammer fra dyr eller mennesker. Maksimumstemperaturen er på omtrent $40-47^{\circ}\text{C}$, mens minimumstemperaturen er på $5-15^{\circ}\text{C}$. Termofile bakterier er mest resistente mot varme med en optimumstemperatur på mellom 55 og 75°C . Maksimumstemperaturen er på mellom $60-90^{\circ}\text{C}$, hvor minimumstemperaturen er $40-45^{\circ}\text{C}$ (Adams & Moss, 2008).

Kjemiske og biologiske reaksjoner vil skje raskere ved høyere temperaturer, noe som vil si at de mesofile bakteriene vil vokse raskere enn psykrotrofe bakterier ved sine optimumstemperaturer. Dermed vil mat som lagres ved høye temperaturer forringes raskere enn mat som lagres ved lavere temperaturer. Mesofile og psykrotrofe bakterier vil ha størst innvirkning på forringelse av mat. Spesielt de psykrotrofe bakteriene vil være et problem da de har høy optimumstemperatur, samt at de kan vokse ved kjøleskapstemperatur. Dermed vil ikke kjøling være en like stor barriere som for de mesofile bakteriene (Adams & Moss, 2008). Kurven for mikrobiell vekst er ikke symmetrisk rundt optimumstemperaturen, da veksten vil avta raskere ved temperaturer over maksimumstemperaturen. Dersom temperaturen overstiger bakteriens maksimumstemperatur vil bakterien kunne dø fordi membranen går i stykker, eller

grunnet en irreversibel denaturering av proteiner i cellen. Enzymatisk aktivitet avtar med avtagende temperatur og er sammen med endringer i cellemembranen en viktig årsak til at mikrobiell vekst stanser når temperaturen blir for lav. Membranen stivner og mister sin fluiditet når temperaturen blir tilstrekkelig lav. Temperaturen det skjer ved er lavere hos psykrotrofe bakterier på grunn av høyere nivå av umettede og kortkjedede fettsyrer enn hos mesofile (Adams & Moss, 2008).

2.3.2 Atmosfære

Atmosfære er sammen med temperatur noen av de viktigste ytre faktorene som vil påvirke vekst av mikroorganismer. Oksygen (O₂) utgjør 21% av jordas atmosfære, og vil under normale forhold være den gassen som har størst innvirkning på mikrobiell vekst (Adams & Moss, 2008). Karbondioksid (CO₂) er hovedsakelig bakteriostatisk og hindrer mikrobiell vekst ved å forlenge lag-fasen og minimere vekst i log fasen til aerobe mikroorganismer (Reddy et al., 1991). Når CO₂ løser seg i vann ved pH under 8 kan nye forbindelser dannes, som vist i likevektsreaksjonen nedenfor (Dixon & Kell, 1989).



Når karbonsyre (H₂CO₃) dissosierer dannes bikarbonat (HCO₃⁻) og hydrogenioner (H⁺) som bidrar til å senke pH i produktet (Farber, 1991). Karbonsyre har egenskaper som en svak organisk syre, den kan transportere udisosiert over cellemembranen, og gir en veksthemmende effekt (Daniels et al., 1985). CO₂ er godt løselig i vann og fett (Sivertsvik et al., 2002), og løseligheten påvirkes av temperatur, hvor en lav temperatur gir økt løselighet (Farber, 1991). Videre er den veksthemmende effekten til CO₂ varierende. De fleste aerobe Gram-negative bakterier, mugg og gjær inhiberes, mens Gram-positive bakterier generelt er mer motstandsdyktige. Blant de mest sensitive bakteriene mot CO₂ er for eksempel *Pseudomonas* spp. som er en viktig aerob kvalitetsforringende bakterieslekt, mens melkesyrebakterier og Gram-positive *Clostridium* spp. er mest resistente (Church, 1994).

2.4 Kjemiske konserveringsmidler

Konserveringsmidler er kjemiske stoffer som inhiberer, forsinker eller stopper vekst av mikrober. De tilsettes for å redusere forringelse og øke holdbarheten til et produkt.

Antimikrobielle forbindelser vil være et effektivt virkemiddel som kan gi store miljøgevinster

i form av økt holdbarhet og mindre matsvinn. Konserveringsmidler kan være mikrobicidale (dreper mikroorganismer) eller mikrobiostatisk (hindrer vekst av mikroorganismer).

Kjemiske konserveringsmidler brukes i små doser og er derfor kun nyttig for å redusere lave nivåer av kontaminering og er ingen erstatning for god hygienepraksis (Adams & Moss, 2008).

Kjemiske konserveringsmidler som benyttes utstrakt er organiske syrer. Disse har i udisosiert form evnen til å vandre over cellemembranen og inn i cytoplasma til mikroorganismer, se kap. 2.2.1 pH. Cellemembranen er en effektiv barriere for ladde forbindelser, noe som betyr at pH i næringsmiddelet vil ha stor innvirkning på hvor lett disse syrene kommer inn i cytoplasma og derved hvor effektivt de virker. Syrens grad av ikke-dissosiering øker med avtagende pH, og med det evnen til å vandre gjennom membranen. Tabell 2.3 viser en oversikt over noen vanlige kjemiske konserveringsmidler som benyttes og deres biologiske aktivitet i ulike matprodukter (Adams & Moss, 2008).

Tabell 2.3. Kjemiske konserveringsmidler, samt deres biologiske aktivitet og matvarer hvor disse benyttes (Adams & Moss, 2008).

Konserveringsmiddel	Biologisk aktivitet	Matvarer
Eddiksyre	Gjær, bakterier	Bakverk, meieriprodukter etc.
Benzosyre/Na-, K-, Ca-benzoat	Gjær, mugg	Drikkevarer, frukt, margarin
Melkesyre	Bakterier	Kjøtt, fermenterte produkter
Nitritt	Sporedannende bakterier	Fisk, kjøtt
Propionsyre/Na-, K-, Ca-propionat	Mugg	Bakverk, meieriprodukter
Sorbinsyre/Na-, K-, Ca-sorbat	Gjær, mugg, bakterier	Drikkevarer, vin etc.
Sulfitt	Gjær, mugg	Frukt, fruktprodukter, vin

2.5 Modifisert atmosfærepakking

Matemballasje har utviklet seg raskt de siste årene, hovedsakelig på grunn av økte krav til produktsikkerhet, forlengelse av holdbarhet, kostnadseffektivitet, miljøspørsmål og forbrukervennlighet (Majid et al., 2018). Modifisert atmosfære omfatter alle pakkemetoder der atmosfæren i pakningen ved pakketidspunktet og/eller under lagring forandres i forhold til luftatmosfæren. Pakking i modifisert atmosfære (MAP) er en godt etablert og viktig metode som har vært mye brukt de siste 30-40 årene for emballering av ulike næringsmidler som raskt forringes. Luften i emballasjen byttes ut ved å kombinere ulike proporsjoner av gasskomponenter som nitrogen (N₂), oksygen (O₂) og karbondioksid (CO₂). Ved å tilsette

bestemte mengder gasser kan en forlenge holdbarheten til en matvare (Qu et al., 2022). Sammenlignet med normal atmosfære kan MAP gi et miljø med lave O₂ og høye CO₂-nivåer, som kan hemme oksidasjonsreaksjoner, hindre mikrobiell ødeleggelse av mat og opprettholde sensorisk kvalitet. Når et produkt MA-pakkes vil ikke gass-sammensetningen kontrolleres eller justeres under lagringstiden, men den vil endre seg som følge av absorpsjon inn i produktet, mikrobiologisk aktivitet og permeabilitet i pakkematerialet (Sivertsvik et al., 2002). Forlenget holdbarhet kan avhenge av fettinnhold, mikrobiell sammensetning, gassblanding, forholdet mellom gass- og produktvolum (G/P-forhold) og lagringstemperatur. En lav lagringstemperatur er viktig når det kommer til fordelene med MAP.

Når det kommer til å kontrollere vekst av mikroorganismer er CO₂ viktig i pakkegassen. CO₂ har en bakteriostatisk- og fungistatisk effekt, og det har vist seg at 20% CO₂ i pakkegassen gir en betydelig hemming av aerobe mikroorganismer som for eksempel *Pseudomonas* spp. (Sivertsvik et al., 2002). Obligate og fakultative anaerobe mikroorganismer blir i mindre grad påvirket av CO₂. For å oppnå best mulig inhiberende effekt er det viktig at en tilstrekkelig mengde CO₂ blir løst i produktet (Devlieghere et al., 1998). Videre avhenger den inhiberende effekten av G/P-forhold, CO₂-konsentrasjon, startkonsentrasjon av bakterier, hvor lenge produktet har vært lagret, type produkt og temperatur (Church, 1994). Sammensetningen av gass avhenger av produktet. For eksempel tilsettes ofte O₂ i pakking av kjøtt for å bevare den røde fargen, mens i andre produkter som for eksempel sjømat vil tilstedeværelse av O₂ føre til raskere kvalitetsforringelse av produktet. Det vil ofte være tilstedeværelse av 1-2% O₂ for å hemme anaerobe og obligat anaerobe bakterier (Farber, 1991). N₂ er ikke inhiberende, men en inert gass som løser seg dårlig i vann og fett. Funksjonen til N₂ er å erstatte luft og hindre kollaps av forpakningen som oppstår ved høy konsentrasjon av CO₂ (Church, 1994).

Det er hovedsakelig to former for MAP som benyttes; høyoksygen- og lavoksygenkonsentrasjon i gassblandingen. I høyoksygen MAP består atmosfæren av ca. 70% O₂, 20-30% CO₂ og 0-20% N₂, og gassblandingen benyttes ofte ved pakking av kjøtt for å bevare den røde fargen. Ved lavoksygen MAP benyttes 20-30% CO₂, 0-10% O₂ og resten N₂. CO₂ har en bakteriostatisk effekt på mikroorganismer, noe som vil si at det er relativt få mikroorganismer som drepes direkte av CO₂ (Adams & Moss, 2008).

2.6 Kvalitetsforringende bakterier

Det finnes mange kvalitetsforringende og sykdomsfremkallende mikroorganismer som har evnen til å vokse godt i næringsmidler. Kvalitetsforringende bakterier er et alvorlig globalt problem, spesielt i utviklingsland på grunn av utilstrekkelig prosess- og kjøleanlegg. Et næringsmiddel har sin spesifikke og karakteristiske mikroflora på et gitt tidspunkt under produksjon og lagring. Denne mikrofloraen påvirkes av råvareflora, prosessering, konservering og forhold under lagring (Gram et al., 2002). Det forekommer ofte klare mønstre med hensyn til mikroorganismer tilstede i et næringsmiddel basert på råvaren og kunnskap om kjemiske og fysiske parametere som påvirker deres vekst, og det er mulig med stor nøyaktighet å forutsi hvilke mikroorganismer som vil vokse og dominere i et produkt.

Nesten alle grupper av mikroorganismer har arter som under noen forhold kan bidra til å forringe matvarer. Mikroorganismer som forringer mat inkluderer aerobe psykrotrofe Gram-negative bakterier, gjær, mugg, heterofermentative *Lactobacillus* og sporedannende bakterier. Hvilke mikroorganismer som dominerer avhenger som nevnt av produktet og produktets egenskaper. Kjøtt og fisk som lagres aerobt ved lav temperatur domineres ofte av aerobe *Pseudomonas* spp og noen andre Gram-negative psykrotrofe bakterier. I produkter som MA-pakkes vil *Pseudomonas* hemmes, og mikrofloraen endres til hovedsakelig melkesyrebakterier (MSB), *Enterobacteriaceae* og noen ganger *Clostridium*. Ved å redusere pH (<5), øke NaCl-konsetrasjonen (>6%) og ved å tilsette sorbat og/eller benzoat elimineres den Gram-negative mikrofloraen i stor grad. Melkesyrebakterier og gjær vil da være de gjenværende organismene blant annet i halvkonserverte fiskeprodukter og majonesbaserte salater. Ulike *Lactobacillus* spp., inkludert *Lactobacillus alimentarius*, har blitt identifisert som ødeleggende organismer for disse produktene (Gram et al., 2002).

Enkelte typer frukt og grønnsaker forringes raskt, hvor oppbevaring og emballering i stor grad påvirker deres holdbarhet. Både frukt og grønnsaker kan være forurenset med sykdomsfremkallende bakterier, men grunnet lav pH i frukt er det ofte mugg og gjær som fører til kvalitetsødeleggelse. Grønnsaker har noe høyere pH som fører til at både bakterier og sopp kan vokse og bidra til kvalitetsødeleggelse. Noen typer frukt, blant annet epler, produserer gassen etylen. Denne gassen kan føre til at andre sorter frukt og grønnsaker modnes og forringes raskere ved samlagring (Bapat et al., 2010).

Fisk og annen sjømat beregnes som lettbederlige produkter med kort holdbarhet. Mikrobiell forringelse er vanligvis hovedårsaken til kvalitetsforringelse i fisk på grunn av blant annet høy pH post mortem (pH 6,2-6,5), høy vannaktivitet og høyt innhold av autolytiske enzymer (Gram & Dalgaard, 2002; Odeyemi et al., 2020). Noen fiskearter og annen sjømat har et høyt innhold av trimetylaminn-oksidd (TMAO) som kan akkumuleres i muskelen og brytes ned til trimetylaminn (TMA). Dette kan gi dårlig lukt og bismak tidligere enn i kjøtt da fisk og sjømat normalt har lavere tilgjengelighet av karbohydrater. Kombinasjonen av nøytral pH og tilgjengeligheten av TMAO som en alternativ elektronakseptor gjør at MAP og vakuumpakking av fisk og sjømat ikke fører til en forlenget holdbarhet slik som i kjøtt. *Shewanella putrefaciens* er en vanlig kvalitetsforringende bakterie i fisk, og har mulighet til å produsere TMA og hydrogensulfid (H₂S). Derimot har det vist seg at bakterien effektivt reduseres av CO₂. *Photobacterium phosphoreum* er en stor gjærlignende bakterie som også kan produsere TMA. Grunnet bakteriens størrelse kan *Pho. phosphoreum* produsere 10-100 ganger mer TMA per bakteriecelle enn for eksempel *Sh. Putrefaciens*, noe som medfører kvalitetsødeleggelse ved færre bakterier tilstede. Reker tilhører krepsdyr og har ekstremt dårlig holdbarhet da de har mye «non-protein nitrogen» (NPN). For å unngå dårlig holdbarhet bør reker derfor kokes eller fryses øyeblikkelig etter fangst (Adams & Moss, 2008). Noen vanlige kvalitetsforringende bakterier i sjømat inkluderer *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*, melkesyrebakterier, *Bacillus* og *Clostridium*. I MAP eller vakuumpakket fisk fra kaldere strøk dominerer vanligvis *Photobacterium* spp. i mager fisk og melkesyrebakterier i fet fisk (Svanevik & Lunestad, 2011; Parlapani et al., 2015).

2.6.1 *Photobacterium* spp.

Photobacterium spp. er en bakterie som har sitt naturlige reservoar i det marine miljøet, inkludert marine sedimenter, kystnære områder, på overflaten og i tarmen til fisk og i lysproduserende organer til marine fiskearter. De er Gram-negative og oksidase-positive bakterier som kan vokse under aerobe og anaerobe forhold. Slekten tilhører familien *Vibrionaceae*, sammen med *Vibrio*, *Aeromonas* og *Plesiomonas* (Betts, 2006).

Photobacterium spp. er ofte isolert fra forringet sjømat og fisk fra kaldere strøk, inkludert MAP og vakuumpakkede produkter. *Photobacterium phosphoreum* er en av de vanligste artene som er assosiert med forringelse i magre fiskearter som er vakuumpakket eller MA-pakket (Dalgaard, 1995; Urbanczyk et al., 2011; Mathew et al., 2015), men har også blitt isolert fra

forringet laks (Budsberg et al., 2003). Videre har *Photobacterium carnosum* blitt isolert fra forringet MA-pakket fjærfekjøtt, mens *Photobacterium iliopiscarium* har blitt identifisert i forringet MA-pakket torsk (Hilgarth et al., 2018).

Forringelsespotensialet til *Photobacterium* spp. er knyttet til bakteriens evne til å vokse ved anaerobe forhold, lave og høye saltkonsentrasjoner (0-7% NaCl), lave temperaturer (2°C) og fordi den har høy CO₂-toleranse (>60%). Bakterien produserer TMA, som er en forbindelse som produseres fra TMAO som finnes i fisk, og som øker ved bedervelse (Olafsdottir et al., 2006; Figge et al., 2014; Lerfall et al., 2018).

2.6.2 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas er en artsrik slekt som kan finnes omtrent overalt. Bakterien er vanlig å finne i matforedlingsmiljøet, inkludert gulv, avløp, overflater, frukt, grønnsaker, kjøtt, melk og annen mat. Noen av artene er psykrotrofe, og er primært ansvarlig for ødeleggelse av kjøtt, fisk, skalldyr og meieriprodukter. Noen *Pseudomonas* arter er opportunistisk, menneskelig patogene hos immunkompromitterte individer (Liao, 2006).

Pseudomonas er aerobe, Gram-negative bakterier som finnes blant annet i jord og vann (Rawat, 2015). De krever generelt høy a_w for vekst, og hemmes av pH <5,4. Noen arter vokser ved kjøleskaptemperatur (psykrotrofe), mens andre er tilpasset vekst ved høyere temperaturer. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas ludensis* og *Pseudomonas viridiflava* i kombinasjon med *Shewanella putrefaciens* og *Xanthomonas campestris* er de viktigste artene når det kommer til forringelse av mat som frukt og grønnsaker. De forårsaker også mikrobiell kvalitetsødeleggelse av animalske matvarer som kjøtt, fisk og melk ved å skille ut lipaser og proteaser som forårsaker dannelse av H₂S sulfider, estere, aminer, ammoniakk og trimetylammin og ved å danne biofilm på overflater (Liao, 2006).

2.7 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier er naturlig tilstede i mange ulike fermenterte produkter og blir brukt til å konservere melk, grønnsaker og kjøtt. Melkesyrefermentering er en av de eldste konserveringsteknikkene og brukes til blant annet produksjon av ost, yoghurt, salami og surdeigbrød. Det er en gruppe med Gram-positive, ikke-bevegelige og ikke-sporedannende,

katalase-negative og fakultative anaerobe kokker eller staver, som produserer melkesyre som det viktigste sluttproduktet ved fermentering av karbohydrater. MSB regnes for å være trygge bakterier, og de fleste slektene har GRAS-status («Generally Recognized as Safe»), hvor noen stammer har vist seg å ha en probiotisk effekt (Adams & Moss, 2008).

Melkesyrebakterier tilhører rekken *Firmicutes*, klassen *Bacilli* og ordenen *Lactobacillales* (Zheng et al., 2020). Videre kan de deles inn i familiene *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* og *Streptococcaceae*. Familien *Lactobacillaceae* inneholder slektene *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* og *Pediococcus*. Basert på en studie utført av Zheng et al. (2020) ble det foreslått en revidering av taksonomien til familiene *Lactobacillaceae* og *Leuconostocaceae*. Det førte til at slekten *Lactobacillus* ble reklassifisert til 25 slekter, der 23 av dem er nye. Videre ble det foreslått å inkludere *Leuconostocaceae* i *Lactobacillaceae*-familien, noe som førte til en reklassifisering av over 300 arter. *Lactobacillaceae* består dermed nå av 31 slekter (Qiao et al., 2022). I hovedsak vil ny taksonomisk klassifisering benyttes i denne oppgaven, men noen studier benytter gammel klassifisering og vil dermed også bli brukt. Tabell 2.2 viser en oversikt over tidligere og nåværende navn på arter som er relevante i denne oppgaven.

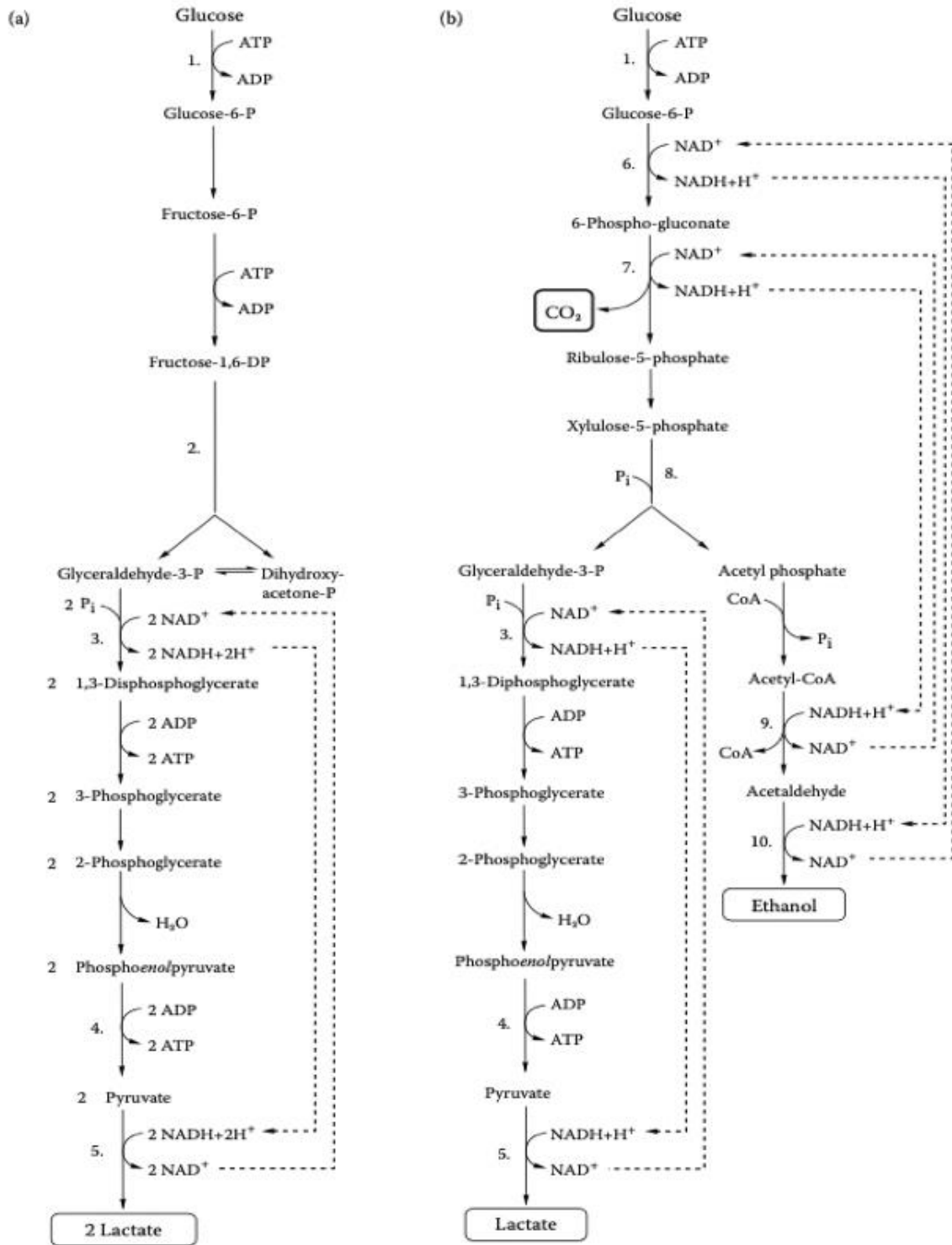
Tidligere var taksonomisk inndeling basert på bakterienes fenotypiske egenskaper, som optimal veksttemperatur, metabolisme og produserte metabolitter. Senere har også genotypiske og kjemotaksonomiske kriterier, inkludert DNA-DNA hybridisering, G+C mol% innhold og den kjemiske strukturen til peptidoglykanet i celleveggen blitt inkludert i inndelingen (Zheng et al., 2020). Tidligere har likheten mellom 16S rRNA-genet til bakteriene blitt brukt til taksonomisk inndeling, men de siste 15 årene har 2. generasjon helgenomsekvensering ført til flere endringer når det kommer til taksonomisk inndeling av bakterier.

Tabell 2.2. Eksempler på tidligere og nåværende arter i *Lactobacillus*-slekten (Zheng et al., 2020).

Tidligere navn	Nåværende navn
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus agilis</i>	<i>Ligilactobacillus agilis</i>
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>
<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>

Melkesyrebakterier er kjent for å ha en ønsket og positiv tilstedeværelse i næringsmidler, men i noen tilfeller kan tilstedeværelsen føre til uønskede konsekvenser. Bakteriene som assosieres med forringelse av næringsmidler inkluderer *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* og *Pediococcus*. De kan hovedsakelig føre til dårlig lukt, smak, misfarging, gass- og slimproduksjon, samt nedsatt pH (Lorenzo et al., 2018).

Melkesyrebakterier har ikke et funksjonelt respirasjonssystem, og er dermed avhengig av fermenterbare karbohydrater for å skaffe seg energi. Reaksjonsveien kan være homofermentativ (Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) reaksjonsvei) eller heterofermentativ (fosfoketolase-reaksjonsvei). Begge reaksjonsveiene vises i Figur 2.1, hvor den homofermentative reaksjonsveien stort sett kun produserer melkesyre fra fermentering av glukose, mens den heterofermentative reaksjonsveien i tillegg produserer CO₂, etanol og eddiksyre. Eksempler på MSB som er homofermentative er *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* og noen arter *Lactobacillus*. Heterofermentative bakterier inkluderer blant annet *Leuconostoc*, *Weissella* og noen arter *Lactobacillus* (Adams & Moss, 2008).



Figur 2.1. Reaksjonsveier for fermentering av glukose hos MSB. **a)** Homofermentativ fermentering (Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) reaksjonsvei) og **b)** Heterofermentativ reaksjonsvei (6-fosfoglukonat/fosfoketolase reaksjonsvei). Figuren er hentet fra von Wright & Axelsson (2011).

2.7.1 *Lactobacillus* spp.

Slekten *Lactobacillus* er en heterogen gruppe MSB med viktige implikasjoner i fermentering av mat. De har blitt brukt i en årrekke som starterkultur til fermentering av meieriprodukter, grønnsaker, fisk og pølser, samt har det blitt foreslått at de kan ha probiotiske egenskaper (Giraffa et al., 2010). *Lactobacillus* har et bredt spekter av anvendelser innen matteknologi, de har blant annet blitt brukt for å konservere mat ved å hemme vekst av andre mikroorganismer som kan forårsake matbåren sykdom eller forringelse (Bernardeau et al., 2006; Mejlholm et al., 2012; Mejlholm & Dalgaard, 2015). Derimot kan de føre til kvalitetsforringelse av mat i produkter hvor fermentering ikke er ønskelig (Gänzle, 2015).

Lactobacillus kan videre deles inn i tre grupper etter reaksjonsvei for glukose; obligat homofermentativ, fakultativ heterofermentativ og obligat heterofermentativ. Obligat homofermentative *Lactobacillus* følger EMP-reaksjonsveien og fermenterer heksose til melkesyre, mens fakultativ heterofermentative *Lactobacillus* fermenterer heksose til melkesyre via EMP-reaksjonsvei, men har også evnen til å omdanne pentose til melkesyre og eddiksyre gjennom fosfoketolase reaksjonsveien. Obligat heterofermentative *Lactobacillus* fermenterer heksose gjennom fosfoketolase-veien og ender opp med melkesyre, eddiksyre, etanol og CO₂ som endeprodukt. Noen *Lactobacillus* kan også omsette sitrat gjennom sitratfermentering (Adams & Moss, 2008; von Wright & Axelsson, 2011).

2.7.2 *Pediococcus* spp.

Pediococcus er en slekt av Gram-positive og kokkeformede MSB i familien *Lactobacillaceae* og har homofermentativ metabolisme (Porto et al., 2017). Noen stammer av *Pediococcus* er klassifisert som probiotiske (Todorov et al., 2023).

Pediococcus parvulus (tidligere *Pediococcus damnosus*) er en bakterie som er vanlig å bruke i produksjon av fermenterte matvarer som ost, yoghurt og sylteagurk. Metabolismen baserer seg primært på fermentering av karbohydrater for å produsere melkesyre og Adenin-tri-fosfat (ATP), hvor produsert melkesyre hjelper med å konservere matvarene. *Pediococcus parvulus* kan blant annet fermentere glukose, fruktose og galaktose gjennom EMP-reaksjonsvei, hvor glukose omdannes til pyruvat og videre til melkesyre (Todorov et al., 2023). Bakterien er derimot en vanlig kvalitetsforringende bakterie i øl og vin da den kan øke produktets viskositet og produsere diacetyl som gir en uønsket smørsmak (Lorenzo et al., 2018). Dette skyldes at den kan produsere ekstracellulært polysakkarid (EPS) fra både glukose, fruktose og

maltose (Smitinont et al., 1999; Nguyen et al., 2020). I næringsmiddelindustrien brukes ofte EPS-produserende bakterier for å forbedre tekstur, stabilitet og sensoriske egenskaper i meieriprodukter (Velasco et al., 2007). Derimot kan EPS i noen tilfeller medføre en negativ effekt, ved å endre tekturen, noe som kan føre til kvalitetsforringelse og nedsatt holdbarhet i produkter hvor disse karakteristikaene ikke er ønsket.

2.7.3 *Periweissella* spp.

Periweissella er en slekt av MSB som tidligere var klassifisert som *Weissella*. Endringen skjedde i 2020 når det ble oppdaget at *Periweissella* var fylogenetisk forskjellig fra *Weissella*. Basert på studien ble fem arter reklassifisert som slekten *Periweissella*, inkludert *Periweissella ghanensis* (tidligere *Weissella ghanensis*) og *Periweissella fabalis* (tidligere *Weissella ghanensis*). *Periweissella* har ikke GRAS-status, og det er uvisst om de har en probiotisk effekt (Fanelli et al., 2023).

Periweissella ghanensis og *Per. fabalis* er fakultative anaerobe, kokkeformede bakterier med obligat heterofermentativ metabolisme med melkesyre, etanol og eddiksyre som endeprodukt. *Periweissella fabalis* og *Per. ghanensis* har tidligere blitt isolert fra spontant fermenterte kakaobønner (De Bruyne et al., 2008; De Bruyne et al., 2010).

2.8 Genotypisk identifisering av bakterier

Genotypisk identifisering av bakterier kan være dyrkningsavhengig eller -uavhengig. Ved en dyrkningsavhengig metode dyrkes og isoleres mikroorganismene før DNA ekstraheres, mens for dyrkningsuavhengige metoder ekstraheres DNA direkte fra en prøve. Dyrkningsavhengige metoder benyttes til å isolere og identifisere bakterier som vokser opp på dyrkningsbaserte medier, men det er en tidkrevende prosess og en får ofte kun isolert de mest dominerende slektene/artene i en kultur. Valg av medium påvirker også hvilke mikroorganismer som isoleres. Dyrkningsuavhengige metoder er en semikvantitativ metode som ikke er like godt egnet til å kvantifisere. Metodene er derimot god til å vise diversiteten av et mikrobielt samfunn i en prøve (Jany & Barbier, 2008).

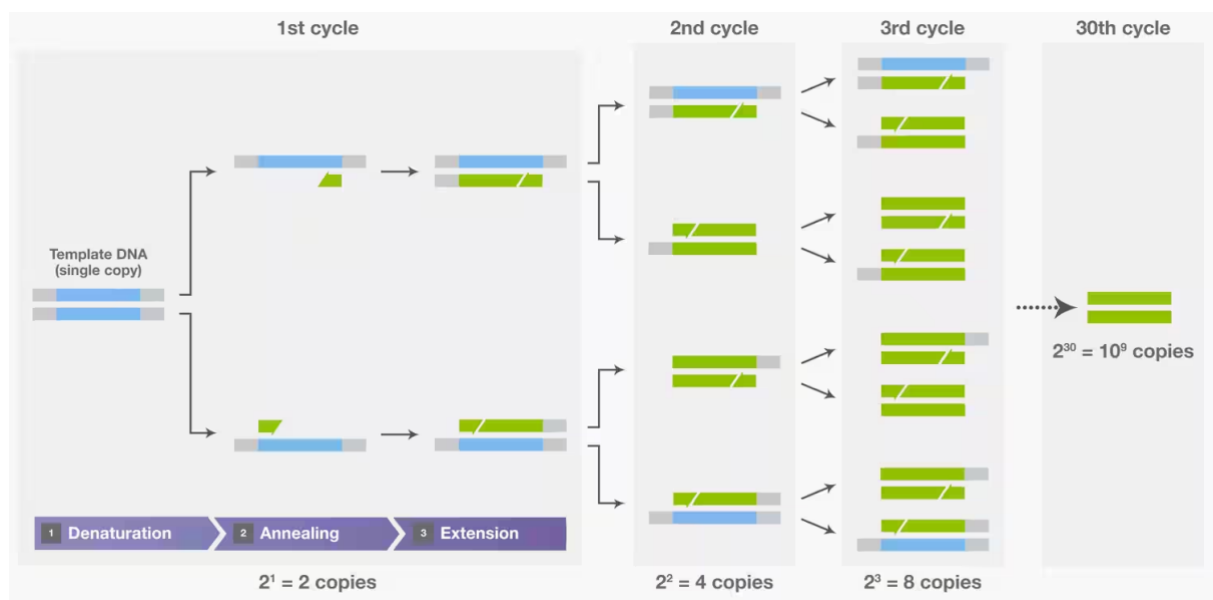
2.8.1 DNA-ekstraksjon

DNA-ekstraksjon er en molekylærbiologisk metode for å hente ut DNA fra mikroorganismer og som videre renses. For at dette skal være mulig må DNA først gjøres tilgjengelig ved at

cellen lyses og/eller knuses. Det finnes ulike metoder for dette, blant annet ved å bruke enzymer som lysozym som bryter ned peptidoglykan i bakteriecelleveggen, samt ved bruk av mekaniske eller termiske metoder. Etter lysing renses DNAet for andre komponenter ved sentrifugering. Videre tilsettes en løsning som feller ut uorganiske komponenter, celler og proteiner. I neste steg benyttes en silikakolonne til rensing av DNA. Her tilsettes en høykonsentrert saltløsning som gjør at DNAet binder seg til kolonnen før det vaskes med etanol. For at DNAet skal løsne fra kolonnen tilsettes en elueringsbuffer, som også fjerner salt (Gupta, 2019).

2.8.2 Polymerasekjedereaksjon

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en biokjemisk prosess som benyttes for å detektere og amplifisere store mengder DNA på kort tid. Metoden bruker en varme-kjølesyklus som repeteres flere ganger, og som krever tilstedeværelse av DNA-polymerase, primere («reverse» og «forward»), deoxynukleotidtrifosfat (dNTP) og DNA-templat som tilsettes reaksjonsløsningen. En skematisk presentasjon av reaksjonen vises i Figur 2.2. En PCR-reaksjon skjer ved tre trinn: 1) Denaturering («denaturation»); 2) hybridisering («annealing»); og 3) elongering («extension») (Garibyan & Avashia, 2013).



Figur 2.2. PCR reaksjon som består av tre steg; **1)** Denaturering av DNA-tråden, **2)** hybridisering, hvor primerne binder seg til de komplementære basene på DNA-tråden og **3)** elongering, hvor ny DNA-tråd syntetiseres. Figuren er hentet fra ThermoFischer Scientific (n.d.).

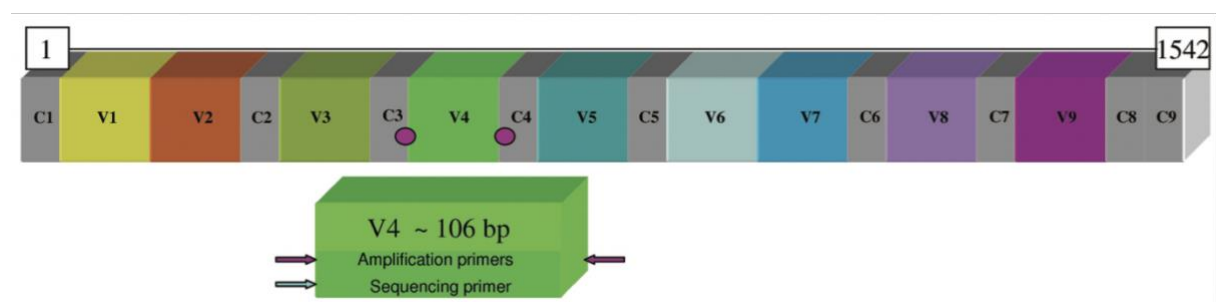
I det første steget varmes DNA opp til ca. 94°C slik at dobbeltrådet DNA denaturerer og splittes til to separate enkeltråder. Videre i trinn 2 kjøles DNAet ned til ca. 50-65°C og

primerne binder seg til sine komplementære nukleotidbaser i 3`-ende av hver tråd. I trinn 3 økes temperaturen til 72°C slik at DNA-polymerase kan syntetisere en ny DNA-tråd ved at dNTP-er kobles på. Denne prosessen gjentas flere ganger (20-35 ganger), og etter hver syklus doubles mengden (Kadri, 2020).

Kvantitativ PCR (qPCR) er en versjon av PCR som muliggjør kvantitativ analyse av det amplifiserte DNAet. Metoden går ut på at PCR-produkter aktiveres ved å inkludere fluoriserende molekyler i hver reaksjonsbrønn som gir økt fluorescens med en økende mengde DNA-produkt. Til dette benyttes DNA-bindende fargestoffer og fluorescensmerkede sekvensspesifikke primere eller prober. Den målte fluorescensen er proporsjonal med den totale mengden amplikon, slik at endringen i fluorescens over tid brukes til å beregne mengden amplikon som produseres i løpet av hver syklus i sanntid. Det gjør at det er mulig å kvantifisere den opprinnelige mengden av mål-DNA (Harshitha & Arunraj, 2021).

2.8.3 Sekvensering

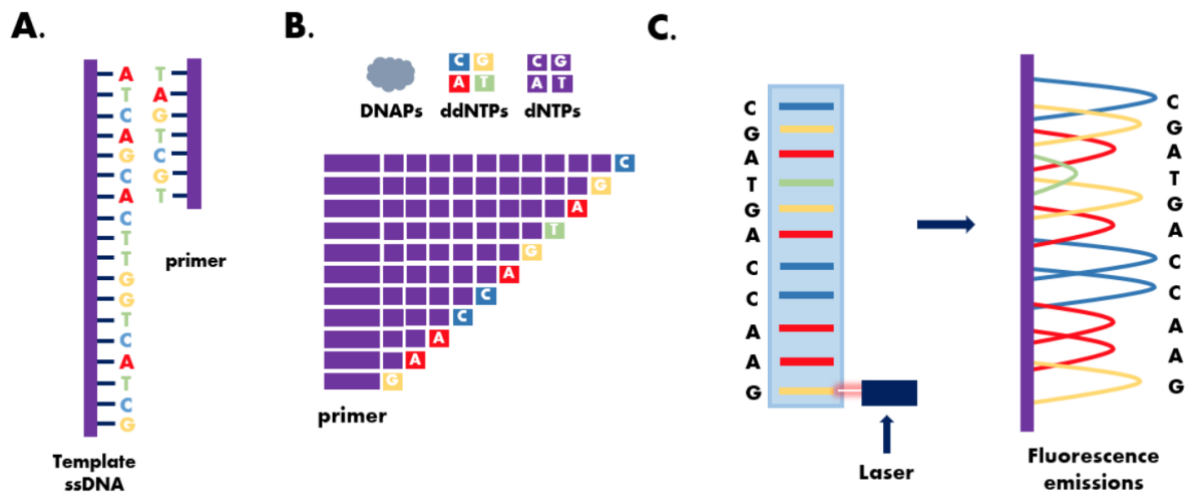
16S rRNA sekvensering har blitt en av de ledende metodene for bakteriologisk identifikasjon og refererer til sekvensering av 16S rRNA-genet som koder for den lille subenheten av ribosomet som finnes i prokaryote celler. DNA-sekvensering brukes ofte til identifisering og taksonomisk klassifisering av bakterier. Hos bakterier sekvenseres 16S rRNA-genet som består av ca. 1500 basepar (bp). Genet består av konserverte områder (C1-C9) som universelle primere kan feste seg til. Genet består også av ni hypervariable regioner (V1-V9) på 50-100 bp som varierer mellom ulike bakteriegrupper. Det er disse regionene som gjør det mulig å skille mellom bakterier på slekt- og artsnivå (Figur 2.3) (Petrosino et al., 2009).



Figur 2.3. Figuren viser det konserverte området (C1-C9) til 16S rRNA-genet vist i grått, og de hypervariable områdene (V1-V9) vist i ulike farger. Det er vist et eksempel hvor primere amplifiserer V4-regionen hvor bindesetet for primerne er markert med lilla sirkler. Figuren er hentet fra Petrosino et al. (2009).

2.8.3.1 Sanger sekvensering

Sanger sekvensering tilhører første generasjon sekvenseringsteknologi, og ble først utviklet av Frederick Sanger i 1976 (Shendure et al., 2017). Prinsippet for Sanger sekvensering er det samme som for PCR, men det er noen forskjeller. I Sanger sekvensering inngår det et ekstra trinn i syntesen som gjør at sekvensens identitet kan bestemmes, og det benyttes også kun en primer i reaksjonsblandingen (Figur 2.4). I tillegg til dNTP inngår det også lave konsentrasjoner dideoxynukleosid trifosfat (ddNTP) som mangler en reaktiv 3'-ende, slik at når disse inkorporeres i den voksende sekvensen vil elongeringen termineres. Fordi det både er dNTP og ddNTP til stede vil det være tilfeldig når reaksjonen termineres, og resultatet vil være fragmenter av ulik lengde. Hver ddNTP har også en fluoriserende markør med ulik farge for hver base. Når ddNTP settes på den elongerende sekvensen vil den gi fra seg et fluoriserende signal som gjør at nukleotidets posisjon kan bestemmes basert på fragmentets lengde. Fragmentene separeres basert på størrelse via kapillær gelelektroforese. En laser-detektor leser lyssignalene fra hvert bånd, og dermed kan ddNTP's posisjon på sekvensen bestemmes. Ved Sanger sekvensering kan sekvenser med en lengde på 800-1000 basepar sekvenseres (Crossley et al., 2020).



Figur 2.4. Sanger sekvensering bestående av 3 steg: A) Hybridisering, hvor primer bindes til templat-DNA. B) Elongering, hvor dNTPs og ddNTPs bindes til primer ved hjelp av DNA polymerase, inntil ddNTP fører til terminering. C) Kapillær gelelektroforese for å separere de ulike terminerte fragmentene etter størrelse og lasereksitasjon for deteksjon. Figuren er hentet fra Nguyen (2021).

2.8.3.2 Illumina sekvensering

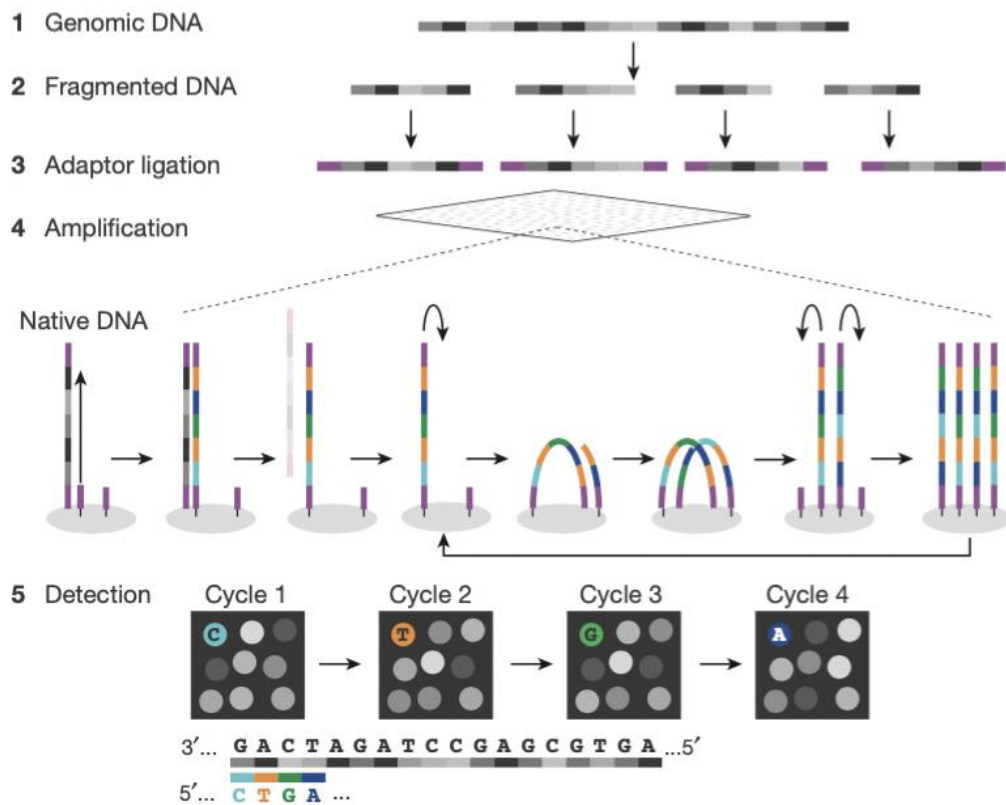
Illumina sekvensering er nestegenerasjons sekvenseringsteknologi som kan parallell-sekvensere flere millioner sekvenser samtidig. For bakterier er det de hypervariable områdene

V3 og V4 som sekvenseres (Fadrosh et al., 2014). Før selve opparbeidelsen av prøvebiblioteket til sekvenseringen, amplifiseres større mengder DNA ved PCR, ofte kalt PCR1 (van Dijk et al., 2014).

Figur 2.5 viser en oversikt over metoden som utføres på en flow-celle med overflatebundne oligonukleotider. Før sekvenseringen prepareres et bibliotek der mål-DNA modifiseres av adaptere i 5'- og 3'-enden. Dette foregår ved PCR, såkalt PCR2, hvor DNA vil bli fragmentert før adaptere settes på og DNA blir helgenomsekvensert (van Dijk et al., 2014). Adapteren er satt sammen av en sekvens ytterst, som binder seg til komplementære oligonukleotider på flow-cellen, index primer og en primer som binder DNA-polymerase.

Det opparbeidede biblioteket overføres til flow-cellen hvor adapterne på hvert DNA-fragment binder seg til de overflatebundne oligonukleotidene på flow-cellen. DNA blir broamplifisert, og det dannes et kluster med millioner av replikerte DNA-fragmenter. I selve sekvenseringen brukes modifiserte terminerende fluoriserende dNTP, som er terminerende ved at 3'-OH gruppen blokkeres og hindrer elongering. Klusterne med DNA-fragmenter sekvenseres ved at hver gang en terminerende base settes inn vil et lyssignal sendes ut fra de ulike klusterne, flow-cellen blir avbildet og første base kan detekteres. Fluoroforene på nukleotidene vaskes vekk, noe som gjør at et nytt modifisert terminerende nukleotid kan settes på. Nye modifiserte terminerende nukleotider tilsettes, og kan festes til neste posisjon. Fluoriserende lys fra hver celle sendes ut, og en ny avbildning tas for å identifisere basen på andre posisjon i sekvensene. Dette gjentas til alle basene i sekvensen er identifisert (van Dijk et al., 2014). Etter at alle basene og rekkefølgen på dem i en sekvens er identifisert, kan de databehandles ved bruk av bioinformatiske verktøy for taksonomisk identifisering. Sekvensene sammenlignes så opp mot en sekvens-database for å finne hvilke bakterier DNA-sekvensene har likhet med (Altschul et al., 1990).

Second generation sequencing (massively parallel)



Figur 2.5. Skjematisk oversikt over massiv parallellsekvensering. Genomisk DNA fragmenteres og adaptere liggeres til endene av fragmentene. Adapterne binder til immobiliserte oligonukleotider på en flow-celle og amplifiseres ved broamplifisering slik at det dannes klynger av replikerte fragmenter rundt hvert originale fragment. Klyngene blir sekvensert ved at fluoriserende terminerende nukleotidtrifosfater (ddNTP) bindes til DNA-fragmentene, noe som hindrer elongering og fluoriserende signaler sendes ut. Figuren er hentet fra Shendure et al. (2017).

3 Materialer og metoder

3.1 Etablering og oppbevaring av prøver

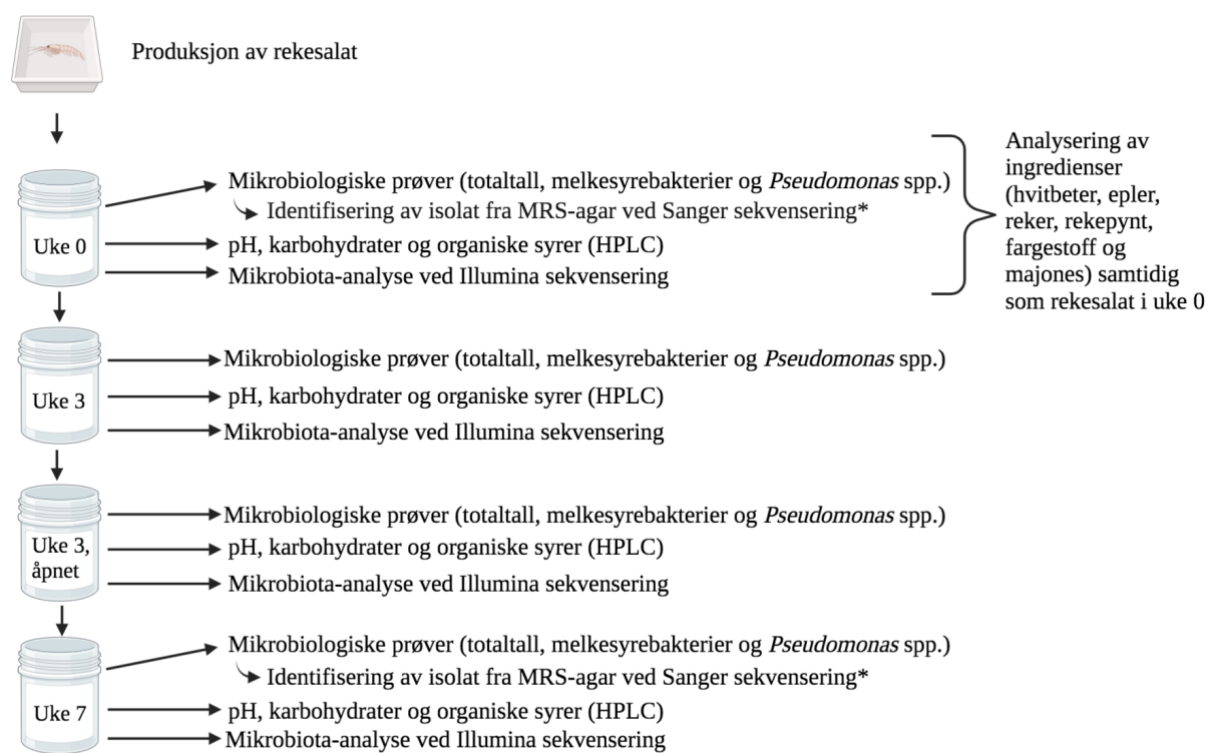
Rekesalat ble produsert hos en norsk næringsmiddelprodusent i perioden november 2022 til januar 2023, hvor rekesalat fra tre ulike produksjoner ble analysert gjennom holdbarhetstiden til produktet. Rekesalatene ble pakket i modifisert atmosfære (30% CO₂/70% N₂) og produktet har en vannaktivitet på ca. 0,97. I hver produksjon ble en rekesalat tidlig og sent i produksjonen undersøkt, hvor det var ca. 6-8 timer mellom produksjon av den første og siste rekesalaten. Rekesalatene ble analysert dagen etter produksjon (uke 0), etter tre uker (uke 3), etter tre uker med en uke åpen emballasje (uke 3, åpen) og ved «Best før dato» (uke 7). Uke 7 prøvene fra produksjon 3 ble analysert 8 dager før «Best før dato» av praktiske årsaker. Hver enkelt ingrediens ble i tillegg analysert (hvitbeter, tørket eple, majones, fargestoff, reker og rekepynt) samtidig som uke 0-salatene. De fleste råvarene i de tre produksjonene kom fra samme batch, unntatt hvitbeter fra produksjon 1 og rekepynt fra produksjon 3 som hadde en annen leverandør. Rekesalatene ble oppbevart ved 6°C i original emballasje mellom hver analysedag. To salater fra tidligere produksjoner med dårlig sensorisk kvalitet ble også analysert, hvor den ene prøven var en tilsvarende rekesalat (frost ned 8 uker etter produksjon) og den andre var skagenrøre (frost ned 9 uker etter produksjon) med et innhold av ca. 25% reker og 25% crabsticks. Disse to salatene var ikke MA-pakket. Tabell 3.1 viser en oversikt over produksjons- og analysedato for de ulike produksjonene. Figur 3.1 viser en oversikt over hvilke analyser som ble utført hver uke. Mikrobiota-analyse ved Illumina sekvensering og identifisering av isolat ved Sanger sekvensering ble gjort samtidig på alle prøvene, men DNA ble ekstrahert ved hver uke. En mer detaljert oversikt over analysene gjennomført og forsøksoppsettet vises i Figur 3.2. I forkant av forsøkene ble det gjort besøk på næringsmiddelbedriftens mikrobiologiske laboratorium for å observere laboratoriets rutiner slik at de mikrobiologiske undersøkelsene på KBM (NMBU) ble utført på en tilsvarende måte.

Tabell 3.1. Oversikt over produksjonsdato for rekesalat, samt analysedager for mikrobiologiske prøver. Det ble gjort prøveuttak ved uke 0 (dagen etter produksjon), uke 3, uke 3 med én uke åpent emballasje og uke 7 («Best før dato»).

Produksjon	Produksjonsdato	Analysering			
		Uke 0	Uke 3	Uke 3, åpen*	Uke 7, «Best før dato»
1	21.11.22	22.11.22	13.12.22	19.12.22	11.01.23
2	02.01.23	03.01.23	24.01.23	31.01.23	22.02.23
3	16.01.23	17.01.23	07.02.23	14.02.23	28.02.23**

*I uke 3 ble forseglingen på rekesalatene fjernet før videre oppbevaring ved 6°C i en uke før analysering.

**Uke 7-prøvene fra produksjon 3 ble analysert 8 dager før «Best før dato» (uke 6).

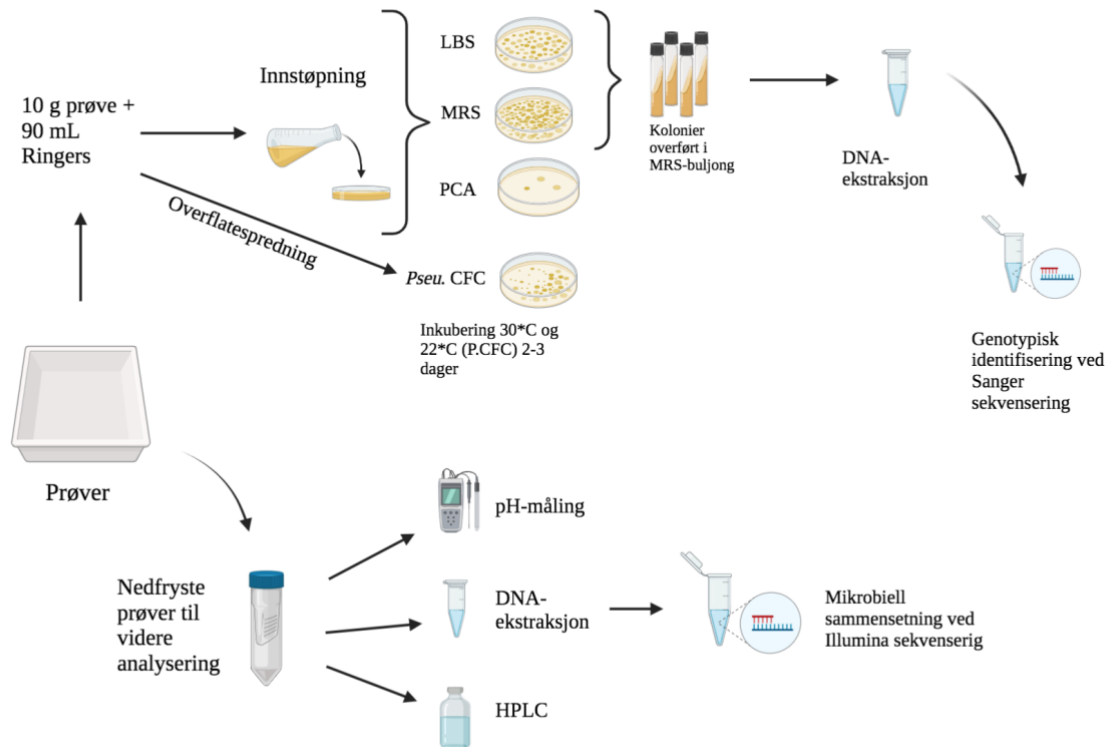


Figur 3.1. Forsøksoppsett som viser hvilke analyser som har blitt utført over holdbarhetstiden på 7 uker.

Ingrediensene ble analysert ved samme tidspunkt som rekesalat fra uke 0, dagen etter produksjon.

Prøvemateriale for måling av pH, karbohydrater og organiske syrer (HPLC), samt mikrobiotaanalyse ved

Illumina sekvensering ble frosset ned på -20°C hver uke. *Identifisering av isolat ved Sanger sekvensering ble kun utført på utvalgte kolonier fra uke 0 og uke 7 i produksjon 2 og 3. Illustrasjonen er laget i BioRender.com.



Figur 3.2. Forsøksoppsett som viser hvilke analyser som ble utført på rekesalat og ingredienser. Mikrobiologiske prøver, pH, HPLC og mikrobiota-analyse ved Illumina sekvensering ble utført på rekesalat i løpet av holdbarhetstiden på 7 uker. Genotypisk identifisering ved Sanger sekvensering ble kun utført på utvalgte isolater fra uke 0 og 7 i produksjon 2 og 3. Illustrasjonen er laget i BioRender.com.

3.2 Isolering og identifisering av melkesyrebakterier

For å undersøke celtallet (totaltall, melkesyrebakterier og *Pseudomonas* spp.) i rekesalatene og ingrediensene ble det brukt dyrkningsavhengige metoder, der prøvene ble innstøpt i generelle (PCA-agar), selektive (LBS-agar og *Pseudomonas* CFC-agar) og elektive (MRS-agar) vekstmedier. For å identifisere bakterier som vokste på MRS- og LBS-agar ble fem utvalgte kolonier fra hver prøve isolert og identifisert ved Sanger sekvensering.

3.2.1 Vekstmedier

Vekstmediene benyttet ble laget i henhold til produsentens anbefalinger (Tabell 3.2) og ble autoklavert ved 121°C i 15 minutter, med unntak av LBS-agar som etter tillaging ble kokt i ca. 30 minutter rett før bruk. *Pseu.* CFC-agar ble tilsatt supplement etter autoklivering og overført til petriskåler. Alle mediene ble oppbevart mørkt ved 4°C etter autoklivering frem til bruk.

Tabell 3.2. Vekstmedier benyttet i forsøket, samt inkubasjonstemperaturer og inkubasjonstider. Alle prøvene ble inkubert aerobt, med unntak av LBS-agar som ble inkubert anaerobt.

Agar/Buljong	Produsent	Mengde	Inkubasjons- temperatur (°C)	Inkubasjonstid (dager)
Plate Count Agar (PCA)	Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland)	22,5g/L	30	2-3
De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar*	Merck KGaA & VWR International BVBA (Leuven, Belgia)	52,2g/L	30	2-3
<i>Pseudomonas</i> agar base	Oxoid Ltd. (Hampshire, England)	24,2g/500 mL + 5 mL glyserol**	22	2-3
<i>Lactobacillus</i> selektiv (LBS) agar	Becton, Dickinson Microbiology Systems (Sparks, MD, USA)	16,8g/200 mL + 264 µl 100% iseddik	30, anaerobt***	2-3

*MRS agar: MRS buljong ble tilsatt 15 g/L Agar pulver (VWR)

**Tilsatt 1 vial *Pseudomonas* C-F-C Supplement/500 mL etter autoklivering (Oxoid Ltd, Hampshire, England)

***Inkubering i anaerobt kar ved bruk av AnaeroGen™ (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

3.2.2 Bearbeiding av prøver

Prøvene ble blandet godt før 10,0 g ble tatt ut og tilsatt 90 mL Ringers løsning. Prøvene ble deretter homogenisert (Stomacher 400, Seward Ltd., West Sussex, Storbritannia) i 30 sekunder ved normal hastighet og videre fortynnet i Ringers løsning før de ble støpt inn i PCA-, LBS- og MRS-agar, samt overflatespredd på *Pseu.* CFC-agar. Agarskålene ble inkubert i henhold til informasjonen gitt i Tabell 3.2. Alle prøvene ble deretter fryst ned på -20°C i falconrør til videre analysering (DNA-ekstraksjon, HPLC og pH). Agarskåler med 30-300 kolonier etter utplating på MRS- og LBS-agar fra produksjon 2 og 3 ble tatt vare på og oppbevart ved 6°C til koloni-isolering.

3.2.3 Isolering

Fra LBS- og MRS-skålene ble det plukket fem tilfeldige kolonier fra hver prøve. Koloniene ble overført til 5 mL MRS-buljong og inkubert ved 30°C i 1-2 døgn frem til synlig vekst. Deretter ble 750 µl kultur og 250 µl 60% glyserol, tilsvarende 15% (v/v) glyserol, overført til cryorør og frosset ned på -80°C inntil videre bearbeiding. Totalt ble 165 kolonier isolert og nedfrosset.

3.2.4 Genotypisk identifisering av renkultur ved Sanger sekvensering

For å finne ut hvilke melkesyrebakterier som var i rekesalatene ble 12 av 165 nedfrosede isolater plukket ut til videre DNA-analyse ved Sanger sekvensering. Det ble antatt at bakteriene som vokste på MRS-agaren var melkesyrebakterier. Det ble valgt tre isolater fra uke 0 og tre isolater fra uke 7, fra produksjon 2 og 3 (uke 6 fra produksjon 3).

3.2.4.1 DNA ekstraksjon

De nedfrosne isolatene ble overført til 5 mL MRS-buljong, hvor de ble inkubert i ett døgn ved 30°C. DNA ble ekstrahert ved bruk av DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) i henhold til produsentens beskrivelse, med unntak av at det ble tilsatt 50 µl elueringsbuffer i stedet for 100 µl.

3.2.4.2 PCR

Isolert DNA ble amplifisert ved bruk av PCR der primere for 16S rRNA-genet til bakterier ble valgt. Reaksjonsløsningen til PCR ble preparert i henhold til Tabell 3.3 og overført til PCR-rør før amplifisering i en C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Primerne benyttet til amplifisering var 1F (5` - GAGTTTGATGGTGGGTCAG - 3`) og 5R (5` - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3`) (invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Tabell 3.3. Reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet i PCR reaksjonsblandingen for 16S rRNA amplifisering.

Reagens	Opprinnelig konsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
1F primer	10 µM	0,5 µM	1,25
5R primer	10 µM	0,5 µM	1,25
Q5 master mix*	2x	1x	12,5
PCR grade H ₂ O**			8
DNA			2
Totalt volum			25

*Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, New England BioLabs, UK.

**invitrogen by Thermo Fischer Scientific, Austin, Texas, USA.

PCR reaksjonsblanding og DNA ble tilsatt i hver PCR-brønn og amplifiseringen ble utført etter PCR-programmet gjengitt i Tabell 3.4.

Tabell 3.4. PCR-program for amplifisering av 16S-rRNA genet til bakterier.

Program	Tid (minutter)	Temperatur (°C)	Repetisjoner
Innledende denaturering	00:30	98	1
Denaturering	00:10	98	
Hybridisering	00:30	55	32
Syntetisering	00:42	72	
Endelig syntetisering	02:00	72	1

3.2.4.3 Agarose gelelektroforese

Etter amplifisering av 16S rRNA-genet ble PCR-produktene sjekket ved agarose gelelektroforese. Agarosegel (2%) ble laget ved å løse opp 1 g agarose (SeaKem® LE agarose, Lonza, Rockland, USA) i 50 mL 1 x TAE (Tris Acetate EDTA, Merck). Løsningen ble løst opp ved å koke den i mikrobølgeovn. Deretter ble 1 µl GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, CA, USA) tilsatt agaroseløsningen ved ca. 60°C og overført til et støpekar. Når gelen hadde stivnet ble den overført til et elektroforesekar og hver brønn ble tilsatt 9 µl prøve bestående av 3 µl PCR-produkt, 2 µl agarose gel loading dye 6X ultra Pure (VWR International, Leuven, Belgia) og 6 µl PCR-grade H₂O. En 100 bp ladder (New England Biolabs, UK) ble brukt som størrelsesmarkør. Elektroforesen ble kjørt ved 112 V i ca. 30 minutter med Power Pac 300 (BioRad Laboratories, CA, USA).

3.2.4.4 Rensing av PCR-produkt

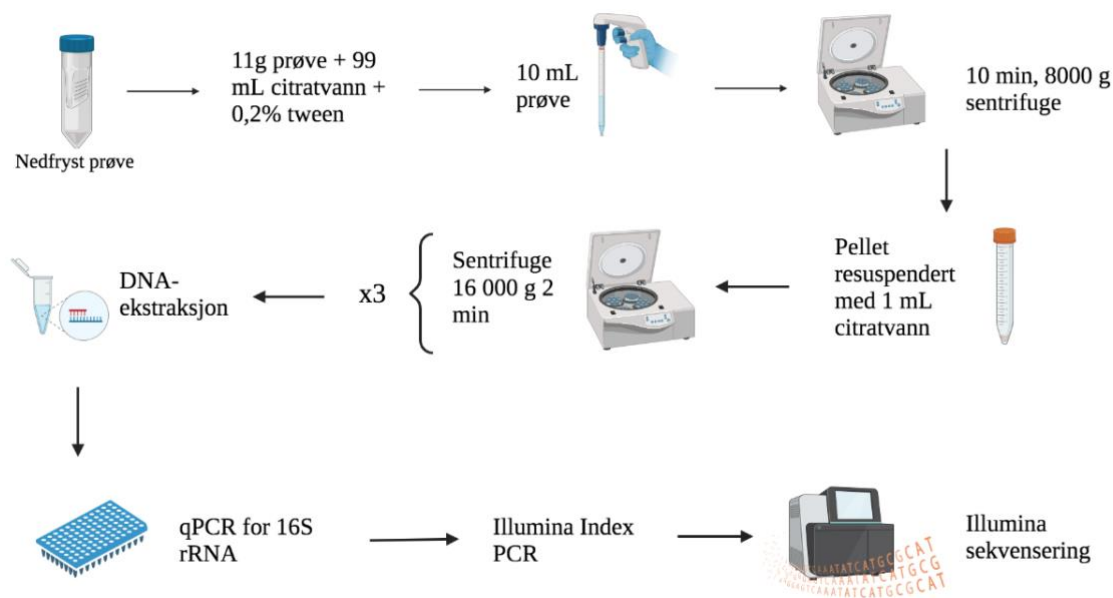
Rensing av PCR-produktene ble utført med GenElute™ PCR-Clean up kit (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland). PCR-produktene ble renset i henhold til produsentens prosedyre, med unntak av at det ble benyttet 30 µl elueringsbuffer i stedet for 50 µl.

3.2.4.5. Sanger sekvensering og bearbeiding av data

DNA-konsentrasjonen ble sjekket ved bruk av NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (ThermoFischer Scientific, Wilmington, USA). Basert på DNA-konsentrasjonen ble det tilsatt 1 eller 1,5 µl DNA i 1,5 mL eppendorfrør. Videre ble det tilsatt 5 µl 5 µM primer, hvor 1F- og 1R-primer ble tilsatt i separate rør. Totalvolum i hvert rør skulle være 10 µl, slik at resterende volum ble justert ved tilsetning av PCR-grade H₂O. Rørene ble sendt til Eurofins Genomics (Ebersberg, Tyskland) for Sanger sekvensering. Sekvensene ble videre trimmet og satt sammen i Biorender. Deretter ble sekvensdatabasen GenBank (National Library of Medicine, Bethesda, USA) og søkeverktøyet BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) benyttet.

3.3 Mikrobiell sammensetning ved Illumina sekvensering

For å analysere den mikrobielle sammensetningen i rekesalatene gjennom holdbarhetstiden ble det gjennomført nestegenerasjons-sekvensering av 16S rRNA-genet til bakteriene. Det ble utført analyse av totalt 42 prøver som ble innhentet fra rekesalater og ingredienser fra tre ulike produksjoner over holdbarhetstiden på 7 uker. En oversikt over prøvebearbeidelse vises i Figur 3.3. Majones fra produksjon 3 ble ikke analysert grunnet ødelagt beholder og dermed mulig kontaminasjon av prøven. Uke 7-prøvene fra produksjon 3 ble analysert 8 dager før «Best før dato» grunnet praktiske årsaker. I tillegg ble to nedfrosse prøver med dårlig sensorisk skår fra tidligere produksjoner inkludert. Den ene prøven var en tilsvarende rekesalat (frosset ned 8 uker etter produksjon), mens den siste prøven var skagenrøre som inneholder reker og crabsticks (frosset ned 9 uker etter produksjon).



Figur 3.3. Oversikt over de ulike stegene for DNA-ekstraksjon og Illumina sekvensering. Først ble det ekstrahert DNA fra alle prøvene og det ble laget bibliotek ved å kjøre qPCR for rRNA amplifisering. Til slutt ble Illumina sekvensering utført. *Illustrasjonen er laget i BioRender.com.*

3.3.1 DNA ekstraksjon

Nedfrost prøve ble tint i vannbad og blandet godt før 11,0 g prøve ble veid ut i sterile stomacherposer og tilsatt 99 mL sitratvann (Tri-Sodium citrate dihydrate, Merck, Darmstadt Tyskland) tilsatt 0,2% tween (Tween 20, Merck, Darmstadt, Tyskland). Fortynningsvannet

ble temperert til 48°C før det ble tilsatt og prøven homogenisert i en Stomacher på høy hastighet i 120 sekunder. Prøven (10 mL) ble så overført til 15 mL falconrør og sentrifugert i en Heraeus Multifuge X3R sentrifuge (ThermoFisher Scientific, Osterode, Tyskland) på 8000 x g ved 4°C i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 1 mL sitratvann før overføring til 2 mL eppendorfrør. Prøvene ble deretter sentrifugert på 16 000 x g i 2 minutter (Eppendorf Centrifuge 5415 D) før supernatanten ble fjernet. Vasketrinnet av pellet ble utført totalt tre ganger.

For å ekstrahere DNA i prøvene ble DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen) benyttet. Prøvene ble preparert i henhold til produsentens beskrivelse, med unntak av at det ble tilsatt 50 µl elueringsbuffer istedenfor 100 µl. Ekstrahert DNA ble frosset ned ved -20°C før videre analysering.

3.3.2 qPCR for 16S rRNA amplifisering

For å amplifisere 16S rRNA-genet til bakterier ble primer uni16SF (5` - CCTACGGGRBGCASCAG - 3`) og uni16SR (5` - GGACTACYVGGGTATCTAAT - 3`) (invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) benyttet. PCR mastermiks ble preparert i henhold til Tabell 3.5, hvor 18 µl mastermiks og 2 µl DNA ble tilsatt i en brønnplate.

Tabell 3.5. Reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet i qPCR for 16S rRNA amplifisering.

Reagens	Opprinnelig konsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
Q5 master mix*	2x	1x	10
uni16SF primer	5 µM	0,2 µM	1
uni16SR primer	5 µM	0,2 µM	1
Evagreen**	20x	1x	1
Templat DNA	1-100 ng/µl	7,5-150 ng	2
PCR grade H ₂ O***			5
Totalt volum			20

*Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, New England BioLabs, UK.

**Biotium, Fremont, California, USA.

***invitrogen by Thermo Fischer Scietific, Austin, Texas, USA.

PCR-programmet som ble utført er vist i Tabell 3.6 og det ble benyttet en LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Basel, Sveits) til amplifiseringen.

Tabell 3.6. qPCR-program for amplifisering av 16S-rRNA genen hos bakterier i rekesalat og ingredienser.

Program	Tid (minutter)	Temperatur (°C)	Sykluser
Innledende denaturering	00:30	98	1
Denaturering	00:10	98	
Hybridisering	00:30	53	35
Syntetisering	00:20	72	
Endelig syntetisering	5:00	72	1
Smeltekurve	∞		

Etter qPCR ble smeltekurven sjekket for alle PCR-produktene, hvor prøver uten registrert amplifisering av DNA ble fortynnet 1:10 og kjørt på nytt. Prøvene ble så fryst ned i brønnplaten ved -20°C inntil videre bearbeiding.

Rensing av PCR-produktene ble utført av ingeniør Fiona Valerie Franklin-Alming ved KBM, NMBU.

PCR-produktet ble rensert med AMPure XP kuler (Beckman Coulter, Inc Brea, CA, USA).

Det ble tilsatt 14 µl AMPure-kuler til hvert PCR-produkt, blandet ved pipettering og overført til en ren brønn-plate. Blandingen ble inkubert i romtemperatur i fem minutter og deretter flyttet til en magnet og inkubert i ytterligere to minutter. Deretter ble supernatanten fjernet og 100 µl 80% etanol ble tilsatt prøvene og inkubert i 30 sekunder. Supernatanten ble så fjernet og 80% etanol ble igjen tilsatt. Prøvene lufttørket deretter i syv minutter inntil all etanol var fordampet. Platen ble så fjernet fra magneten og 20 µl elueringsbuffer (EB Qiagen, Hilden, Tyskland) ble tilsatt og inkubert i to minutter. Videre ble platen satt tilbake på magneten og inkubert i ytterligere fem minutter. Til slutt ble 16 µl eluat pipettert over til en ny brønnplate og fryst ned ved -20°C inntil videre bearbeiding.

3.3.3 Illumina Index PCR

Illumina Index PCR ble utført av ingeniør Fiona Valerie Franklin-Alming ved KBM, NMBU.

Rensert PCR-produkt (4 µl) ble brukt som templat for Illumina Index PCR med ulike kombinasjoner av primere. PCR-mastermikks ble preparert etter Tabell 3.7 og overført til en brønnplate.

Tabell 3.7. Reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet i Illumina Index PCR.

Reagens	Opprinnelig konsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
HotFirePol® DNA polymerase	5 U/µl	1,25 U	0,25
HotFirePol® buffer B2	10x	1x	2,5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTPs	10 mM	200 µM	0,5
Evagreen*	20x	1x	1
Index forward primer	5 µM	0,25 µM	1
Index reverse primer	5 µM	0,25 µM	1
Templat DNA	5-100 ng/µl	7,5-150 ng	4
PCR grade H ₂ O**			12,25
Totalt volum			25

*Biotium, Fremont, California, USA.

**invitrogen by Thermo Fischer Scientific, Austin, Texas, USA.

Index-PCR ble utført i en Lightcycler® 480 II, og PCR-programmet som ble brukt er vist i Tabell 3.8.

Tabell 3.8. PCR-program for Illumina indexing PCR.

Program	Tid (minutter)	Temperatur (°C)	Sykluser
Innledende denaturering	15:00	95	1
Denaturering	00:30	95	
Hybridisering	01:00	55	10-15
Syntetisering	00:45	72	
Endelig syntetisering	7:00	72	1

PCR-produktet ble videre renset og normalisert ved bruk av SequalPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). PCR-produkt (20 µl) ble overført til en SequalPrep™ brønnplate og tilsatt 20 µl bindings buffer. Blandingen ble blandet godt og inkubert i 1 time ved romtemperatur. Væsken ble så fjernet og 50 µl vaskebuffer ble tilsatt i brønnene og blandet ved å pipettere opp og ned to ganger. Væsken ble igjen fjernet og 20 µl elueringsbuffer ble tilsatt kolonne 1, 5 og 9 på platen, før inkubering i romtemperatur i 5 minutter. Blandingen ble så overført til neste kolonne og inkubert i 5 minutter. Dette ble gjort gjentatte ganger til hele platen var ferdig. Normalisert DNA-eluat ble overført til rør og kvantifisert med Qubit 2.0 (invitrogen by Thermo Fischer Scientific, Austin, Texas, USA). Til

slutt ble Illumina sekvensering utført av Norwegian Sequencing Center ved Universitetet i Oslo.

3.3.4 Bioinformatisk analyse

Den mikrobielle sammensetningen i rekesalat fra tre ulike produksjoner, inkludert deres ingredienser, ble undersøkt ved hjelp av sekvensdataene fra Illumina Miseq 2x300 bp V3 kit (Illumina). Fire uttak gjennom holdbarhetstiden og hver enkelt ingrediens ble analysert.

Råfiler ble kvalitetsfiltrert og sekvensvarianter ble utledet ved bruk av R package Dada2 (Callahan *et al.*, 2016). ASV tabellen ble deretter visualisert ved å bruke relativ fordeling av de med flest sekvensvarianter. Annotering av de ulike sekvensene ble utført ved bruk av BLAST og topptreffene på artsnivå ble brukt til å identifisere artsnivået.

3.4 «High Performance Liquid Chromatography»

For å undersøke omsetningen av karbohydrater (glukose, maltose og fruktose) og organiske syrer (melkesyre, sitronsyre og eddiksyre) i rekesalat og ingredienser (hvitbeter, tørket eple, majones, reker og rekepynt) ble «High Performance Liquid Chromatography» (HPLC) utført med en metode beskrevet av Grønnevik *et al.* (2011), med noen modifikasjoner. Fargestoffet ble ikke analysert grunnet sterk farge, og to salater (rekesalat og skagenrøre) med dårlig sensorisk kvalitet fra tidligere produksjoner ble inkludert.

Tabell 3.7. Reagenser, produsent og volum benyttet ved HPLC.

Reagens	Produsent	Volum
Ionebyttet vann		5 mL
0,5 M H ₂ SO ₄	Merck, Tyskland	700 µl
Acetonitril	Merck, Tyskland	20 mL

Prøvene ble blandet godt før 2,00 g ble veid inn i et 50 mL rør. Deretter ble hvert rør tilsatt løsningene i henhold til Tabell 3.7. Videre ble rørene ristet godt for hånd før de ble satt i en vendemaskin i ca. 30 minutter. Prøvene ble deretter sentrifugert i 15 minutter ved 1100 rpm i en Funke-Gerber sentrifuge (Berlin, Tyskland), i romtemperatur. Deretter ble ca. 1 mL supernatant filtrert gjennom en 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør.

Analysen ble gjennomført ved bruk av HPLC-instrumentet Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), som består av en pumpe (Agilent Technologies), autosampler (Agilent Technologies), kolonneovn (Agilent Technologies), DAD-UV detektor (Agilent Technologies) og RI-detektor (Agilent Technologies). Programvaren benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies). Prøven (25 µl) ble injisert og separert med en Aminex HPX-87 kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For å beskytte kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en forkolonne (Cation-H refill, Bio-Rad Laboratories). Kolonnetemperatur var satt til 32°C og den mobile fasen benyttet var 5 mM H₂SO₄ (Merck), med en hastighet på 0,4 mL/min.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som de analyserte prøvene, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydratene benyttet til standardløsningen var maltose, fruktose og glukose (Merck), og av organiske syrer ble sitronsyre, melkesyre og eddiksyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet. Karbohydrater og eddiksyre ble detektert ved bruk av en RI-detektor, mens organiske syrer ble detektert ved å bruke en DAD-UV detektor.

3.5 pH-måling

For å måle pH i prøvene ble det benyttet et PHM 92 LAB pH-meter og en kombinert pH elektrode (Radiometer Copenhagen). pH-metret ble kalibrert ved bruk av standard bufferløsning ved pH 4,0 og 7,0 (Merck). Prøvene ble blandet godt før måling, men ved lite homogene prøver ble det tatt tre målinger av hver prøve. For å måle pH i tørkede eplebiter ble ca. 25g prøve blandet med 10 mL destillert vann. Blandingen ble så stående i romtemperatur i ca. 30 minutter før måling.

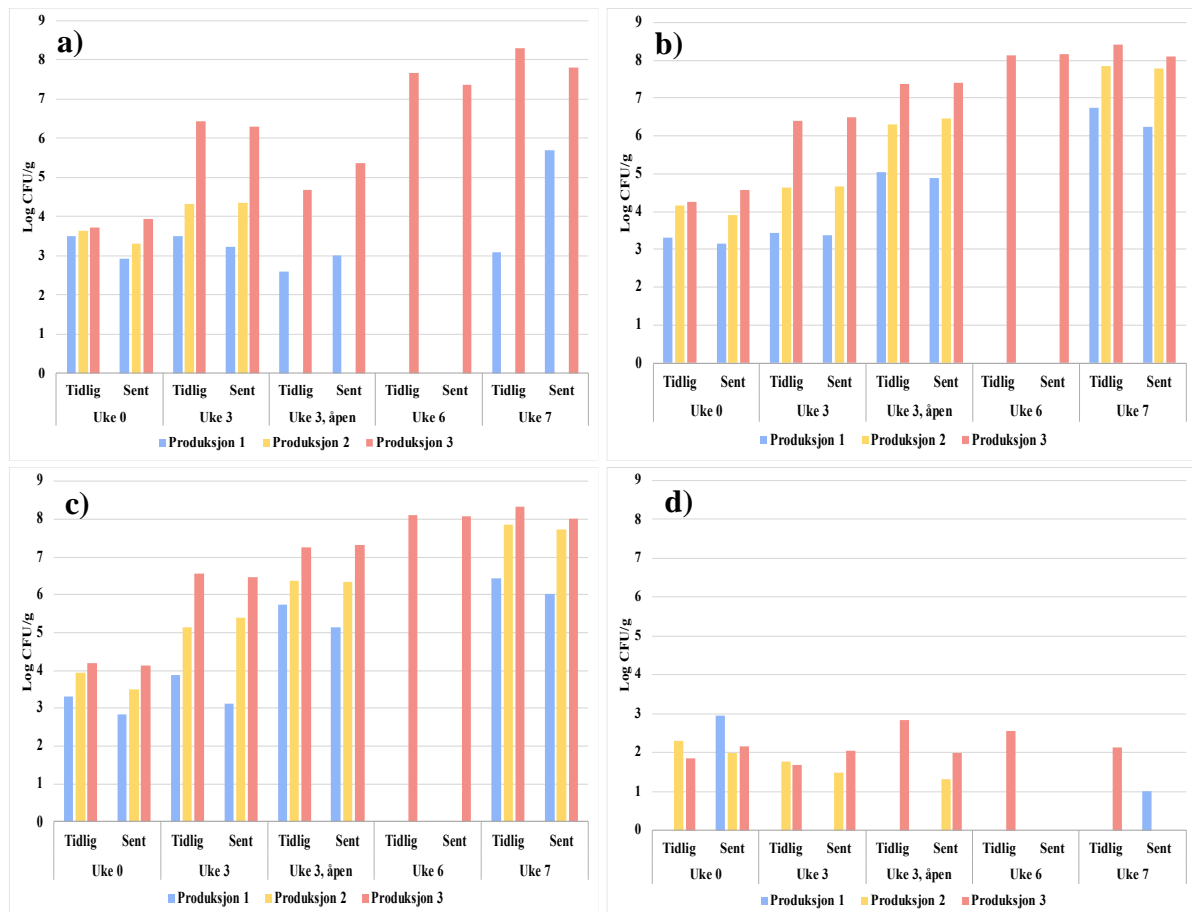
4 Resultater

Rekesalat og ingredienser fra tre ulike produksjoner ble analysert gjennom holdbarhetstiden på 7 uker. Prøvene ble analysert for celletall, karbohydrater og organiske syrer (HPLC), pH og identifisering av isolat ved Sanger sekvensering og mikrobielle samfunn ved bruk av Illumina sekvensering.

4.1 Celletall

Celletallene i rekesalat fra tre produksjoner ble analysert i uke 0 (en dag etter produksjon), uke 3, uke 3 med én uke åpnet emballasje og ved best før-dato (uke 7). Produksjon 3 ble i tillegg analysert i uke 6 (8 dager før «Best før dato») av praktiske årsaker på grunn av Illumina sekvensering. Det ble analysert for total antall mesofile aerobe bakterier (PCA-agar), melkesyrebakterier (LBS- og MRS-agar) og *Pseudomonas* spp. (*Pseu.* CFC-agar). Tallene er oppgitt i log CFU/g (Figur 4.1), og rådata vises i Vedlegg 1-4. Noen produksjoner mangler tall, noe som enten skyldes at det ikke var vekst på fortyningene benyttet eller at «pin point» kolonier ble observert, men ikke inkludert.

Figur 4.1a viser at total antall aerobe bakterier øker en del fra uke 0 til 7, hvor produksjon 3 hadde høyest vekst gjennom hele holdbarhetstiden med 8,3 log CFU/g i uke 7 tidlig produksjon. Dette illustreres videre i Figur 4.1b og c, hvor celletallet økte på både LBS- og MRS-agar. På LBS-agar økte det fra 4,26 (tidlig produksjon) og 4,58 (sent i produksjon) log CFU/g i uke 0 til henholdsvis 8,41 og 8,09 log CFU/g i produksjon 3. Veksten på MRS- og LBS-agar var tilsvarende lik gjennom holdbarhetstiden i alle produksjonene. Det var videre ingen stor forskjell på celletallene fra tidlig og sent i produksjonen, men celletallet var stort sett litt høyere i rekesalatene fra tidlig i produksjonen. Alle produksjonene hadde vekst i området 1,84-2,95 log CFU/g på *Pseu.* CFC-agar ved uke 0 (Figur 4.1d), men veksten ble redusert gjennom holdbarhetstiden, med unntak av noen av prøvene med åpen emballasje fra uke 3.



Figur 4.1. Celletall (log CFU/g) fra **a)** PCA-agar, **b)** LBS-agar, **c)** MRS-agar og **d)** *Pseu.* CFC-agar tidlig og sent fra produksjon 1, 2 og 3. Prøvene ble analysert i uke 0, uke 3, uke 3 med en uke åpen emballasje og uke 7. Produksjon 3 ble i tillegg analysert i uke 6. PCA-agar ble brukt til total antall aerobe bakterier, LBS- og MRS-agar til melkesyrebakterier og *Pseu.* CFC-agar til *Pseudomonas* spp. Manglende vekst skyldes ingen vekst på benyttet fortyning eller «pin point» kolonier som ikke ble tatt med.

Ingrediensene som ble benyttet under hver produksjon ble analysert dagen etter produksjonen, samtidig som uke 0 prøvene til rekesalat. Gjennomsnittlig celletall (log CFU/g) med oppgitt standardavvik fra PCA-, LBS-, MRS- og *Pseu.* CFC-agar vises i Tabell 4.1. Som en ser har majones høyest celletall på LBS- og MRS-agar med henholdsvis $3,43 \pm 0,35$ log CFU/g og $3,52 \pm 0,10$ log CFU/g. Resterende ingredienser hadde relativt lave tall, med unntak av fargestoffet ($3,21 \pm 1,25$ log CFU/g) og reker ($3,39 \pm 0,46$ log CFU/g) på PCA-agar.

Tabell 4.1. Celletall (log CFU/g) i ingrediensene fra rekesalat. Verdiene er et gjennomsnitt av verdiene fra de tre produksjonene med oppgitt standardavvik beregnet av eksponentielle tall. PCA-agar ble brukt til total antall aerobe bakterier, LBS- og MRS-agar til melkesyrebakterier og *Pseu.* CFC-agar til *Pseudomonas* spp.

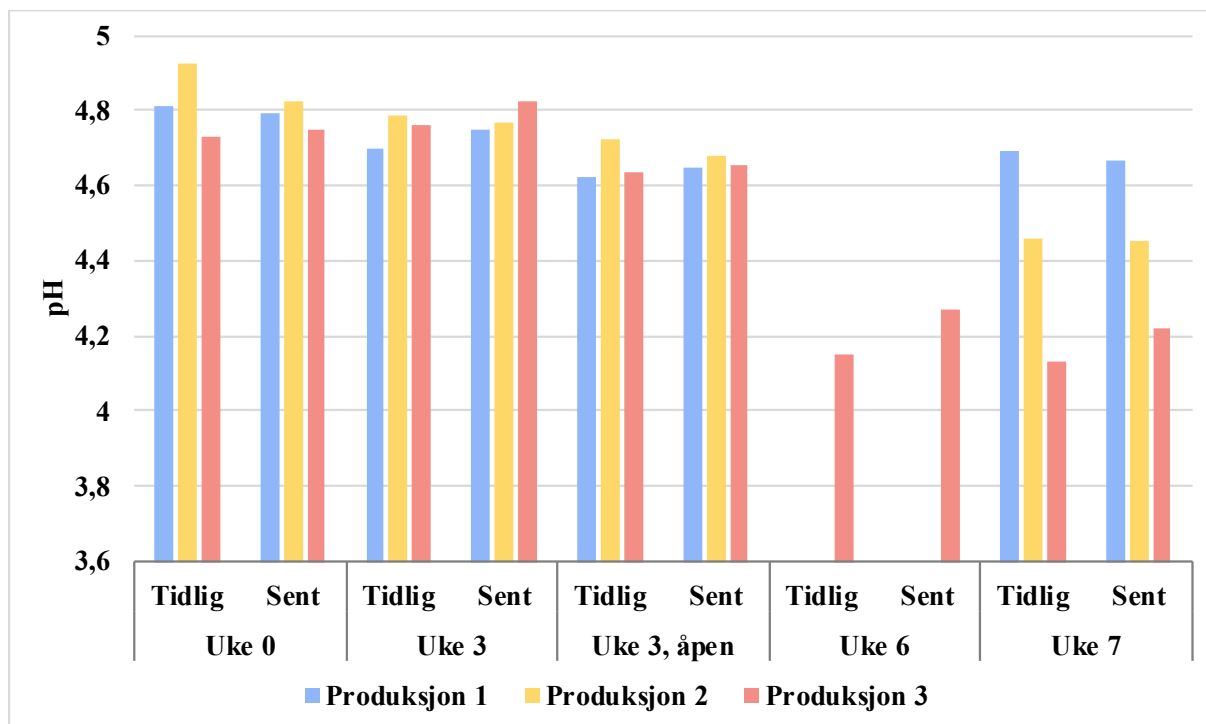
Celletall (log CFU/g)				
Ingrediens	PCA	LBS	MRS	<i>Pseu.</i> CFC
Hvitbete	2,46 ± 0,31	<1	<1	<1
Eple	2,27 ± 0,22	0,92 ± 0,80	1,46 ± 0,45	<1
Majones	1,1 ± 1,91	3,43 ± 0,35	3,52 ± 0,10	2,04 ± 1,89
Farge	3,21 ± 1,25	<1	<1	2,54 ± 2,30
Reke	3,39 ± 0,46	0,43 ± 0,75	2,64 ± 1,48	0,61 ± 1,06
Rekepynt	3,28 ± 1,05	1,21 ± 1,05	1,63 ± 2,83	2,99 ± 1,53

4.2 Metabolisme

Karbohydrater og organiske syrer i rekesalat og ingredienser ble analysert gjennom holdbarhetstiden på 7 uker ved bruk av HPLC. Prøver ble tatt ut og fryst ned til analysene ved uke 0, uke 3, uke 3 med én ukes brutt emballasje og ved «Best før dato» (uke 7). Prøver av ingrediensene ble tatt ut og fryst ned dagen etter produksjon. pH ble også målt. To prøver (rekesalat og skagenrøre) med dårlig sensorisk skår fra tidligere produksjoner ble også analysert.

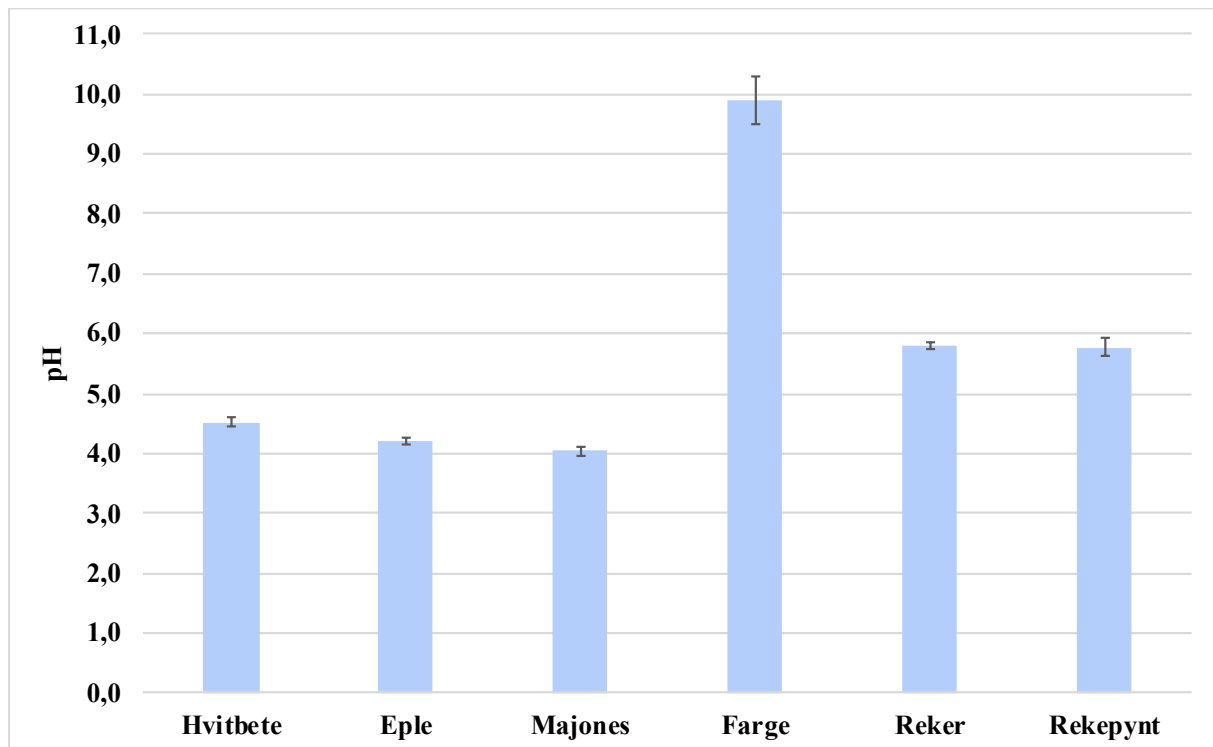
4.2.1. pH

pH ble målt etter tining av nedfrosne prøver og rådata vises i Vedlegg 6. I produksjon 3 ble pH i rekesalat målt i uke 6 i tillegg til uke 7. Figur 4.2 viser at pH i rekesalatene går ned gjennom holdbarhetstiden, med noen variasjoner i hver produksjon. Den største nedgangen er i produksjon 3 hvor pH var ca. 4,7 i uke 0 og gikk ned til 4,13 i prøven tidlig i produksjonen og 4,22 i prøven sent i produksjonen ved uke 7. pH i produksjon 1 hadde kun en liten nedgang gjennom holdbarhetstiden og lå i området pH 4,84-4,7 i hele perioden. pH ble også målt i to salater fra tidligere produksjoner med dårlig sensorisk kvalitet. En tilsvarende rekesalat som analysert her (frosset ned 8 uker etter produksjon) hadde pH 4,76, mens skagenrøre (frosset ned 9 uker etter produksjon) hadde pH 4,22.



Figur 4.2. pH-måling av rekesalat tidlig og sent i produksjonen, fra tre produksjoner. pH ble målt i uke 0, uke 3, uke 3 med en uke åpent emballasje og uke 7. I produksjon 3 ble pH også målt i uke 6.

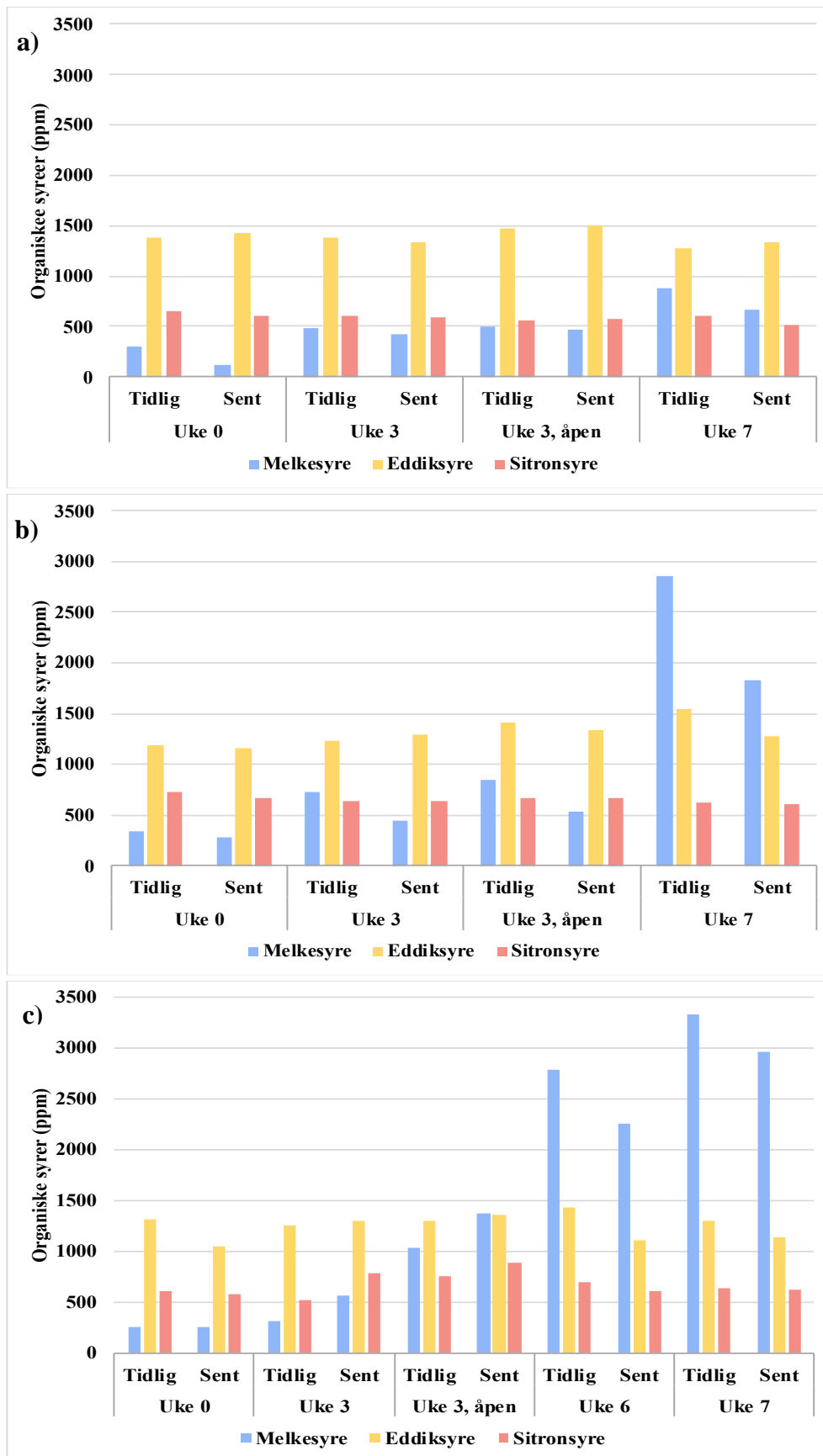
pH ble også målt i ingrediensene etter tining av prøvene og rådata vises i Vedlegg 6. Figur 4.3 viser at ingrediensene hadde liten variasjon i pH i de tre produksjonene, og lå i området pH 4-6 med unntak av fargestoffet. Fargestoffet var prøven som hadde høyest pH ($9,90 \pm 0,38$), mens majones hadde lavest pH med en verdi på $4,04 \pm 0,07$.



Figur 4.3. Gjennomsnittsverdier fra pH-måling av ingredienser brukt i rekesalat fra tre produksjoner med oppgitt standardavvik.

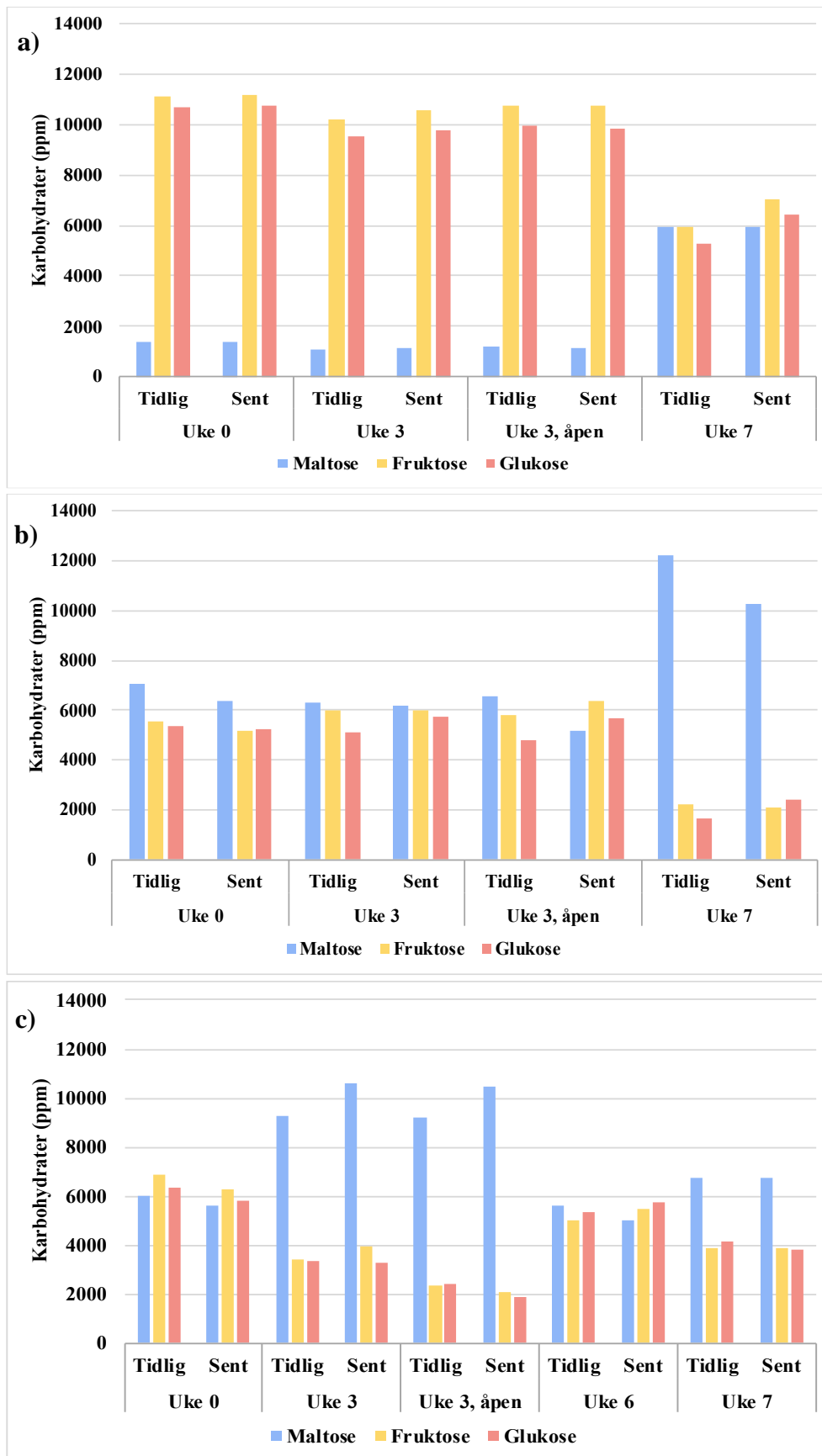
4.2.2 Omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer

Karbohydrater og organiske syrer ble analysert ved bruk av HPLC og rådata vises i Vedlegg 5. Figur 4.4 viser at innholdet av eddiksyre (ca. 1200-1500 ppm) og sitronsyre (ca. 700 ppm) var relativt likt gjennom hele holdbarhetstiden i alle produksjonene. Konsentrasjonen av melkesyre har økt i alle produksjonene fra uke 0 og frem til utgangen av holdbarhetstiden. Spesielt i produksjon 2 økte melkesyreproduksjonen fra ca. 300 ppm til ca. 2700 ppm tidlig og ca. 1700 ppm sent. I produksjon 3 økte det fra ca. 260 ppm til ca. 3400 ppm tidlig og ca. 3000 ppm sent. I produksjon 1 var det kun en liten økning fra ca. 200 ppm i uke 0 til ca. 800 ppm i uke 7.



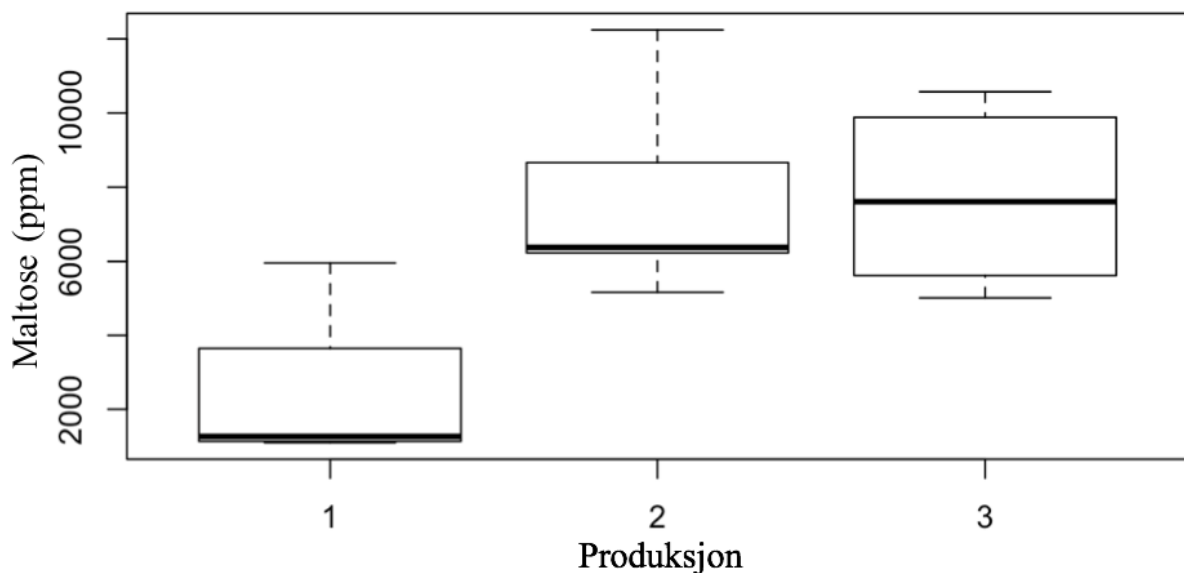
Figur 4.4. Konsentrasjon av melkesyre, eddiksyre og sitronsyre i rekesalat fra a) produksjon 1, b) produksjon 2 og c) produksjon 3. Verdiene er fra tidlig og sent i produksjonen i uke 0, uke 3, uke 3 med en uke åpen emballasje og uke 7. Produksjon 3 inkluderer også resultater fra uke 6.

Figur 4.5 viser at innholdet og omsetningen av karbohydrater varierer en del i produksjonene, hvor det hovedsakelig er produksjon 1 som skiller seg ut fra produksjon 2 og 3. Nivået av glukose og fruktose i produksjon 1 lå på mellom 10000-11000 ppm og maltose lå på ca. 1100-1400 ppm i uke 0 og 3. I produksjon 2 var konsentrasjonen av maltose, fruktose og glukose tilnærmet likt (5000-6000 ppm) frem til uke 3, hvor deretter fruktose og glukose gikk ned til ca. 2000 ppm og maltose økte ved uke 7 til ca. 10000-12000 i sen og tidlig produksjon. I produksjon 3 var nivået for alle tre karbohydratene likt ved uke 0 (ca. 6000 ppm), mens allerede i uke 3 har maltose økt relativt mye (ca. 9500 ppm) og glukose/maltose har blitt halvert. Ved slutten av holdbarhetstiden har fruktose og glukose økt litt, mens maltose igjen har blitt redusert.



Figur 4.5. Konsentrasjon av maltose, fruktose og glukose i rekesalat fra a) produksjon 1, b) produksjon 2 og c) produksjon 3. Verdiene er fra tidlig og sent i produksjonen i uke 0, uke 3, uke 3 med en uke åpen emballasje og uke 7. Produksjon 3 inkluderer også resultater fra uke 6.

R studio ble benyttet for å se om det var en signifikant forskjell mellom de tre produksjonene med hensyn til produksjon av organiske syrer og omsetning av karbohydrater. Av organiske syrer og karbohydrater var det kun en signifikant forskjell i maltose ($p < 0,00025$) i de ulike produksjonene (Figur 4.6). Det var en signifikant forskjell mellom produksjon 1 og 2 ($p < 0,001$), produksjon 1 og 3 ($p < 0,0006$), men ikke mellom produksjon 2 og 3 ($p < 0,998$).



Figur 4.6. Box plot som viser innholdet av maltose i produksjon 1, 2 og 3. Figuren viser at det er en signifikant forskjell i maltose mellom produksjon 1 og 2 ($p < 0,001$), produksjon 1 og 3 ($p < 0,0006$), men ikke produksjon 2 og 3 ($p < 0,998$).

Organiske syrer og karbohydrater ble også målt i to prøver fra tidligere produksjoner med dårlig sensorisk skår. Rådata vises i Vedlegg 5 og Tabell 4.2 viser at prøvene med dårlig sensorisk skår hadde et høyt innhold av maltose på henholdsvis 8063 og 10002 ppm, hvor skagenrøre også hadde det høyeste innholdet av fruktose (1101 ppm). Videre hadde rekesalat en høyere konsentrasjon av sitronsyre på 2386 ppm, sammenlignet med skagenrøre (894 ppm). Skagenrøren hadde derimot en høyere konsentrasjon av melkesyre (2914 ppm) og eddiksyre (1046 ppm) enn rekesalaten.

Tabell 4.2. Konsentrasjon (ppm) av maltose, fruktose, glukose, sitronsyre, melkesyre og eddiksyre i rekesalat og skagenrøre fra en tidligere produksjon med dårlig sensorisk skår. Rekesalat ble frosset ned 8 uker etter produksjon og skagenrøre ble frosset ned 9 uker etter produksjon. Salatene er ikke MA-pakket.

	Konsentrasjon (ppm)					
	Maltose	Fruktose	Glukose	Sitronsyre	Melkesyre	Eddiksyre
Rekesalat	8063	601	533	2386	1066	850
Skagenrøre	10002	1101	698	894	2914	1046

Videre ble ingrediensene (reke, rekepynt, hvitbete, majones og eple), med unntak av fargestoffet analysert for innhold av karbohydrater og organiske syrer. Rådata vises i Vedlegg 5 og Tabell 4.3 viser resultatet, hvor konsentrasjonen er regnet om basert på prosentvis tilsetning i rekesalat.

Innad i de tre produksjonene var det konsentrasjonen av karbohydrater i hvitbeter og majones som hadde størst variasjon og også de høyeste konsentrasjonene. Produksjon 1 hadde de høyeste konsentrasjonene av fruktose og glukose i majones med henholdsvis 57745 ppm og 5767 ppm sammenlignet med produksjon 2 og 3. Videre hadde produksjon 3 høyere konsentrasjon av maltose i både hvitbeter (8879 ppm) og majones (8776 ppm) enn produksjon 1 og 2. Konsentrasjonen av organiske syrer var relativt like i de ulike produksjonene. Eddiksyrekonsentrasjonen i majones lå i området 715-1092 ppm i de tre produksjonene.

Tabell 4.3. Konsentrasjon av maltose, fruktose, glukose, sitronsyre, melkesyre og eddiksyre i reker, rekepynt, hvitbete, majones og eple. Verdiene er regnet om basert på et prosentvis innhold i rekesalatene.

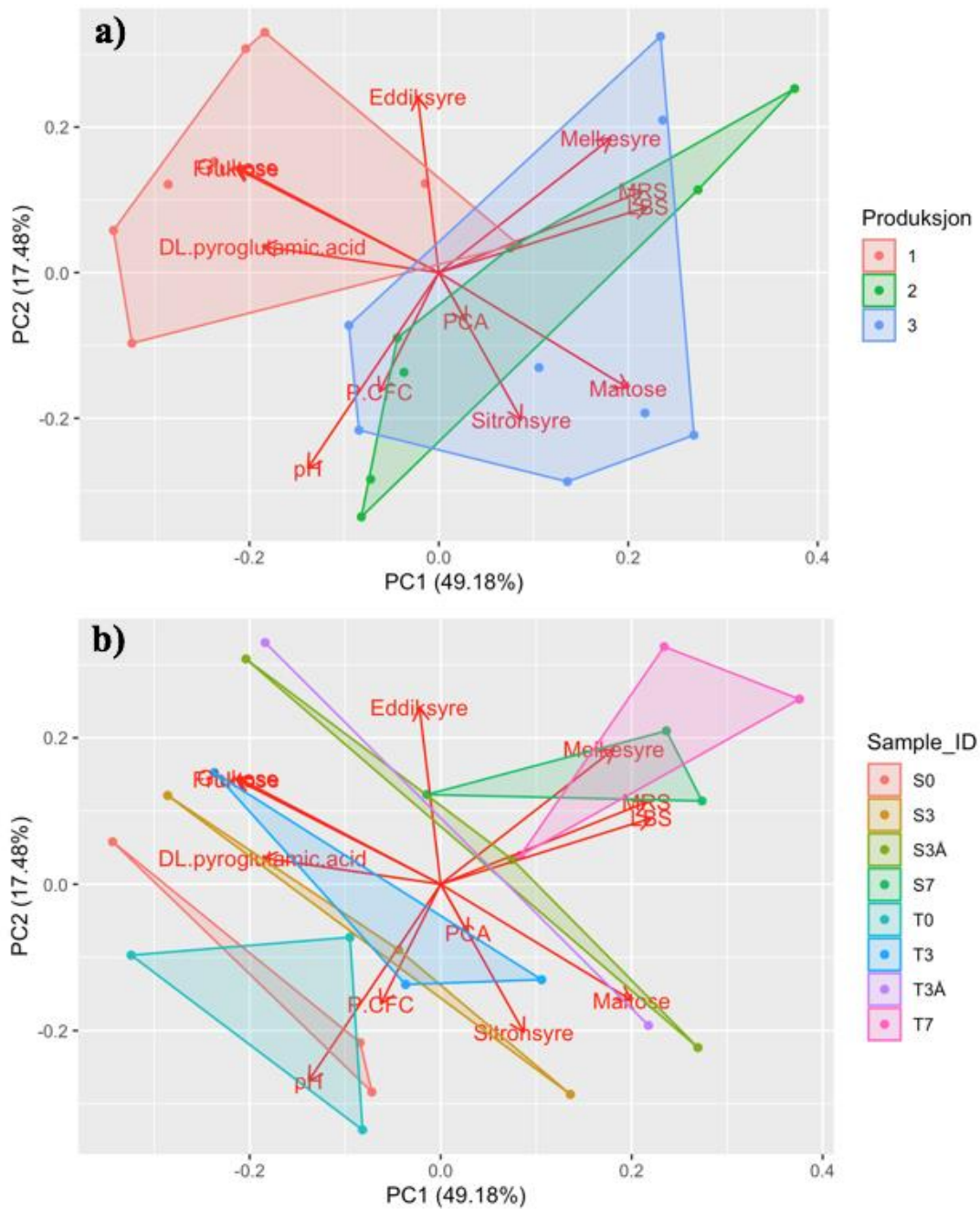
Komponent (ppm)	Ingrediens	Produksjon 1	Produksjon 2	Produksjon 3
Maltose	Reker	n.d.*	n.d.*	n.d.*
	Rekepynt	n.d.*	n.d.*	n.d.*
	Hvitbete	3137	4099	8879
	Majones	3910	2187	8776
	Eple	18	12	15
Fruktose	Reker	n.d.*	2,0	5,4
	Rekepynt	4,6	3,5	n.d.*
	Hvitbete	1619	2271	857
	Majones	5775	3473	1846
	Eple	346	353	353
Glukose	Reker	9,6	5,5	8,6
	Rekepynt	n.d.*	2,3	4,7
	Hvitbete	1663	2330	803
	Majones	5767	3534	1838
	Eple	224	210	146
Sitronsyre	Reker	410	419	391
	Rekepynt	244	190	322
	Hvitbete	51	89	130
	Majones	n.d.*	6,3	1,4
	Eple	6,5	10	8,9
Melkesyre	Reker	65	n.d.*	n.d.*
	Rekepynt	56	n.d.*	n.d.*
	Hvitbete	n.d.*	n.d.*	n.d.*
	Majones	222	152	236
	Eple	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Eddiksyre	Reker	n.d.*	n.d.*	n.d.*
	Rekepynt	7,9	n.d.*	n.d.*
	Hvitbete	534	488	560
	Majones	1009	715	1092
	Eple	n.d.*	n.d.*	n.d.*

*n.d.=not detected/ikke detektert

4.3 «Principal Component Analysis»

For å illustrere forskjellene og korrelasjon mellom de tre produksjonene ble det gjennomført en «Principal Component Analysis» (PCA) basert på data fra mikrobiologiske prøver, HPLC og pH (Figur 4.7). Figur 4.7a viser at produksjon 2 og 3 er mer like enn produksjon 1 som skiller seg litt ut, hovedsakelig med tanke på et høyere innhold glukose og fruktose enn i produksjon 2 og 3 som har en høyere konsentrasjon maltose.

Figur 4.7b viser at det er en variasjon fra hvert uttak i de ulike produksjonene gjennom holdbarhetstiden. Videre viser Figur 4.7a og b at pH og melkesyre har en negativ korrelasjon. Det vil si at prøvene som hadde et høyere innhold av melkesyre, hadde en lavere pH-verdi. Det samme ser en i Figur 4.7a hvor produksjon 1 som hadde et høyt innhold fruktose og glukose, hadde et lavere innhold maltose. Produksjon 3 hadde høyere innhold av maltose, og hadde lavere nivåer av fruktose og glukose. Videre ser en at konsentrasjonen av melkesyre og vekst på MRS- og LBS-agar korrelerer sterkt med hverandre i uke 7-prøvene, samt i de ulike produksjonene (Figur 4.7b).



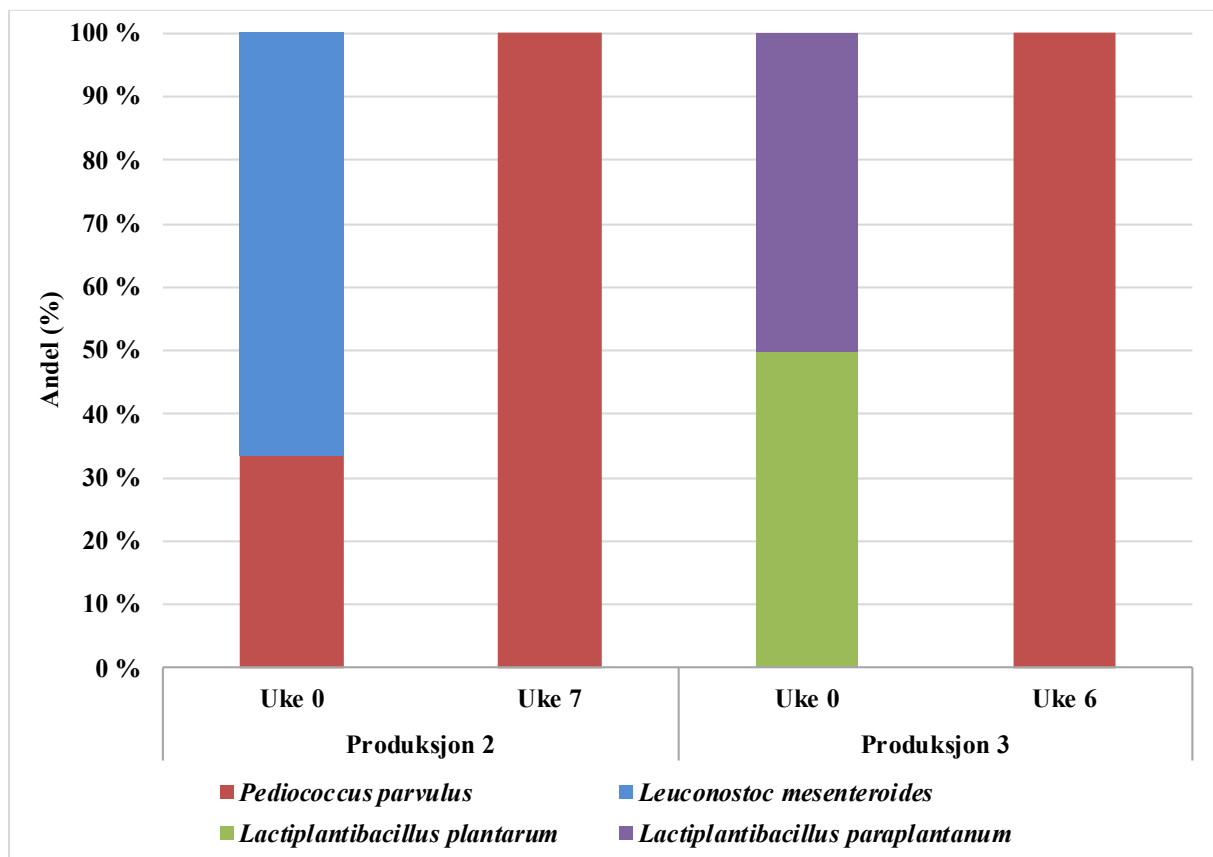
Figur 4.7. «Principal component analysis» (PCA) som viser **a)** korrelasjon av organiske syrer, karbohydrater, pH og mikrobiologiske prøver (PCA-, MRS-, LBS- og P.CFC-agar) i produksjonene og **b)** fra rekesalat gjennom holdbarhetstiden.

4.4 Genotypisk identifisering av bakterieisolater

Tolv bakterieisolater fra produksjon 2 og 3 ble isolert og identifisert ved Sanger sekvensering. Det ble valgt ut tre kolonier fra uke 0-prøvene i produksjon 2 og 3, samt tre kolonier fra uke 7-prøvene fra produksjon 2 og uke 6-prøvene fra produksjon 3. Taksonomisk identitet ble bestemt ved å sette sammen «forward» og «reverse» sekvensene i Bioedit og gjøre et BLAST-søk. Begge sekvensene fra et bakterieisolat fra uke 0 (produksjon 3) var for dårlig og ble

dermed ikke brukt. Den ene sekvensen fra uke 7 (produksjon 2) var også for dårlig og BLAST-søk ble i dette tilfellet gjort på kun den ene sekvensen. Resultatene er presentert i Figur 4.8. Contig-sekvensene benyttet ved BLAST-søk vises i Vedlegg 7.

Alle bakterieisolatene fra både produksjon 2 og 3 ble identifisert som MSB, hvor totalt tre ulike slekter ble identifisert: *Pediococcus*, *Leuconostoc* og *Lactiplantibacillus*. Alle isolatene fra uke 6/7 prøvene i begge produksjonene ble identifisert som *Pediococcus parvulus*. Derimot ble to av isolatene fra uke 0 (produksjon 2) identifisert som *Leuconostoc mesenteroides*, hvor den siste ble identifisert som *Ped. parvulus*. Fra produksjon 3 ble ett isolat fra uke 0 identifisert som *Lactiplantibacillus plantarum* (tidligere *Lactobacillus plantarum*) og den andre *Lactiplantibacillus paraplantarum* (tidligere *Lactobacillus paraplantarum*).



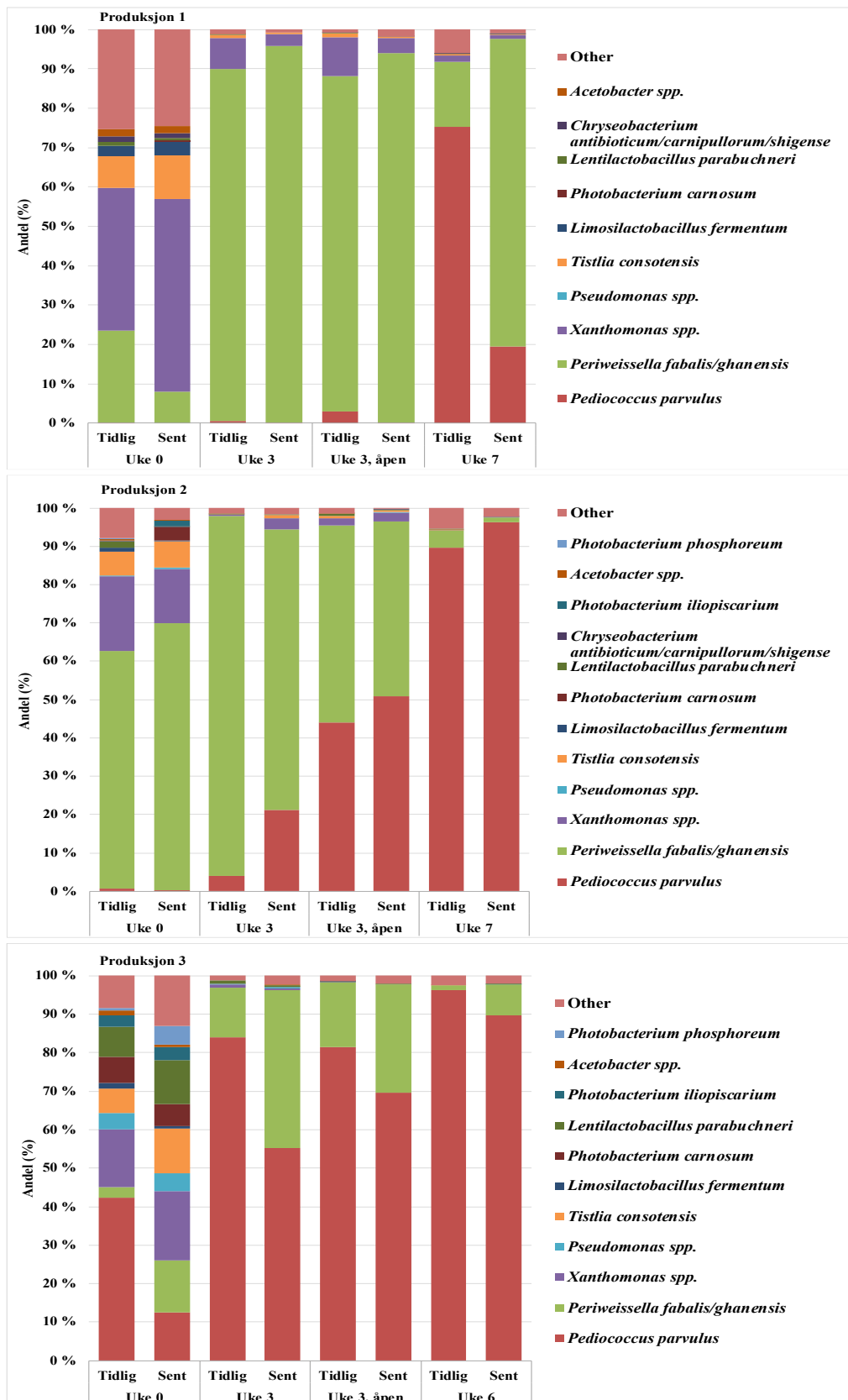
Figur 4.8. Relativ fordeling av isolerte bakterieisolater identifisert ved Sanger sekvensering. Totalt 11 isolater ble identifisert og diagrammet viser en oversikt over fordelingen av de isolerte og identifiserte isolatene fra uke 0 og 6/7, fra produksjon 2 og 3. Tre isolater ble valgt fra uke 0 og 6/7 i hver produksjon. Ett isolat fra uke 0 i produksjon 3 ble ikke identifisert grunnet dårlig kvalitet på sekvensene.

4.5 Mikrobiota-analyse ved Illumina sekvensering

For å undersøke hvilke mikroorganismer som var tilstede i rekesalat og ingrediensene fra tre produksjoner ble det utført Illumina sekvensering. Prøver av rekesalatene ble tatt ut og fryst ned dagen etter produksjon (uke 0), etter tre uker, etter tre uker med en uke åpnet emballasje og ved best før dato (uke 7). I produksjon 3 ble det tatt ut prøver til analysering i uke 6 grunnet praktiske årsaker. For å se om det var forskjeller i produksjonen ble en prøve tidlig og en prøve sent i produksjonen analysert. Der taksonomi ikke med sikkerhet kunne bestemmes til én art, er de mulige artene oppgitt med «/». Sekvensene som er identifisert som samme art er slått sammen. I noen tilfeller var det vanskelig å bestemme art og slekt, de mulige slektene er dermed oppgitt med «G», hvor «G» står for genus (slekt).

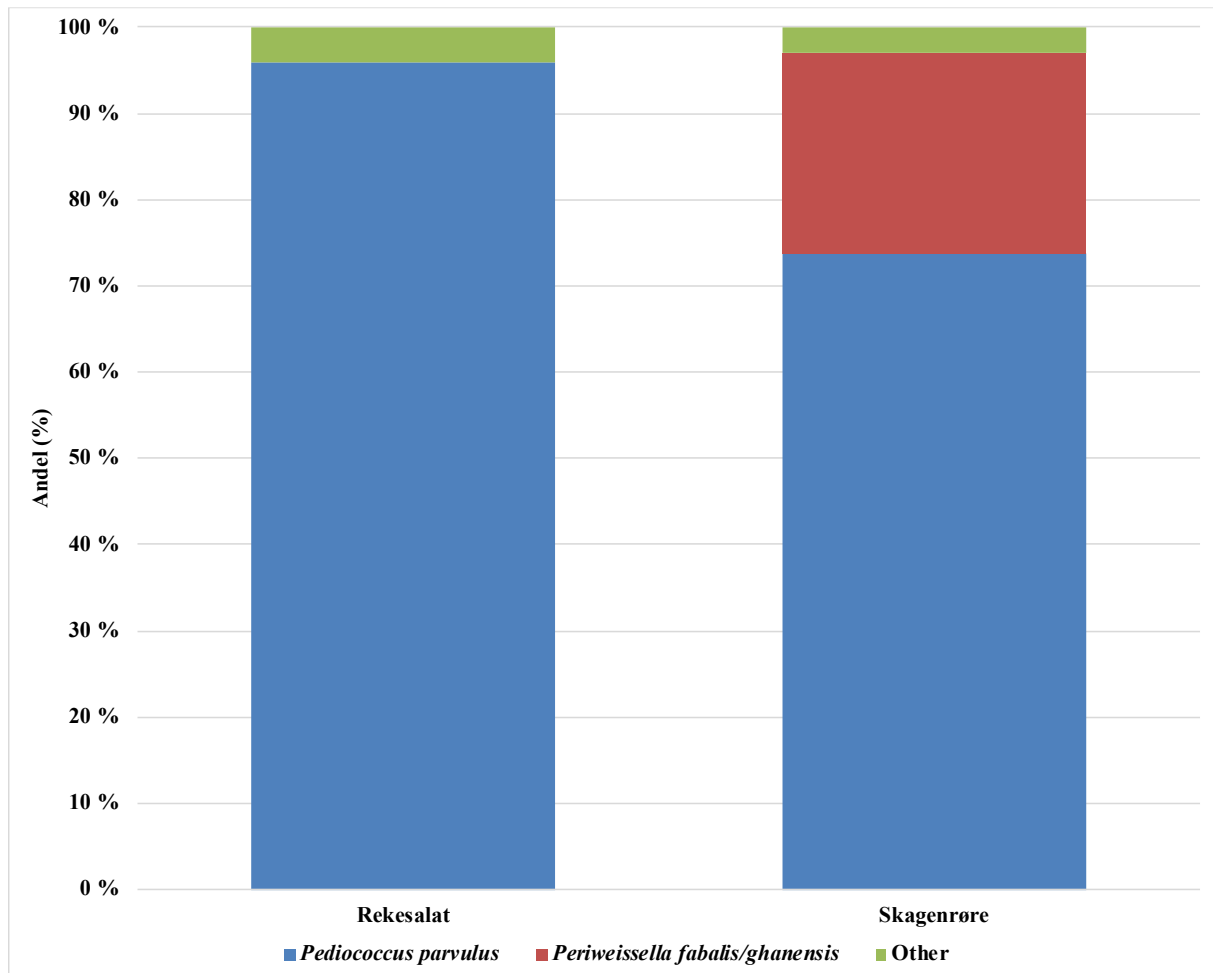
4.5.1 Identifisering av bakterier

Den relative fordelingen av bakterier gjennom holdbarhetstiden til rekesalat på 7 uker fra tre produksjoner er vist i Figur 4.9. I uke 0, produksjon 1, dominerte *Xanthomonas* spp. med henholdsvis 37% tilstedeværelse tidlig og 49% tilstedeværelse i sen produksjon. Det ble også funnet en betydelig andel *Per. fabalis/ghanensis* med henholdsvis 23% og 9% tilstedeværelse i tidlig og sen produksjon. Uke 0 for produksjon 2 viser de samme slektene/artene, men *Per. fabalis/ghanensis* dominerte med henholdsvis 62% og 70% tilstedeværelse i tidlig og sen produksjon og *Xanthomonas* spp. var tilstede med henholdsvis 20% i tidlig og 15% i sen produksjon. *Tistlia consotensis* var tilstede i forholdsvis lave andeler i både produksjon 1 og 2 med henholdsvis 8-10% og 7%. I produksjon 3 dominerte derimot *Ped. parvulus* med henholdsvis 42% og 12% i tidlig og sen produksjon, og i tillegg var det tilstedeværelse av de samme artene som ble observert i produksjon 1 og 2. Som en ser dominerte *Per. fabalis/ghanensis* det bakterielle samfunnet fullstendig i produksjon 1 fra og med uke 3, og også delvis i produksjon 2 fra uke 3 men her økte også andelen av *Ped. parvulus*, spesielt i uke 3 åpen. I produksjon 3 dominerer *Ped. parvulus* så og si gjennom hele holdbarhetstiden. Ved siste holdbarhetsdato (uke 7) dominerer også *Ped. parvulus* i produksjon 2 (>90%), samt i rekesalat tidlig fra produksjon 1 (ca. 75%). Både *Ped. parvulus* og *Per. fabalis/ghanensis* utgjorde i ulik grad store deler av den mikrobielle floraen fra alle produksjonene gjennom holdbarhetstiden.



Figur 4.9. Relativ fordeling av bakterier i rekesalat fra produksjon 1, 2 og 3 ved Illumina sekvensering. Prøver til sekvensering er tatt ut i uke 0, uke 3, uke 3 med en uke åpen emballasje og uke 7 (best før-dato), tidlig og sent i produksjonen. I produksjon 3 ble siste prøve tatt ut i uke 6.

To prøver fra tidligere produksjoner med dårlig sensorisk skår ble analysert for å sammenligne den mikrobielle sammensetningen med rekesalatene analysert. Resultatet er presentert i Figur 4.10 og viser at begge salatene hadde en dominans av *Ped. parvulus*. Rekesalat hadde >95% av denne arten og skagenrøre hadde ca. 75% tilstedeværelse. Resterende bakterier i produksjon 2 ble identifisert som *Per. fabalis/ghanensis*.



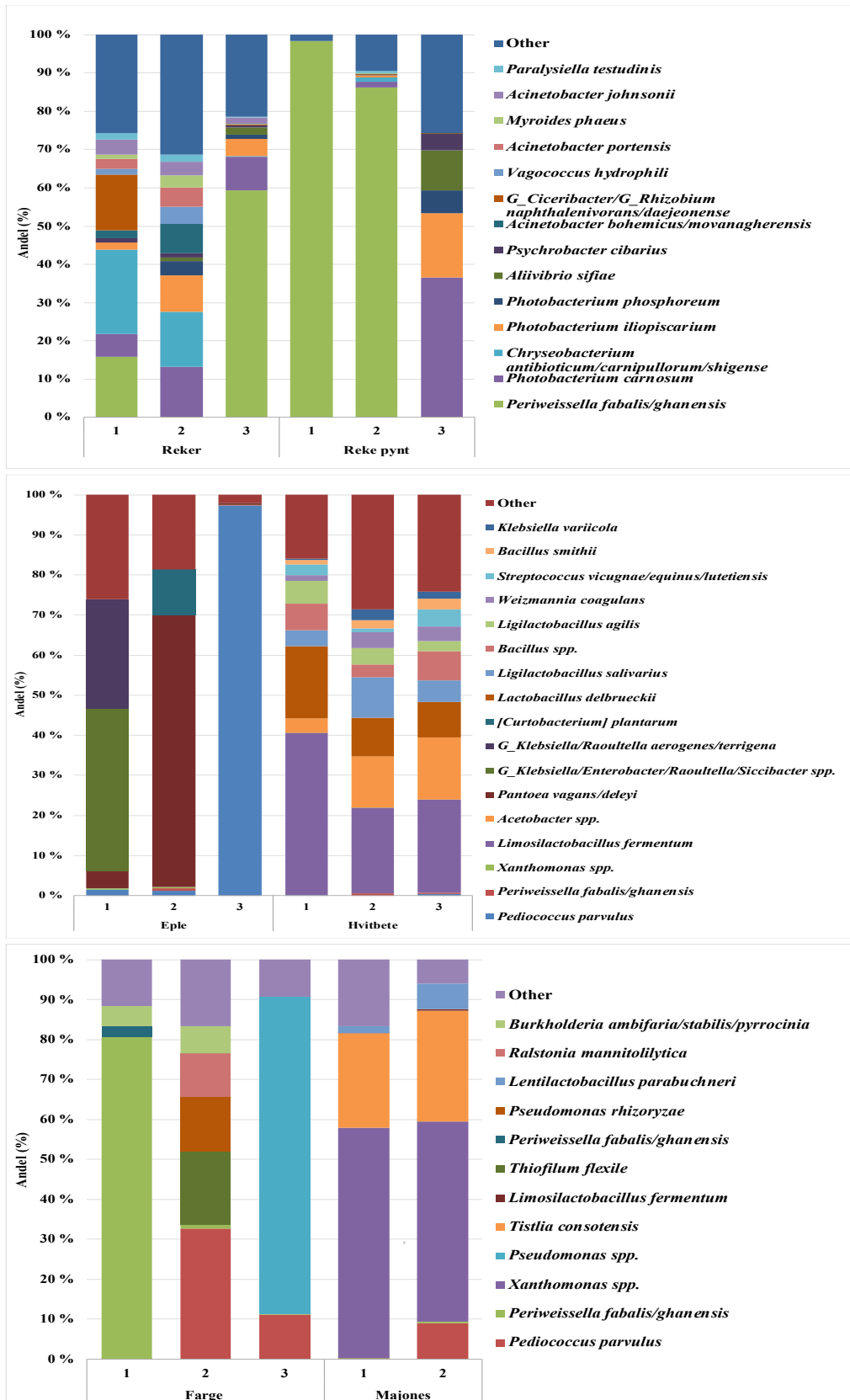
Figur 4.10. Relativ fordeling av bakterier i to tidligere produserte salater med dårlig sensorisk kvalitet. Prøve 1 er rekesalat (frosset ned 8 uker etter produksjon) og prøve 2 er skagenrøre (frosset ned 9 uker etter produksjon). Salatene er ikke pakket i modifisert atmosfære.

Hver ingrediens som ble benyttet under produksjon av rekesalat ble analysert, med unntak av majones fra produksjon 3 på grunn av ødelagt beholder ved tining av prøven. Det bakterielle innholdet i hver ingrediens er vist i Figur 4.11. Innholdet av bakterier i reker fra hver produksjon varierte en del. En ser at *Per. fabalis/ghanensis* dominerer samfunnet i reker fra produksjon 3 (ca. 60%), mens kun en liten del foreligger i produksjon 1 (~15%). Reke fra alle de tre produksjonene inneholdte også *Photobacterium carnosum* med henholdsvis 5%, 12% og 8% i produksjon 1, 2 og 3. I tillegg ble også andre *Photobacterium* arter identifisert i

reker fra de 3 produksjonene, som *Photobacterium iliopiscarium* og *Photobacterium phosphoreum*. I rekepynt var det *Per. fabalis/ghanensis* som dominerte i produksjon 1 (>95%) og 2 (>85%), mens i produksjon 3 var det større variasjon. I produksjon 3 utgjorde *Pho. carnosum*, *Pho. Iliopiscarium*, *Aliivibrio sifae* og *Pho. phosforeum* store deler av floraen.

Epler hadde en dominans av slektene *Klebsiella/Enterobacter/Raoultella/Siccibacter* spp. og slektene *Klebsiella/Raoultella aerogenes/terrigena* i produksjon 1, mens produksjon 2 stort sett bestod av *Pantoea vagans/deleyi* (ca. 70%). I produksjon 3 bestod >95% av floraen av *Ped. parvulus*. Hvitbeter fra alle produksjonene viste >20% tilstedeværelse av *Limosilactobacillus fermentum*, ca. 3-16% andel av *Acetobacter* spp. og ca. 9-16% *Lactobacillus delbrueckii*.

I fargestoffet var det *Per. fabalis/ghanensis* som dominerte i produksjon 1 med ca. 81%, mens *Pseudomonas* spp. dominerte i produksjon 3. I produksjon 2 var det større variasjon, men *Ped. parvulus* var tilstede i produksjon 2 med høyest andel (ca. 32%). Denne arten var også tilstede i produksjon 3. I majones fra produksjon 1 og 2 dominerte *Xanthomonas* spp. og *T. consotensis*. Produksjon 2 hadde også ca. 10% tilstedeværelse av *Ped. parvulus*.



Figur 4.11. Relativ fordeling av bakterier i reker, rekepynt, epler, hvitbeter, farge og majones fra produksjon 1, 2 og 3 ved Illumina sekvensering. Prøvene til sekvensering ble fryst ned dagen etter produksjon av rekesalat.

5 Diskusjon

5.1 Mikrobiell sammensetning

5.1.1 Mikrobielle forskjeller i produksjonene

Sekvenseringsdata fra de tre produksjonene viser en forskjell i den mikrobielle sammensetningen. Resultatet fra Illumina sekvensering fra produksjon 1 og 2 viste at det i uke 0 er en dominans av *Per. fabalis/ghanensis* og *Xanthomonas* spp., men med ulike andeler, og hvor det i produksjon 2 er en dominans av *Ped. parvulus* mot slutten av holdbarhetstiden. Det er også tilstedeværelse av denne bakterien i produksjon 1 (uke 7), men i mindre grad enn ved produksjon 2. Det er derimot en betydelig forskjell mellom rekesalat som ble produsert tidlig versus sent i produksjon 1 (ca. 6 timer mellom rekesalat produsert tidlig og sent) da salaten tidlig i produksjonen domineres av *Ped. parvulus*, mens det er *Per. fabalis/ghanensis* som dominerer i rekesalaten produsert sent. Om det er en reell forskjell eller om det skyldes at ulike komponenter fra rekesalatene ble tatt ut til DNA-ekstraksjon er derimot usikkert. Råvarer som epler, farge og majones så ut til å bidra med *Ped. parvulus*, mens *Per. fabalis/ghanensis* ble identifisert i reker, rekepynt og fargestoffet i produksjon 1. Dermed er det mulig at en fikk med flere epler og mer majones fra tidlig produksjon og flere reker fra sen produksjon. I produksjon 3 dominerer *Ped. parvulus* allerede fra uke 3, med en større tilstedeværelse allerede i uke 0 sammenlignet med produksjon 1 og 2. Dette gjenspeiles også i resultatene fra Sanger sekvenseringen. Det var kun tre isolater fra produksjon 2 og 3 (uke 7) som ble undersøkt, men alle ble identifisert som *Ped. parvulus*, noe som tyder på dominans. Det er derimot ikke isolert kolonier fra produksjon 1, men det er høy tilstedeværelse av *Ped. parvulus* ved slutten av holdbarhetstiden fra Illumina sekvensering. Dermed er det meget mulig at resultatet ville vært tilsvarende likt i produksjon 1.

Når en sammenligner den mikrobielle sammensetningen i ferdig rekesalat i de tre produksjonene med sammensetningen i ingrediensene, kan en se en tydelig trend. Eplene hadde tilstedeværelse av *Ped. parvulus* i alle produksjonene, men spesielt produksjon 3 hadde >95% tilstedeværelse. Den samme bakterien ble også funnet i fargestoffet i produksjon 2 og 3, samt i majones fra produksjon 2. Både fargestoffet og eplene kom fra samme batch. Forskjellen i hvilke bakterier som dominerer kan dermed skyldes lagringsbetingelsene mellom de ulike produksjonene, som har ført til at *Ped. parvulus* spesielt har vokst mye i eplene benyttet i produksjon 3. Råvarene ble lagret i henhold til leverandørens anbefaling. Det vil si at epleterningene ble lagret tørt, mens fargestoffet ble lagret på kjølerom mellom

produksjonene. Det er dermed usikkert hva som er årsaken til forskjellene i råvarene mellom produksjonene, da alle ingrediensene har blitt lagret likt mellom hver produksjon. Det er verdt å nevne at andelen epler som tilsettes rekesalatene er lav, men det kan være nok til at bakterien vokser i det ferdige produktet. Når det kommer til majones, har en ikke resultater fra produksjon 3. Det er grunn til å tro at det vil være tilsvarende likt eller en større tilstedeværelse enn i produksjon 2 grunnet mer vekst i ferdig produkt i denne produksjonen. Produksjon 1 har som nevnt noe mindre tilstedeværelse av *Ped. parvulus* mot slutten av holdbarhetstiden (uke 7, sent), og har også lavere tilstedeværelse i nevnte ingredienser sammenlignet med produksjon 2 og 3. Det er verdt å nevne at fargestoffet ikke hadde vekst på LBS- og MRS-agar, mens epler og majones hadde henholdsvis $0,92 \pm 0,80$ og $3,43 \pm 0,35$ log CFU/g på LBS-agar, samt $1,46 \pm 0,45$ og $3,52 \pm 0,10$ log CFU/g på MRS-agar. Det er dermed mulig at det er epler og majones som har bidratt med veksten av *Ped. parvulus* og ikke fargestoffet, selv om det ikke kan utelukkes. Produksjon 1 har en høyere andel *Per. fabalis/ghanensis* i starten av holdbarhetstiden (uke 3). Denne bakterien dominerer i fargestoffet benyttet i produksjonen, noe den ikke gjør i de andre produksjonene. Fargestoffet tilsettes derimot i liten grad og tilfører sannsynligvis en lav andel bakterier, men det kan være nok til at bakterien vokser i ferdig produsert rekesalat. *Periweissella fabalis/ghanensis* er også i stor grad tilstede i rekene som ble benyttet. Dette gjelder både i reker fra produksjon 1 og 3, samt i rekepynt fra produksjon 1 og 2, men det er kun i produksjon 1 og 2 at bakterien dominerte i ferdig produkt. En kan derfor anta at *Per. fabalis/ghanensis* i rekesalat kommer fra rekene. Rekepynt har et relativt høyt standardavvik når det kommer til vekst på MRS-agar. Dette skyldes at det kun var rekepynt fra produksjon 2 som hadde vekst på MRS-agar. Hva som er årsaken til dette er usikkert, men det er kanskje ikke ideelt å sammenligne råvarer som ikke er fra samme leverandør, samtidig som det er flere uker mellom hver produksjon.

En ulempe ved mikrobiotaanalyse ved bruk av Illumina sekvensering er at en analyserer både levende og døde DNA-celler. En må derfor se på endringen av bakteriesammensetningen gjennom holdbarhetstiden. Videre er rekesalat og majones vanskelige produkter å analysere grunnet det høye fettinnholdet. DNA-ekstraksjon av produkter med høyt fettinnhold kan by på problemer fordi tilstedeværelse kan forstyrre ekstraksjon ved å hemme bindingen av DNA til DNA-polymerase. Dette kan resultere i lavt DNA-utbytte eller dårlig kvalitet på DNAet. Derfor er det viktig å utføre tilstrekkelig fettfjerning under DNA-ekstraksjon for å oppnå høykvalitets DNA. Dermed ble det utført ekstra rensessteg, noe som kan føre til at en mister litt DNA. Det er også verdt å nevne at noen typer bakterier fester seg bedre til fettmolekyler

enn vannmolekyler, noe som kan føre til at en mister DNA fra enkelte bakterier med fettene i prøvene (Piskata et al., 2019).

For å isolere bakterier for Sanger sekvensering ble MRS-buljong benyttet for å dyrke bakteriene. Dette mediet ble benyttet fordi det grunnet vekst på LBS- og MRS-agar var forventet at MSB var kvalitetsforringere i rekesalatene. Det er derimot verdt å nevne at en studie utført av De Bruyne et al. (2008) viste at *Per. ghanensis* ikke hadde vekst i MRS-buljong, noe som kan være en årsak til at denne bakterien ikke ble isolert ved Sanger sekvensering. Dette kan ikke sies med sikkerhet, men det er en svakhet i denne studien at det bare ble benyttet MRS-buljong, og det er ingen garanti for at alle MSB vil vokse i valgt medium. Det kunne istedenfor blitt valgt mer generelle medier som BHI («Brain heart infusion») eller NM («nutrient broth»), men som nevnt var det forventet vekst av MSB, som er bakgrunnen til at MRS-buljong ble benyttet. Videre skal det sies at det kun ble valgt ut noen få tilfeldige kolonier til Sanger sekvensering. En ville dermed fått et større bilde av hvilke bakterier som er tilstede dersom flere isolater ble sekvensert. En annen svakhet er at koloniene for isolering av DNA ble plukket rett fra agar etter inkubering, uten å forsikre seg om at kulturen var ren. Dette ble gjort for å spare tid og det ble ikke sjekket om det var renkultur før dyrking i buljong. For å få en renkultur vil en vanligvis først plukket en koloni og dyrket denne i buljong før utstrykning på MRS-agar. Dette gjøres inntil en har fått ensartede kolonier. Videre kan koloniene mikroskoperes og videre sjekkes om det er MSB ved negativ katalasetest og Gram-positiv reaksjon ved Gramfarging før sekvensering. Dermed er det mulig at en kunne fått med kolonimateriale fra flere bakterier, hvor en av dem vokser bedre i MRS-buljong og dermed undertrykker veksten av eventuelt andre bakterier. En uren kultur vil potensielt gi et feil bilde av hvilke bakterier som er tilstede, men en ville også fått «dårlige/ubrukelige» 16S rRNA sekvenser og derved ingen identifisering av isolatet. Dette kan forklare hvorfor begge sekvensene fra ett isolat i uke 0, produksjon 3, var for dårlig og ikke kunne identifiseres. På en annen side stemmer resultatene fra Sanger sekvensering godt overens med resultatene fra Illumina sekvensering når det kommer til hvilken bakterie som dominerer mot slutten av holdbarhetstiden.

Det er verdt å nevne at det ikke ble analysert for mugg eller gjær i denne studien. Spesielt gjær har vist seg å være en kvalitetsforringende organisme i majones og majonesbaserte produkter i tidligere studier (Smittle, 1977; Syromyatnikov et al., 2018). Dermed hadde det også vært interessant å vite om tilstedeværelse av gjær bidrar til kvalitetsproblemet i

rekesalatene. For å identifisere tilstedeværelse av gjær er det flere metoder som kan benyttes. Først og fremst kan en undersøke tilstedeværelse ved å benytte gjærmedier som Yeast Malt agar og Rose Bengal agar for å dyrke mugg- og gjærsopp. Videre kan mikrobiota og eventuelle enkeltisolater identifiseres ved å amplifisere «Internal Transcribed Spacer» (ITS) regionen til gjær som ligger mellom 18S og 28S rRNA genet. Forskjellig fra bakterier, har gjær ITS-regioner (ITS1- og ITS2-subregion) som kan amplifiseres ved bruk av ITS-primere. ITS-regionen benyttes til fordel for 18S rRNA-genet når det kommer til identifisering. Dette skyldes at ITS-regionen gir bedre taksonomisk identifisering grunnet manglende variasjon i 18S rRNA genet mellom nært beslektede slekter og arter (Anderson & Cairney, 2004).

5.1.2 Modifisert atmosfære

Som nevnt innledningsvis vil pakking med CO₂-atmosfære være med på å hemme veksten av enkelte bakterier. Spesielt Gram-negative bakterier hemmes, mens Gram-positive bakterier er mer motstandsdyktige (Church, 1994). Dette vises ved tilstedeværelse av blant annet de Gram-negative bakteriene *Xanthomonas* spp. og *Pseudomonas* spp. ved uke 0, hvor veksten av disse har gått ned gjennom holdbarhetstiden i alle rekesalatene. Dette skyldes at rekesalatene pakkes med CO₂, som i stor grad hemmer veksten av Gram-negative bakterier ved å forlenge lag-fasen og minimerer dermed vekst i log-fasen (Reddy et al., 1991). CO₂ i vann fører til dannelse av karbonsyre, som fører til at pH går ned. Syren virker som en svak organisk syre hvor andelen udisosiert syre virker hemmende (Daniels et al., 1985). Dette vises også når det kommer til *Photobacterium* spp. som er en vanlig Gram-negativ kvalitetsforringende bakterie i sjømat. Denne var tilstede i rekene og i mindre grad rekesalatene ved uke 0. Det er derimot vanskelig å si om sekvenseringen viser til døde eller levende bakterier, da rekene oppbevares i saltlake (2,5-3,5% salt) og konserveringsmidler (sitronsyre, natriumbenzoat og kaliumsorbat) før tilsetning i rekesalatene. Dette kan bidra til å hemme veksten av disse bakteriene. Basert på resultatet fra sekvenseringen er det ikke overraskende at rekesalatene har en dominans av MSB gjennom holdbarhetstiden. Dette skyldes som nevnt at Gram-positive bakterier generelt sett er mer motstandsdyktige enn Gram-negative bakterier da de har en tykkere cellevegg. Celleveggen hos de Gram-positive bakteriene består av 90% peptidoglykan, bygget i flere lag, mens celleveggen hos de Gram-negative består av ca. 10% peptidoglykan. Det er peptidoglykanet i celleveggen som bidrar til osmotisk styrke og generell fysisk styrke mot ytre påvirkning av bakterier. Derfor vil en pH <5 redusere Gram-negative bakterier i stor grad, og siden pH i ferdig produkt ligger på rundt

4,8 vil veksten av disse bakteriene antageligvis hemmes uavhengig av atmosfæren (Gram et al., 2002).

En studie av Ameer et al. (2022) viste at modifisert atmosfærepakking med 70% CO₂/30% N₂ og 100% CO₂ var mer effektive når det kom til å bevare kvalitetsparametere (a_w, pH, mikrobiologisk inhibering etc.) og økte holdbarheten i fermentert pølse. Rekesalatene ble pakket med 30% CO₂, så det kunne dermed vært interessant å se hvilken effekt en høyere CO₂-konsentrasjon har når det kommer til inhibering av MSB. Det er derimot et annet produkt og effekten av CO₂ avhenger blant annet av type produkt og bakterier tilstede, noe som vil si at det ikke nødvendigvis vil gi samme effekt i rekesalat. Ulike MSB har også ulik toleranse når det kommer til CO₂. Noen MSB vokser ved høyere konsentrasjoner, mens andre arter dominerer ved lavere konsentrasjoner. Ved pakking i modifisert atmosfære vil også floraen endre seg gradvis under holdbarhetstiden da gassatmosfæren endres. Dermed vil også den mikrobielle sammensetningen endres (Sivertsvik et al., 2002). Med tanke på at det kan se ut til at dominerende MSB varierer, er det dermed ikke sikkert at effekten av CO₂ vil være lik ut fra hvilke bakterier som dominerer i de ulike produksjonene.

Rekesalatene som ble åpnet i uke 3 og inkubert en uke ekstra uten CO₂-atmosfære, viste en liten forskjell når det kommer til produksjon av melkesyre og nedgang i pH. Det ble for eksempel observert en liten økning i produksjon av melkesyre og eddiksyre, samt en økning på ca. 2 log CFU/g på MRS-agar i produksjon 1, men det ser ikke ut til at dette har påvirket rekesalaten i stor grad. Det er mulig at økningen hadde skjedd uavhengig av om emballasjen ble brutt eller ikke, da rekesalatene uansett ble lagret en uke lengre enn rekesalatene som ble analysert i uke 3. Det er derimot mulig at resultatet hadde vært annerledes dersom produktet hadde blitt lagret uten modifisert atmosfære fra start, da det ser ut som at CO₂ har inhibert veksten av de Gram-negative bakteriene allerede frem til uke 3. Dermed tyder det på at ytterligere vekst av disse bakteriene ikke forekommer, selv om emballasjen brytes. Derimot burde en analysert prøvene med åpnet og uåpnet emballasje samtidig for å kunne si dette med sikkerhet. Når det er sagt ble noen av rekesalatene åpnet etter 3 uker for å simulere hvordan produktet håndteres hos forbruker. Basert på kvalitetsparameterne som pH, celletall og organiske syrer ser det ikke ut til at kvaliteten har gått betraktelig ned.

Når det kommer til de to prøvene fra tidligere produksjoner med dårlig sensorisk kvalitet, hadde både rekesalat og skagenrøre en dominans av *Ped. parvulus*. Ved produksjon av

skagenrøre brukes derimot ikke de samme råstoffene, foruten majones, reker og fargestoff som brukes i begge. Det er dermed mulig at *Ped. parvulus* kommer fra en av de nevnte ingrediensene, eventuelt at den har blitt tilført fra for eksempel en biofilm i produksjonsanlegget. En biofilm kan produseres i produksjonsanlegget i næringsmiddelindustrien gjennom en kombinasjon av fuktighet, næringsstoffer og bakterier. Noen av de vanligste bakterieslektene som produserer biofilm inkluderer *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* og *Pseudomonas aeruginosa*, men MSB har også vist å ha biofilmproduksjon (Carrascosa et al., 2021). De nevnte bakteriene, foruten *Pseu. aeruginosa* og noen MSB, har derimot ikke blitt identifisert i noen av salatene eller ingrediensene. Videre er de to salatene (rekesalat og skagenrøre) fra tidlige produksjoner ikke pakket med modifisert atmosfære. Dette er interessant da salatene har lik bakterieflora som rekesalatene som er pakket med modifisert atmosfære ved holdbarhetens utgang. Det er dermed mulig at pakking med CO₂ kanskje ikke har så stor effekt i disse produktene når det kommer til hemming av Gram-positive bakterier, da MSB uansett vil dominere i MAP og ikke-MAP salater (Qian et al., 2013). På en annen side har en ingen oversikt over celledetallet eller utviklingen av bakterier i de to salatene fra tidligere produksjoner. En vet dermed ikke om veksten er høyere enn i rekesalatene som ble analysert i denne oppgaven. Videre skal det sies at rekesalaten som er MA-pakket har reker som pynt på toppen. Dette er hovedgrunnen til at disse blir pakket med CO₂ i motsetning til rekesalaten uten MAP som ikke har pynt på toppen. Årsaken er at reker er lett bedervelige råvarer som domineres av psykrotrofe, aerobe, Gram-negative bakterier som for eksempel *Photobacterium* og *Pseudomonas* (Adams & Moss, 2008). Pynten vil antakelig forringes raskere med oksygen tilstede.

5.2 Vekst og metabolisme

5.2.1 pH

Som forventet var det i slutten av holdbarhetstiden en nedgang i pH i rekesalatene fra alle produksjonene. Det var størst nedgang i pH i rekesalatene fra uke 0 til uke 7 i produksjon 3, men produksjon 2 hadde også en betydelig nedgang. Nedgangen i pH kan sees i sammenheng med at begge produksjonene har økt vekst av homofermentative og heterofermentative MSB, som produserer melkesyre og eventuelt eddiksyre ved fermentering av karbohydrater (Adams & Moss, 2008). Melkesyre er et naturlig konserveringsmiddel som dannes gjennom fermentering av karbohydrater. Prosessen fører til at maten blir surere, men dette varierer avhengig av matens bufferkapasitet. Lav pH fremmer veksten av MSB og hemmer veksten av

andre mikroorganismer. En studie av Waite et al. (2009) viste at *Pediococcus* spp. forårsaket sur smak og senket pH i majones-basert dressing. Den sure smaken i et produkt grunnet nedgang i pH er i enkelte produkter ønsket og det anses dermed ikke som et kvalitetsproblem. I rekesalat er derimot en for sur smak ikke ønsket, slik at lav pH og høyere innhold av melkesyre og eventuelt eddiksyre indikerer at matvaren er forringet. Melkesyre og eddiksyre er svake syrer og er delvis dissosiert i vann. Det er dermed pH-verdien og syrens pK_a-verdi som påvirker om syren er dissosiert eller ikke. Ved lav pH, det vil si ved pH < pK_a-verdien, vil svake syrer foreligge i udisosiert form, og det inhiberer vekst av kvalitetsforringende bakterier, mugg og gjær ved å forstyrre deres cellulære prosesser. Melkesyre har en pK_a-verdi på ca. 3,86, mens eddiksyre har en pK_a på 4,75. Det vil si at pH må være lavere enn dette for at mesteparten av syren skal foreligge i udisosiert form (Adams & Moss, 2008; Dorres, 2020).

5.2.2 Karbohydrater og organiske syrer

Rekesalatene fra produksjon 1 har høyere konsentrasjon av glukose og fruktose ved uke 0, men det ser ikke ut til at bakteriene som er tilstede har benyttet dette som substrat før mot slutten av holdbarhetstiden hvor glukose og fruktose har blitt brutt ned. Det samme gjelder produksjon 2, som også har relativt lik konsentrasjon av både maltose, fruktose og glukose i uke 3. Produksjon 3 skiller seg dermed ut ved at glukose og fruktose har blitt brutt ned allerede i uke 3, noe som kan skyldes et høyere celletall, samt at *Ped. parvulus* dominerte bakteriefloraen i denne produksjonen allerede fra uke 3. Produksjon 1 og 2 har dominans av *Per. fabalis/ghanensis* frem til uke 7. Dermed kan det se ut til at denne bakterien ikke omsetter glukose og fruktose i like stor grad som *Ped. parvulus* i dette produktet. Dette ser en ved at det ikke er en nedgang i fruktose og glukose før i uke 7. En ser videre på resultatet fra Illumina sekvenseringen at tilstedeværelsen av *Ped. parvulus* først i uke 7 har økt tilsvarende som i produksjon 3.

Konsentrasjonen av maltose har økt gjennom holdbarhetstiden i alle produksjonene, noe som kan skyldes at stivelse fra råvarene har blitt spaltet og brutt ned til maltose.

Melkesyrebakterier produserer enzymer, inkludert amylase, som bryter ned stivelse til maltose. Dermed kan årsaken til at maltosekonsentrasjonen har økt skyldes at når MSB vokser, produserer de amylase, som igjen bryter ned stivelse fra råvarene og gir en økning i maltose (Padmavathi et al., 2018). Dette kan være årsaken til at produksjon 2 og 3 har en høyere konsentrasjon maltose samtidig som de har høyere celletall enn produksjon 1. Med

tanke på at MSB som *Ped. parvulus* spalter stivelse til maltose, og benytter maltose som substrat til å vokse og produsere melkesyre. Det ser derimot ut til at det kun er i produksjon 3 at maltose har blitt benyttet som substrat, noe som kan skyldes en tidligere dominans av *Ped. parvulus* sammenlignet med produksjon 1 og 2. Hva som er årsaken til dette er usikkert. En årsak kan være at stivelse har blitt brutt ned tidligere fordi glukose og fruktose har blitt omsatt. Dette har ført til at bakteriene tilstede har benyttet maltose som substrat i likhet med fruktose og glukose. Det kan også skyldes at produksjon 3 hadde dominans av *Ped. parvulus* allerede ved uke 3, noe de andre produksjonene ikke hadde. Dette tyder på at *Ped. parvulus* benytter både fruktose, glukose og maltose som energikilde for å produsere melkesyre. Det kan også nevnes at *Pediococcus* i flere studier har vist å kunne produsere EPS fra glukose, fruktose og maltose. Dette gir et slimete utseende og konsistens i næringsmidler, noe som ved høy produksjon kan føre til et kvalitetsproblem (Smitinont et al., 1999; Lyhs, 2004). Produksjon av EPS ble verken observert eller undersøkt i denne studien, men det er verdt å nevne og eventuelt undersøke videre da *Pediococcus* var den dominerende bakterieslekten ved endt holdbarhetsdato i alle produksjonene.

Som nevnt hadde produksjon 1 mindre produksjon av melkesyre frem til uke 7. Dette kan sees i sammenheng med at celletallet i disse rekesalatene også var relativt stabile frem til uke 7 hvor celletallet fra uke 3 til 7, har økt med ca. 2,5 log CFU/g. I de to andre produksjonene har veksten økt tidligere, som derfor kan ha ført til større omsetning av karbohydratene og påfølgende produksjon av melkesyre. Noe som er interessant, er at produksjon 1 hadde en dominans av *Per. fabalis/ghanensis*, som er en heterofermentativ MSB. En studie av Gänzle (2015) har vist at heterofermentative MSB vokser dårlig med glukose som eneste karbonkilde. Dette kan være årsaken til at melkesyre og eddiksyre har blitt produsert i liten grad i produksjon 1 sammenlignet med produksjon 3 som hadde dominans av homofermentative MSB. Dette vises også i produksjon 2, hvor melkesyreproduksjonen også var lav inntil *Ped. parvulus* dominerte i uke 7. Videre vil dominansen av heterofermentative MSB avhenge av tilgjengeligheten av blant annet maltose og alternative elektronakseptorer som fruktose, som det var lite av i denne produksjonen. *Periweissella* spp. benytter ikke fruktose som en alternativ elektronakseptor, noe som vil si at et lavt innhold av maltose og høyt innhold glukose og fruktose ikke fører til produksjon av melkesyre i rekesalat (Gänzle, 2015). Dette kan forklare veksten i produksjon 2 som hadde dominans av *Per. fabalis/ghanensis*, men som igjen hadde et høyere innhold av maltose i kombinasjon med tidligere tilstedeværelse av *Ped. parvulus* fra uke 3. Det er små forskjeller i rekesalatene som

ble produsert tidlig og sent i produksjonen. Det er derfor vanskelig å si om dette er reelle forskjeller eller om det skyldes at ulike komponenter fra salatene i prøvematerialet har blitt tatt ut.

Ved å se på resultatene fra ingrediensene er det en tydelig trend. I produksjon 3 har hvitbeter og majones en høyere konsentrasjon av maltose enn i produksjon 1, noe som kan forklare forskjellen i ferdig salat. En mulig årsak til at hvitbeter har en høyere konsentrasjon maltose i produksjon 2 og 3, kan være at hvitbeter fra produksjon 1 er fra en annen batch enn de to andre produksjonene. Videre har produksjon 1 en høyere konsentrasjon av fruktose og glukose i majones enn produksjon 2 og 3. Dette kan forklare årsaken til at produksjon 1 har høyere konsentrasjon av glukose og fruktose enn produksjon 2 og 3 i ferdig produkt, samt at produksjon 1 har lavere konsentrasjon av maltose enn ferdig produkt fra produksjon 2 og 3. Majones produseres ferskt samme dag som produksjon. Noe variasjon er dermed forventet, men på en annen side er det viktig å unngå store variasjoner for å oppnå samme kvalitet hver gang. Videre ser en at konsentrasjonen av eddiksyre er relativt stabil gjennom holdbarhetstiden i alle produksjonene. Dette skyldes sannsynligvis at eddiksyre er tilsatt som konserveringsmiddel i ingredienser som majones og hvitbeter. Innholdet i ferdig produkt er dermed som forventet og skyldes i liten grad produksjon fra heterofermentative MSB.

De to prøvene med dårlig sensorisk kvalitet fra tidligere produksjoner har i likhet med rekesalatene fra produksjon 2 og 3 en høyere konsentrasjon av maltose enn fruktose og glukose. I disse produktene vet en derimot ikke hva konsentrasjonen var i utgangspunktet. Dermed er det vanskelig å si noe om i hvor stor grad karbohydratene har blitt omsatt i disse salatene. Derimot kan det, basert på resultatet fra sekvenseringen og bakteriene som er tilstede, tyde på at både fruktose, glukose og maltose har blitt omsatt. Videre har skagenrøren en høyere konsentrasjon av melkesyre enn produksjon 1. Det er samtidig en reduksjon i pH fra 4,55-4,75 ved produksjon til pH 4,45 etter 9 uker. Det er usikkert hvordan utviklingen gjennom holdbarheten til disse produktene har vært med tanke på at en kun har resultater fra 8 og 9 uker etter produksjon. Derimot ser en at også disse produktene har en dominans av *Ped. parvulus* etter endt holdbarhetstid. Dette understøtter at det er denne bakterien som fører til dårlig sensorisk kvalitet i produktene grunnet produksjon av melkesyre og dermed nedgang i pH. Derimot har den «dårlige» rekesalaten en tilsvarende lik pH og melkesyrekonsentrasjon som rekesalaten fra produksjon 1 som ikke har hatt dårlig sensorisk kvalitet. Det er også verdt å legge til at skagenrøre ikke har tilsvarende ingrediensliste som rekesalat, men med tanke på

at denne salaten har dominans av samme type bakterie som i rekesalat, er det grunn til å tro at denne er tilført fra de samme råvarene.

5.2.3 Temperatur og holdbarhet

Riktig lagringstemperatur er viktig når det kommer til å hemme vekst av mikroorganismer. En studie utført av Kalschne et al. (2015) har vist at veksten til MSB signifikant påvirkes av lagringstemperatur, hvor lagring ved 4°C viste mindre vekst enn ved 8°C.

Kjøleskapttemperaturen for husholdninger er ofte høyere enn hva som er ideelt for oppbevaring av mat. En studie utført av Brown et al. (2014) har sett at gjennomsnittlig kjøleskapttemperatur i husholdninger er på 7°C, hvor en reduksjon av temperaturen til 4°C kan forlenge holdbarhetstiden betraktelig. Økt holdbarhetstid vil gi større mulighet for bruk før produktet forringes. Det er viktig å nevne at en lavere temperatur fører til økt energiforbruk, men på en annen side er det mulig at reduksjonen i matsvinn mulig veier opp for dette. Dette demonstrerer hvor viktig riktig kjøleskapttemperatur er for å redusere vekst av mikroorganismer i mat. I dette forsøket ble rekesalatene lagret ved 6°C gjennom holdbarhetstiden, men i realiteten vil en temperatur mellom 0-4°C være bedre egnet for å hemme vekst. Bakgrunnen for at salatene ble lagret ved 6°C var at det er denne temperaturen som er deklart på pakningen. Næringsmiddelprodusenten benytter derfor denne temperaturen som en intern kvalitetssjekk for å være sikker på at produktet holder god kvalitet ved denne temperaturen. Lagring ved ulike temperaturer ble derimot ikke undersøkt i denne studien, så det er usikkert hvor stor effekt lagring ved 6°C hadde på resultatet. Når det er sagt, vet en at MAP er mer effektivt ved lavere temperaturer. Det er også avhengig av bakteriefloraen i produktet, da noen slekter og arter kan vokse ved kjøleskapttemperatur, mens andre ikke gjør det.

Det vil ofte kunne ta noen uker fra produktet er produsert til det kommer ut i butikken. Store deler av produktets holdbarhetstid vil dermed potensielt være over, og forbruker har kortere tid på å spise produktet før det kastes. Selv om MSB ikke fører til et folkehelseproblem, kan vekst av bakterier forårsake økonomiske tap for industrien. Å øke et produkts holdbarhet vil på sikt kunne føre til redusert matsvinn, noe som er viktig i et bærekraftperspektiv, men vil også ha økonomiske fordeler. Dette skyldes at mange forbrukere kaster maten ved siste holdbarhetsdag, selv om produktet kanskje ikke er dårlig.

6 Oppsummering og videre arbeid

I denne oppgaven ble norskprodusert rekesalat som er pakket i modifisert atmosfære og ingrediensene fra tre ulike produksjoner, analysert og sammenlignet gjennom holdbarhetstiden på 7 uker. Rekesalatene ble produsert i perioden november 2022 til januar 2023 og ble analysert dagen etter produksjon (uke 0), uke 3, uke 3 med én uke åpnet emballasje og ved «Best før dato» (uke 7). Rekesalatene og ingrediensene ble analysert for celletall (totaltall, MSB og *Pseudomonas*), karbohydrater og organiske syrer (HPLC), pH, samt identifisering av isolat ved Sanger sekvensering og mikrobielle samfunn ved Illumina sekvensering. Funnene i denne oppgaven har vist at det er en forskjell i det bakterielle samfunnet i de ulike produksjonene. Illumina sekvensering viste at produksjon 1 og 2 hadde dominans av *Per. fabalis/ghanensis* og *Xanthomonas* spp. ved uke 0. Produksjon 3 hadde tilstedeværelse av de samme bakteriene, men en dominans av *Ped. parvulus* i tillegg til et høyere celletall fra start. Videre hadde alle produksjonene en dominans av *Ped. parvulus* ved slutten av holdbarhetstiden (uke 7), noe som videre gjenspeiles i resultatet fra Sanger sekvensering. Funnene viser en tydelig trend når det kommer til omsetning av karbohydrater, produksjon av melkesyre og det bakterielle samfunnet i rekesalatene. Resultatene tyder på at et høyere celletall ved starten av holdbarhetsperioden og tilstedeværelse av *Ped. parvulus* fører til mer produksjon av melkesyre, noe som førte til en nedgang fra pH 4,75 i uke 0 til pH 4,13-4,22 i uke 7 i rekesalat fra produksjon 3. Videre ser det ut til at substratet tilgjengelig i kombinasjon med hvilke bakterier som dominerer tidlig i holdbarhetstiden har mest å si for kvaliteten utover holdbarhetstiden. Årsaken er at rekesalaten med høyere innhold av maltose og tilstedeværelse av *Ped. parvulus* hadde høyere konsentrasjon av melkesyre og dermed lavere pH enn rekesalaten fra produksjon 1 som hadde et høyere innhold glukose og fruktose. Et produkt med mye melkesyre og lavere pH kan oppleves mer syrlig og vil føre til dårlig sensorisk kvalitet. Hva hver forbruker anser som tilfredsstillende kvalitet er derimot subjektivt, men det vil sannsynligvis lønne seg å unngå vekst av denne bakterien for å opprettholde god sensorisk kvalitet, noe som på sikt vil kunne øke holdbarheten og potensielt redusere matsvinn.

Basert på resultatene i denne studien er det flere aspekter som det hadde vært interessant å se nærmere på. Først og fremst vil en kunne gått videre med ingrediensene som hadde tilstedeværelse av *Ped. parvulus*. Dette gjelder spesielt epler, majones og fargestoffet, da selv en lav tilstedeværelse av *Ped. parvulus* i ingrediensene potensielt vil kunne føre til vekst i

ferdig salat. Det vil også være interessant å se om disse bakteriene lever eller om det er DNA-celler fra døde bakterieceller som ikke fører til vekst i produktet. Ut fra disse resultatene vil en kunne se på hvilke tiltak som eventuelt kan settes i gang for å unngå at bakterien vil vokse i det ferdige produktet. Det ville også vært interessant å undersøke ingrediensene som benyttes for å produsere majones. Siden det høye celletallet og tilstedeværelse av bakterier ikke var forventet basert på tidligere analyser utført av næringsmiddelprodusenten. Siden tilgjengelige karbohydrater antakeligvis har noe å si på kvaliteten i ferdig produkt, vil det også kunne vært mulig å kartlegge årsaken til variasjon i råstoffene fra hver produksjon. Siden råvarer trolig vil ha forskjeller basert på sesong, sort og modningsgrad, kunne det vært en fordel å finne ut hvordan disse forskjellene kan unngås.

Vekst av mugg og gjær gjennom holdbarhetstiden ble ikke undersøkt i denne oppgaven. Det hadde dermed vært interessant å se på utviklingen av spesielt gjær, da gjær tidligere har blitt identifisert som en forringende organisme i majones (Smittle, 1977; Syromyatnikov et al., 2018). Det hadde også vært interessant å undersøke hvilken effekt ulike lagringstemperaturer vil ha på produktene. For eksempel undersøke om det er forskjell på vekst av bakterier og hvilke bakterier som dominerer gjennom holdbarhetstiden ved lagring ved 2, 4 og 6°C. Videre hadde det vært interessant å undersøke miljøet i produksjonslokalene med tanke på biofilm. Selv om en ikke kan slå fast at vekst av MSB skyldes biofilm eller tilstedeværelse i råvarene, vet en at biofilm er et potensielt problem i næringsmiddelindustrien.

Avslutningsvis vil det vært svært interessant å se nærmere på om det lønner seg å pakke salatene med 30% CO₂ eller ikke, og eventuelt undersøke effekten ved å øke CO₂-konsentrasjonen til for eksempel 70-100% CO₂. Selv om CO₂ ikke hemmer MSB i stor grad, vil det hemme Gram-negative kvalitetsforringende bakterier. Derimot vil tilstedeværelse av eddiksyre og andre konserveringsmidler kunne hemme disse. Det er dermed kanskje ikke lønnsomt å pakke rekesalat med modifisert atmosfære, med tanke på at MSB uansett vokser.

7 Referansliste

- Adams, M.R. and Moss, M.O. (2008) *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Altschul, S.F. *et al.* (1990) 'Basic local alignment search tool', *Journal of Molecular Biology*, 215(3), s. 403–410. Tilgjengelig fra:
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Ameer, A., Seleshe, S. and Kang, S.N. (2022) 'Effect of Modified Atmosphere Packaging Varying in CO₂ and N₂ Composition on Quality Characteristics of Dry Fermented Sausage during Refrigeration Storage', *Food Science of Animal Resources*, 42(4), s. 639–654. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e27>.
- Anderson, I.C. and Cairney, J.W.G. (2004) 'Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques', *Environmental Microbiology*, 6(8), s. 769–779. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x>.
- Bapat, V.A. *et al.* (2010) 'Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene', *Biotechnology Advances*, 28(1), s. 94–107. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.10.002>.
- Bernardeau, M., Guguen, M. and Vernoux, J.P. (2006) 'Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments', *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), s. 487–513. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>.
- Betts, G. (2006) 'Other spoilage bacteria', in *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing, s. 668–693. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1533/9781845691417.5.668>.
- Brown, T. *et al.* (2014) 'Reducing domestic food waste by lowering home refrigerator temperatures', *International Journal of Refrigeration*, 40, s. 246–253. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2013.11.021>.
- De Bruyne, K. *et al.* (2008) 'Weissella ghanensis sp. nov., isolated from a Ghanaian cocoa fermentation', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12), s. 2721–2725. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65853-0>.
- De Bruyne, K. *et al.* (2010) 'Weissella fabaria sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), s. 1999–2005. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019323-0>.

- Budsberg, K.J., Wimpee, C.F. and Braddock, J.F. (2003) 'Isolation and Identification of *Photobacterium phosphoreum* from an Unexpected Niche: Migrating Salmon', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), s. 6938–6942. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6938-6942.2003>.
- Callahan, B.J. *et al.* (2016) 'DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data', *Nature Methods*, 13(7), s. 581–583. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Carrascosa, C. *et al.* (2021) 'Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), p. 2014. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>.
- Church, N. (1994) 'Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies', *Trends in Food Science & Technology*, 5(11), s. 345–352. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90211-9).
- Crossley, B.M. *et al.* (2020) 'Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), s. 767–775. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>.
- Dalgaard, P. (1995) 'Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish', *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), s. 319–333. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00137-U](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00137-U).
- Daniels, J.A., Krishnamurthi, R. and Rizvi, S.S.H. (1985) 'A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality', *Journal of Food Protection*, 48(6), s. 532–537. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.6.532>.
- Devlieghere, F., Debevere, J. and van Impe, J. (1998) 'Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms', *International Journal of Food Microbiology*, 43(1–2), s. 105–113. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00101-9).
- van Dijk, E.L. *et al.* (2014) 'Ten years of next-generation sequencing technology', *Trends in Genetics*, 30(9), s. 418–426. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>.
- Dixon, N.M. and Kell, D.B. (1989) 'The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms', *Journal of Applied Bacteriology*, 67(2), s. 109–136.
- Dorres, S. (2020) 'Organic Acids', in P.M. Davidson, T.M. Taylor, and J.R.D. David (eds) *Antimicrobials in Food*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, s. 93–127. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1201/9780429058196>.

- Fadrosh, D.W. *et al.* (2014) ‘An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform’, *Microbiome*, 2(1), s. 6.
Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>.
- Fanelli, F. *et al.* (2023) ‘Probiotic Potential and Safety Assessment of Type Strains of *Weissella* and *Periweissella* Species’, *Microbiology Spectrum*. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03047-22>.
- Farber, J.M. (1991) ‘Microbiological Aspects of Modified-Atmosphere Packaging Technology - A Review’, *Journal of Food Protection*, 54(1), s. 58–70. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.1.58>.
- Figge, M.J. *et al.* (2014) ‘*Photobacterium piscicola* spp. nov., isolated from marine fish and spoiled packed cod’, *Systematic and Applied Microbiology*, 37(5), s. 329–335.
Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.05.003>.
- FN (2023) *Ansvarlig forbruk og produksjon*. Tilgjengelig fra: <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal/ansvarlig-forbruk-og-produksjon> (Hentet: 28 Mars 2023).
- Gänzle, M.G. (2015) ‘Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage’, *Current Opinion in Food Science*, 2, s. 106–117.
Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>.
- Garibyan, L. and Avashia, N. (2013) ‘Polymerase chain reaction.’, *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), s. 1–4. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- Giraffa, G., Chanishvili, N. and Widyastuti, Y. (2010) ‘Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology’, *Research in Microbiology*, 161(6), s. 480–487. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>.
- Gram, L. *et al.* (2002) ‘Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria’, *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), s. 79–97. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7).
- Gram, L. and Dalgaard, P. (2002) ‘Fish spoilage bacteria – problems and solutions’, *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), s. 262–266. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9).
- Grønnevik, H., Falstad, M. and Narvhus, J.A. (2011) ‘Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage’, *International Dairy Journal*, 21(9), s. 601–606. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2011.01.001>.
- Gupta, N. (2019) ‘DNA extraction and polymerase chain reaction’, *Journal of Cytology*, 36(2), p. 116. Tilgjengelig fra: https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18.

- Harshitha, R. and Arunraj, D.R. (2021) 'Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification', *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), s. 800–812. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>.
- Hilgarth, M. *et al.* (2018) '*Photobacterium carnosum* spp. nov., isolated from spoiled modified atmosphere packaged poultry meat', *Systematic and Applied Microbiology*, 41(1), s. 44–50. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.11.002>.
- Jany, J.L. and Barbier, G. (2008) 'Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese', *Food Microbiology*, 25(7), s. 839–848. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/J.FM.2008.06.003>.
- Kadri, K. (2020) 'Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications', in *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>.
- Kalschne, D.L. *et al.* (2015) 'Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in "sliced vacuum-packed cooked ham"', *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), s. 173–181. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130019>.
- Lerfall, J., Bjørge Thomassen, G.M. and Jakobsen, A.N. (2018) 'Quality of fresh saithe (*Pollachius virens*) in modified atmosphere packages as affected by the gas composition', *Food Packaging and Shelf Life*, 18, s. 147–156. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.006>.
- Liao, C.H. (2006) '*Pseudomonas* and related genera', in C. de W. Blackburn (ed.) *Food Spoilage Microorganisms*. 1st ed. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, s. 507–530.
- Lorenzo, J.M. *et al.* (2018) 'Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability', in *Innovative Technologies for Food Preservation*. Elsevier, s. 53–107. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>.
- Lyhs, U. (2004) '*Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc gasicomitatum* strains dominated the lactic acid bacterium population associated with strong slime formation in an acetic-acid herring preserve', *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), s. 207–218. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00303-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00303-9).
- Majid, I. *et al.* (2018) 'Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective', *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), s. 454–462. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/J.JSSAS.2016.11.003>.
- Mathew, D.C. *et al.* (2015) 'A Rhizosphere-Associated Symbiont, *Photobacterium* spp. Strain MELD1, and Its Targeted Synergistic Activity for Phytoprotection against Mercury',

- PLOS ONE*, 10(3), s. 121-178. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121178>.
- Mejlholm, O. and Dalgaard, P. (2015) 'Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and psychrotolerant lactic acid bacteria in processed seafood and mayonnaise-based seafood salads', *Food Microbiology*, 46, s. 1–14. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.07.005>.
- Mejlholm, O., Devitt, T.D. and Dalgaard, P. (2012) 'Effect of brine marination on survival and growth of spoilage and pathogenic bacteria during processing and subsequent storage of ready-to-eat shrimp (*Pandalus borealis*)', *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), s. 16–27. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.006>.
- Nguyen, J. (2021) *Sanger sequencing*, Apollo Institute.
- Odeyemi, O.A. *et al.* (2020) 'Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), s. 311–331. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>.
- Olafsdottir, G. *et al.* (2006) 'Influence of storage temperature on microbial spoilage characteristics of haddock fillets (*Melanogrammus aeglefinus*) evaluated by multivariate quality prediction', *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), s. 112–125. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.045>.
- Padmavathi, T. *et al.* (2018) 'Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification', *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), s. 357–362. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005>.
- Parlapani, F.F., Kormas, K.A. and Boziaris, I.S. (2015) 'Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), s. 2386–2394. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6957>.
- Petrosino, J.F. *et al.* (2009) 'Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification', *Clinical Chemistry*, 55(5), s. 856–866. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>.
- Piskata, Z. *et al.* (2019) 'The Quality of DNA Isolated from Processed Food and Feed via Different Extraction Procedures', *Molecules*, 24(6), p. 1188. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.3390/molecules24061188>.

- Porto, M.C.W. *et al.* (2017) ‘Pediococcus spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers’, *Biotechnology Advances*, 35(3), s. 361–374. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2017.03.004>.
- Qian, Y.-F. *et al.* (2013) ‘Impact of the O₂ Concentrations on Bacterial Communities and Quality of Modified Atmosphere Packaged Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*)’, *Journal of Food Science*, 78(12), s. 1878–1884. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12305>.
- Qiao, N. *et al.* (2022) ‘After the storm—Perspectives on the taxonomy of *Lactobacillaceae*’, *JDS Communications*, 3(3), s. 222–227. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>.
- Qu, P. *et al.* (2022) ‘Microporous modified atmosphere packaging to extend shelf life of fresh foods: A review’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(1), s. 51–65. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1811635>.
- Rawat, S. (2015) ‘Food Spoilage: Microorganisms and their prevention’, *Asian Journal of Plant Science & Research*, 5.
- Reddy, N.R. *et al.* (1991) ‘Shelf-life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review’, *Journal of Food safety*, 12(2), s. 87–118.
- Regjeringen (2021) ‘Hovedrapport 2020 - Bransjeavtale om reduksjon av matsvinn’.
- Sevindik, M. and Uysal, I. (2021) ‘Food spoilage and Microorganisms’, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 9(10), s. 1921–1924. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i10.1921-1924.4658>.
- Shendure, J. *et al.* (2017) ‘DNA sequencing at 40: past, present and future’, *Nature*, 550(7676), s. 345–353. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1038/nature24286>.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K. and Rosnes, 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), s. 107–127. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00548.x>.
- Smitinont, T. *et al.* (1999) ‘Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization’, *International Journal of Food Microbiology*, 51(2–3), s. 105–111. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00094-X).

- Smittle, R.B. (1977) 'Microbiology of Mayonnaise and Salad Dressing: A Review', *Journal of Food Protection*, 40(6), s. 415–422. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-40.6.415>.
- Svanevik, C.S. and Lunestad, B.T. (2011) 'Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*)', *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), s. 164–170. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.016>.
- Syromyatnikov, M.Y. *et al.* (2018) 'Study of the Microbiological Composition of Dairy Products and Mayonnaise Using DNA Barcoding and Metabarcoding', *Foods and Raw materials*, 6(1), s. 144–153. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-1-144-153>.
- ThermoFischer Scientific (no date) *PCR Basics*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html> (Heentet: 28 March 2023).
- Todorov, S.D. *et al.* (2023) 'Beneficial features of pediococcus: from starter cultures and inhibitory activities to probiotic benefits', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), p. 4. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03419-w>.
- Urbanczyk, H., Ast, J.C. and Dunlap, P. V. (2011) 'Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*', *FEMS Microbiology Reviews*, 35(2), s. 324–342. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x>.
- Velasco, S.E. *et al.* (2007) 'Influence of the carbohydrate source on β -glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6', *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), s. 325–334. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.023>.
- Waite, J.G., Jones, J.M. and Yousef, A.E. (2009) 'Isolation and identification of spoilage microorganisms using food-based media combined with rDNA sequencing: Ranch dressing as a model food', *Food Microbiology*, 26(3), s. 235–239. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.01.001>.
- von Wright, A. and Axelsson, L. (2011) 'Lactic acid bacteria: An introduction', in A.C.O. Sampo Lahtinen, S. Salminen, & A. von Wright (eds) *Lactic Acid Bacteria*. Boca Raton: CRC Press, s. 1–16.
- Zheng, J. *et al.* (2020) 'A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of

Lactobacillaceae and Leuconostocaceae, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), s. 2782–2858. Tilgjengelig fra:
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.

Vedlegg

Vedlegg 1. Rådata PCA-agar

Tabell 1. Rådata for vekst av bakterier på PCA-agar med utvalgte fortyninger og log-tall.

Produksjon	Prøve	Uke	PCA-agar (CFU/g)							Log (CFU/g)
			-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
1	Hvitbete (HB)		31	3	0					2,48
	Eple (E)		26	4	0					2,51
	Majones (M)		>300	-	2					3,3
	Farge (F)		-	16	-					3,2
	Reker (R)		576	63	8					3,82
	Rekepynt (RP)		-	220	29					4,4
	Rekesalat tidlig	0	>300	53	1					3,5
	Rekesalat sent	0	80	8	1					2,94
	Rekesalat tidlig	3	-	35	3					3,51
	Rekesalat sent	3	-	17	0					3,23
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet	-	4	60*					2,6
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet			15***	1				3
	Rekesalat tidlig	7, best før dato			15	1	0	0		3,1
Rekesalat sent	7, best før dato					62	4		5,7	
2	Hvitbete (HB)		46	7						2,76
	Eple (E)		12**	0						2,07
	Majones (M)		>300*	>300*						
	Farge (F)		9	1						1,97
	Reker (R)		>300	28	3					3,46
	Rekepynt (RP)		202	11	1					3,13
	Rekesalat tidlig	0	>300*	27*	6					3,63
	Rekesalat sent	0	196*	10	3					3,3

	Rekesalat tidlig	3	15	>300*	21			4,32	
	Rekesalat sent	3	13	262*	23*			4,36	
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet		>300*	>300*				
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet		>300*	>300*				
	Rekesalat tidlig	7, best før dato			>300*	>300	272*		
	Rekesalat sent	7, best før dato			>300	>300	236*		
3	Hvitbete (HB)		18	1	0			2,14	
	Eple (E)		17	2*				2,23	
	Majones (M)		>300*	>300*					
	Farge (F)		>300	>300				>4,47	
	Reker (R)		99	4	1			2,9	
	Rekepynt (RP)		21	2	0			2,31	
	Rekesalat tidlig	0	>300	7	4			3,73	
	Rekesalat sent	0	>300	103	7			3,93	
	Rekesalat tidlig	3		>300*	>300*	270		6,43	
	Rekesalat sent	3		>300*	64*	208		6,31	
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet		356	64*			4,69	
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet		>300	240			5,38	
	Rekesalat tidlig	6				>300	470	48	7,67
	Rekesalat sent	6				>300	340	14	7,38
	Rekesalat tidlig	7, best før dato					>300	198	8,29
	Rekesalat sent	7, best før dato					>300	64	7,8

*>300 pin point colonies

** 1 mugg

***spreder

Vedlegg 2. Rådata MRS-agar

Tabell 2. Rådata for vekst av bakterier på MRS-agar med utvalgte fortyndninger og log-tall.

Produksjon	Prøve	Uke	MRS-agar (CFU/g)					Log (CFU/g)	
			-1	-2	-3	-4	-5		-6
1	Hvitbete (HB)		0	0	0				<1
	Eple (E)		8**	0	0				1,9
	Majones (M)		316	47	1				3,47
	Farge (F)		0	0	0				<1
	Reker (R)		-	82	7				3,88
	Rekepynt (RP)		>300	>300	>300**				
	Rekesalat tidlig	0	>300	Z300	2				3,3
	Rekesalat sent	0	29	8	1				2,84
	Rekesalat tidlig	3	>300	72	8				3,88
	Rekesalat sent	3	120	9	2				3,13
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet		>300	>300	56			5,74
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet		>300	158	12			5,14
	Rekesalat tidlig	7, best før dato		>300	>300	>300	28		6,44
	Rekesalat sent	7, best før dato		>300	>300	91	12		6,02
	2	Hvitbete (HB)		0	0	0			
Eple (E)			3	0	0				1,47
Majones (M)			294	28**	0				3,45
Farge (F)			0	0					<1
Reker (R)			1	0	0				1
Rekepynt (RP)			>300	>300	83				4,91
Rekesalat tidlig		0	>300	92	9				3,95
Rekesalat sent		0	264	29	4				3,5
Rekesalat tidlig		3	>300	>300	137				5,13
Rekesalat sent		3	>300	>300	252				5,4
Rekesalat tidlig åpnet		3, åpnet		>300	>300	238			6,37
Rekesalat sent åpnet		3, åpnet		>300	>300	216			6,33
Rekesalat tidlig		7, best før dato		>300	>300	>300	748		7,87

	Rekesalat sent	7, best før dato		>300	>300	534		7,72	
	Hvitbete (HB)		0	0				<1	
	Eple (E)		1	1*				1	
	Majones (M)		>300	43				3,63	
	Farge (F)		0	0				<1	
	Reker (R)		127	10	1			3,03	
	Rekepynt (RP)		0	0	0			<1	
3	Rekesalat tidlig	0	>300	169	15			4,2	
	Rekesalat sent	0	>300	>300	26			4,14	
	Rekesalat tidlig	3		>300	>300	356		6,55	
	Rekesalat sent	3		>300	>300	292		6,46	
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet		>300	>300	1852		7,26	
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet		>300	>300	2136		7,32	
	Rekesalat tidlig	6				>300	134	12	8,1
	Rekesalat sent	6				>300	128	11	8,07
	Rekesalat tidlig	7, best før dato				>300	204	22	8,32
	Rekesalat sent	7, best før dato				>300	83	13	8,02

*2 mugg

** >300 pin point colonies

Vedlegg 3. Rådata LBS-agar

Tabell 3. Rådata for vekst av bakterier på LBS-agar med utvalgte fortynninger og log-tall.

Produksjon	Prøve	Uke	LBS-agar (CFU/g)							Log (CFU/g)
			-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
1	Hvitbete (HB)		0	0	0					<1
	Eple (E)		2	0	0					1,3
	Majones (M)		84	5	2					3,04
	Farge (F)		0	0	0					<1
	Reker (R)		2	0	0					1,3
	Rekepynt (RP)		7	0	0					1,84
	Rekesalat tidlig	0	197	24	2					3,32
	Rekesalat sent	0	65	7	3*					3,16
	Rekesalat tidlig	3	232	28	3					3,43
	Rekesalat sent	3	146	25	3					3,36
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet		>300	122	11				5,06
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet		>300	116	4				4,89
	Rekesalat tidlig	7, best før dato		>300	>300	>300	57			6,75
	Rekesalat sent	7, best før dato		>300	>300	168	18			6,24
2	Hvitbete (HB)		0	0						<1
	Eple (E)		3	0						1,47
	Majones (M)		>300	33*						3,51
	Farge (F)		0	0						<1
	Reker (R)		0	0	0					0
	Rekepynt (RP)		6	0	0					1,78
	Rekesalat tidlig	0	>300	113	17					4,15

	Rekesalat sent	0	>300	33	13				3,91
	Rekesalat tidlig	3	>300	>300	42				4,62
	Rekesalat sent	3	>300	>300	46				4,66
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet		>300	>300	204			6,3
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet		>300	>300	292			6,46
	Rekesalat tidlig	7, best før dato			>300	>300	714		7,85
	Rekesalat sent	7, best før dato			>300	>300	604		7,78
	Hvitbete (HB)		0	0					<1
	Eple (E)		0	0					<1
	Majones (M)		>300	54					3,73
	Farge (F)		0	0					<1
	Reker (R)		1	0					
	Rekepynt (RP)		0	0					<1
	Rekesalat tidlig	0	>300	122	25				4,26
	Rekesalat sent	0	>300	>300	38				4,58
	Rekesalat tidlig	3		>300	>300	260			6,41
3	Rekesalat sent	3		>300	>300	314			6,49
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet		>300	>300	2472			7,39
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet		>300	>300	2624			7,41
	Rekesalat tidlig	6				>300	114	16	8,13
	Rekesalat sent	6				>300	140	16	8,17
	Rekesalat tidlig	7, best før dato				>300	262	26	8,41
	Rekesalat sent	7, best før dato				>300	98	15	8,09

*>300 pin point kolonier

Vedlegg 4. Rådata *Pseudomonas* CFC-agar

Tabell 4. Rådata for vekst av bakterier på *Pseudomonas*-CFC agar med utvalgte fortynninger og log-tall.

Produksjon	Prøve	Uke	<i>Pseudomonas</i> CFC-agar (CFU/g)			Log (CFU/g)
			-1	-2	-3	
1	Hvitbete (HB)		0	0	0	<1
	Eple (E)		4*	1*		<1
	Majones (M)		>300	53	0	3,72
	Farge (F)		121	17	0	3,16
	Reker (R)		4	1	0	1,84
	Rekepynt (RP)		>300	>300	58	4,76
	Rekesalat tidlig	0	>300	>300	0	>5,47
	Rekesalat sent	0	>300	9	0	2,95
	Rekesalat tidlig	3	0	0	0	<1
	Rekesalat sent	3	0	0	0	<1
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet	0	0	0	<1
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet	0	0	0	<1
	Rekesalat tidlig	7, best før dato	0	0	0	<1
	Rekesalat sent	7, best før dato	1	0	0	<1
	Hvitbete (HB)			0	0	<1
	Eple (E)			0	0	<1
Majones (M)			0	0	<1	
Farge (F)			0	0	<1	
Reker (R)			0	0	<1	
Rekepynt (RP)			*	2	2,17	

2	Rekesalat tidlig	0	*	2	2,3
	Rekesalat sent	0	*	1	2
	Rekesalat tidlig	3	6	0	1,77
	Rekesalat sent	3	3	0	1,47
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet	0	0	<1
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet	2	0	1,3
	Rekesalat tidlig	7, best før dato	0	0	<1
	Rekesalat sent	7, best før dato	0	0	<1
3	Hvitbete (HB)		0	0	<1
	Eple (E)		0	0	<1
	Majones (M)		*	3	2,39
	Farge (F)		*	*	4,47
	Reke (R)		0	0	<1
	Rekepynt (RP)		6	1	2,04
	Rekesalat tidlig	0	2	1	1,84
	Rekesalat sent	0	5	2	2,17
	Rekesalat tidlig	3	5	0	1,69
	Rekesalat sent	3	12	1	2,04
	Rekesalat tidlig åpnet	3, åpnet	*	7	2,84
	Rekesalat sent åpnet	3, åpnet	0	1	2
	Rekesalat tidlig	6	*	37	2,56
	Rekesalat sent	6	0	0	<1
Rekesalat tidlig	7, best før dato	14	0	2,14	
Rekesalat sent	7, best før dato	0	0	<1	

*spreder

Vedlegg 5. HPLC

Tabell 5. Konsentrasjon (ppm) av maltose, fruktose, glukose, sitronsyre, melkesyre og eddiksyre i rekesalat og ingredienser (reke, reke pynt, hvitbete, majones og eple). Rekesalat er analysert i uke 0, 3, uke 3 med en uke åpnet emballasje og uke 7. Produksjon 3 ble analysert i uke 6 i tillegg. Ingrediensene er regnet om basert på et prosentvis innhold i rekesalatene.

		Konsentrasjon (ppm)							DL-pyroglytamic
Produksjon	Prøve	Uke	Maltose	Fruktose	Sitronsyre	Glukose	Melkesyre	Eddiksyre	acid
1	Hvitbete (HB)		3137,30	1618,68	51,11	1663,36	n.d.	533,66	27,50
	Eple (E)		18,09	346,05	6,50	223,79	n.d.	n.d.	n.d.
	Majones (M)		7519,81	11105,34	n.d.	11089,42	427,38	1939,96	n.d.
	Reker (R)		n.d.	n.d.	409,69	9,61	65,07	n.d.	2,68
	Rekepynt (RP)		n.d.	4,56	243,98	n.d.	55,52	7,93	1,48
	Rekesalat tidlig	0	1373,89	11110,09	652,72	10713,18	294,25	1380,93	38,94
	Rekesalat sent	0	1345,74	11198,68	599,71	10756,11	117,99	1427,67	45,86
	Rekesalat tidlig	3	1098,27	10188,10	605,31	9514,49	480,53	1385,09	38,68
	Rekesalat sent	3	1113,24	10574,02	585,15	9807,15	429,38	1337,73	46,15
	Rekesalat tidlig	3, åpnet	1188,40	10775,03	558,66	9943,64	499,42	1479,41	39,50
	Rekesalat sent	3, åpnet	1155,88	10727,41	577,13	9858,91	471,82	1511,69	41,77
	Rekesalat tidlig	7	5924,80	5945,34	598,11	5279,44	881,36	1279,71	11,72
	Rekesalat sent	7	5956,54	7048,88	514,73	6437,49	673,30	1340,27	31,43
	3	Hvitbete (HB)		4098,73	2271,14	88,68	2330,44	n.d.	487,86
Eple (E)			11,94	353,41	10,03	210,38	n.d.	n.d.	n.d.
Majones (M)			2186,75	3474,41	6,36	3533,78	151,69	715,26	n.d.
Reker (R)			n.d.	2,00	418,55	5,56	n.d.	n.d.	n.d.
Rekepynt (RP)			n.d.	3,50	189,81	2,97	n.d.	n.d.	0,96
Rekesalat tidlig		0	7043,46	5577,70	733,85	5354,83	338,35	1190,83	33,68

2	Rekesalat sent	0	6375,93	5150,55	667,41	5235,21	276,00	1151,83	24,29
	Rekesalat tidlig	3	6305,15	5982,00	643,78	5082,86	732,50	1229,61	33,60
	Rekesalat sent	3	6152,30	5958,75	637,35	5762,70	436,95	1287,44	31,90
	Rekesalat tidlig	3, åpnet	6553,40	5804,47	664,28	4785,53	850,34	1412,24	35,07
	Rekesalat sent	3, åpnet	5161,58	6364,23	660,50	5647,71	537,46	1334,93	n.d.
	Rekesalat tidlig	7	12240,63	2194,78	618,63	1634,43	2856,49	1544,32	n.d.
	Rekesalat sent	7	10286,04	2086,53	602,27	2427,17	1827,58	1279,08	20,08
3	Hvitbete (HB)		8879,44	856,81	130,31	802,53	n.d.	560,35	44,46
	Eple (E)		15,06	353,23	8,97	145,55	n.d.	n.d.	n.d.
	Majones (M)		8775,68	1846,40	1,43	1838,44	236,29	1091,62	n.d.
	Reker (R)		n.d.	5,46	391,45	8,56	n.d.	n.d.	n.d.
	Rekepynt (RP)		n.d.	n.d.	322,11	4,75	n.d.	n.d.	n.d.
	Rekesalat tidlig	0	6022,55	6866,39	613,98	6313,15	254,00	1321,37	28,78
	Rekesalat sent	0	5638,81	6262,90	581,08	5808,81	258,09	1052,48	29,08
	Rekesalat tidlig	3	9298,34	3394,93	521,54	3334,00	311,04	1259,31	18,19
	Rekesalat sent	3	10570,86	3934,58	781,18	3299,64	564,72	1306,63	23,21
	Rekesalat tidlig	3, åpnet	9192,85	2322,48	761,35	2432,66	1029,83	1299,11	18,32
	Rekesalat sent	3, åpnet	10468,19	2056,09	893,28	1895,58	1378,64	1353,56	21,36
	Rekesalat tidlig	6	5594,36	5027,95	698,25	5355,41	2778,97	1430,06	32,86
	Rekesalat sent	6	5009,69	5455,90	609,08	5712,99	2250,33	1110,25	15,38
	Rekesalat tidlig	7	6744,944	3861,855	634,45	4112,02	3333,88	1300,97	28,49
Rekesalat sent	7	6734,064	3903,36	623,14	3828,62	2964,09	1136,76	29,12	
«Dårlig prøve»	Rekesalat		8062,73	601,01	2385,76	532,54	1065,68	850,36	n.d.
	Skagenrøre		10001,92	1101,14	894,46	697,88	2914,23	1046,47	12,31

*n.d = not detected/ikke detekter

Vedlegg 6. pH rådata

Tabell 6. Rådata for pH-måling av ingredienser og rekesalat (tidlig og sent) fra tre produksjoner, samt to dårlige prøver (rekesalat og skagenrøre).

Uke	Prøve	Produksjon 1	Produksjon 2	Produksjon 3	Gjennomsnitt
	Hvitbete (HB)	4,485	4,6	4,46	4,52±0,075
	Eple (E)	4,21	4,25	4,145	4,20±0,053
	Majones (M)	4,015	3,99	4,125	4,04±0,072
	Farge (F)	9,98	10,23	9,48	9,90±0,382
	Reker (R)	5,81	5,74	5,84	5,80±0,051
	Rekepynt (RP)	5,91	5,78	5,63	5,77±0,140
Uke 0	Tidlig	4,81	4,925	4,73	-
	Sent	4,79	4,825	4,75	-
Uke 3	Tidlig	4,7	4,785	4,76	-
	Sent	4,75	4,77	4,825	-
Uke 3, åpen	Tidlig	4,62	4,725	4,635	-
	Sent	4,65	4,68	4,655	-
Uke 6	Tidlig	-	-	4,15	-
	Sent	-	-	4,27	-
Uke 7	Tidlig	4,695	4,46	4,13	-
	Sent	4,67	4,455	4,22	-
Prøve		Dårlig prøve			
Rekesalat		4,46			
Skagenrøre		4,445			

Vedlegg 7. Contig sekvenser fra Sanger sekvensering

Tabell 7. En oversikt over contig sekvensene som ble brukt i BLAST-søk fra Sanger sekvensering.

Prøve	Contig sekvens
Uke 0 Produksjon 2	>Contig-16 ACATGCAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGCGGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAACAG ATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGCATGACACAAAGTAAAAGGCGCTTCGGCGTACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA CCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGA AAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTTGACGGTACCATA CAGAAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGT GAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACCTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAG GTGTTAGGAGGTTTCCGCTCTTAGTGCCGAAGTAACGCATTAAGTGTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCAACG GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTT TAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTT AGTTGCCAGCATTCAGATGGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTGATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTTGCT ACAATGGCGTATAACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCCGGATTGATGCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGTAGT AATCGCGGATCAGCACGCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTTGAATGCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTAGGAAGGA GCCGTCTAAGT
Uke 0 Produksjon 2	>Contig-17 ACATGCAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGCGGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAACAG ATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGCATGACACAAAGTAAAAGGCGCTTCGGCGTACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA CCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGA AAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTTGACGGTACCATA CAGAAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGT GAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACCTGGTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAG GTGTTAGGAGGTTTCCGCTCTTAGTGCCGAAGTAACGCATTAAGTGTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCAACG GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGT GCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGATGGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTG ACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTGATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGCGTATAACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCT AATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCCGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAAATCGCGGATCAGCACGCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTCT GTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGAATGCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTAGGAAGGAGCCGTCTAAGCA
Uke 0 Produksjon 2	CCGAAGGTTACTCCACGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGCTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCG ATTCCAATTCGTGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAATCGAGAACGGTTTAAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCAGT GTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCTAGATGATTTAGCTGTGACGCTTCCCTCCGGTTTGCACCGGAGTCTACTAGAGTGGCCAACTTAATGTTCCCAACTAATAATA GGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAAACCAACATCTCACGACACCGAGCTGACGACAACCATGCACCCTGTCTTGTCCCGAAGGGAAACGCTAATCTCTTAGATTGGCA GAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTTCTTTGAGTTTCAACCTTGGCGTGTACTC CCCAGGCGAATGCTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTAGCATTATCGTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCGTA CCCATGCTTTGAGCCTCAGCGTCAAGTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTCT TGCACTCAAGTCTTCCAGTTTCCAATGCACCTTCTCGGTTAAGCCGAAAGCTTTCACATT
Uke 0 Produksjon 3	>Contig-51 TACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTAATGATTGGTGCTTGCATCATGAATTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGG ATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGAGATGGGTTCCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGA TGGTGAAGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGA ATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAGGGTTTCCGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTGAG GTATTGACGGTATTTAACGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCG

	<p>GTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATAAC GTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTG ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGTCTTGACATACTAGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGG GACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACT CTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCG AACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTAGG</p>
Uke 0 Produksjon 3	<p>>Contig-52 CTATACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGTCTGCATCATGATTTACATTTGAGTGTGGGAACTGGTGTAGTAACACGTGGGAACTGCCAGAAAGCGGGG GATAACACCTGGAAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGTAG ATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGAGTGTAGAGGGTAATCGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG AATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTAGGAAAGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCA GGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC GGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCATAC CGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGG GGACATGGATACAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC TCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTTGC GAACCGGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTAGGAACCGCGCTAAG</p>
Uke 7 Produksjon 2	<p>>Contig-126 TATACATGCAGTCGAACGCACTTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGACCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC CAGAAGTGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAGTAAACCGCATGGTTACTTTTAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGG CGTATTAGCTAGTTGGTGTAGATAAAGGCTCACCAAGGCAGTGTACGTAGCCGACTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGCTTCCACGGGAGG CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTAGTGTGAAGGCTTTAGGGTCTGAAAACCTGTGTTGTTGGAGAAGAACGTGTGTGAGA GTAACCTGCTATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAG CGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGAAAGTTGAAAAC TAAAAGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAGAC GTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATTAGTTGCCAGCATT AAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTA CAACGAGTTGCGAGACCCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCTGCACGAAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG CATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGGAGTAACCTTCGGGAGCTAGCCGTCTAAG</p>
Uke 7 Produksjon 2	<p>>Contig-127 GCTATACATGCAGTCGAACGCACTTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGACCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT GCCCAGAAGTGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAGTAAACCGCAGGTTACTTTTAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGC GCGGTATTAGCTAGTTGGTGTAGATAAAGGCTCACCAAGGCAGTGTACGTAGCCGACTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTAGTGTGAAGGCTTTAGGGTCTGAAAACCTGTGTTGTTGGAGAAGAACGTGTGTGA GAGTAACTGCTATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA AGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG TAGCGGTGAAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGAAAGTTGAAA CTCAAAGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAGA CGTTCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATTAGTTGCCAGCAT TAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGT</p>

	ACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAAGCTGCCTGCACGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCGTACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGAGTAACCTTCGGGAGCTAGCCGTCTAAGG
Uke 7 Produksjon 2	>Contig-18 CCCTTAGACGGCTAGCTCCCGAAGGTTACTCCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCATGCT GATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTTCGTGCAGGGCAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAACCTGAGAACGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTA CCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCTGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATG CTGGCAACTAATAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCAATTCTGCCCCGAAGGGAACGCTCT AATCTCTTAGATTGGCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTFCGCTAGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTGAGTTCA ACCTTGGCGTCTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTAGCATTATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTA TCTAATCTGTTCGCTACCCATGCTTFCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGG AGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTTCCAGTTTCCATGCATCTTTCGGTTAAGCCGAAAGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAA TAAATCCGGATAACGCTTGCACCTACGTATTACCCGGCTGCTGGCAGTGTAGTACCGCTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTCACTGATGACGAGTTACTCTACACACGTTCT TTCTCCAACAACAGAGTTTTACGACCCTAAAGCCTTCACTCACTACGCGCGCTTGTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCGAGGAGTCT GGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCACTGCCTTGGTGAGCCTTTATCTCACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAGAA GTGATAGCCGAAGCCATCTTTAAAAGTAAACCTGCGGTTACTTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGTGTATCCCCACTTCTGGGCAGGTTACCCACGTGTTACT CACCCGTTCCGCACTCACTTTATAGCTAAAATCATCTTCGGTGCAAGCACCTCTAATTCATTCACGAAAGTGCCTTCGACTTGCATGTATAG
Uke 6 Produksjon 3	>Contig-156 CTATACATGCAGTCAACGCACCTTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGCACCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC CCAGAAGTGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAAGTAAACCGCATGGTTTACTTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCG GCGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGCTTTAGGGTCTGTAACACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGTGTGAG AGTAAAGTGCATGCAGTGACGGTATCCAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA GCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATTGGAAGACTTGAAGTGCAGAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCT GGTAGTCCATGCCGTAACAGTGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCACTGCTGCAGCTAACGCAATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGACCCGCAAGGTTGAAAC TCAAAGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCTTCTGCAATCTAAGAGATTAGAC GTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTATTAGTTGCCAGCATT AAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTA CAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCCGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG CATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCGTACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGAGTAACCTTCGGGAGCTAGCCGTCTAAGG
Uke 6 Produksjon 3	>Contig-157 CTATACATGCAGTCAACGCACCTTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGCACCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC CCAGAAGTGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAAGTAAACCGCATGGTTTACTTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCG GCGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGCTTTAGGGTCTGTAACACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGTGTGAG AGTAACTGCTCATGCAGTGACGGTATCCAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA GCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATTGGAAGACTTGAAGTGCAGAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCT GGTAGTCCATGCCGTAACAGTGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCACTGCTGCAGCTAACGCAATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGACCCGCAAGGTTGAAAC TCAAAGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCTTCTGCAATCTAAGAGATTAGAC GTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTATTAGTTGCCAGCATT AAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTA CAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCCGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG CATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCGTACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGAGTAACCTTCGGGAGCTAGCCGTCTAAGG
Uke 6 Produksjon 3	>Contig-158 CCTTAGACGGCTAGCTCCCGAAGGTTACTCCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCATGCTG ATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTTCGTGCAGGGCAGTTGCAGCCTGCAGTCCGAACCTGAGAACGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTAC CGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCTGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGC

TGGCAACTAATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTA ATCTCTTAGATTGGCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTA AACACATGCTCCACCCTGTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAA CCTTGCGGTCTACTCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTAT CTAATCCTGTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCATATATCTACGCATTTACCAGCTACACATGGA GTTCCACTGTCCTCTCTGCACTCAAGTCTTCCAGTTTCCAATGCACTTCTTCGGTTAAGCCGAAAGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAAT AAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTGGATACCGTCACTGCATGAGCAGTTACTCTCACACACGTCT TCTCCAACAACAGAGTTTTACGACCCTAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG GGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGTACGTATCACTGCCTTGGTGAGCCTTATCTCACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAGAAG TGATAGCCGAAGCCATCTTTAAAAGTAAACCATGCGGTTACTTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTCCAGGTGTTATCCCCACTTCTGGGCAGGTTACCCACGTGTTACT CACCCGTTCGCCACTCACTTATAGCTAAAATCATCTTCGGTGCAAGCACCTCTAATTCATTCAACGAAAGTGC GTTCGACTGCATGTATAG

Vedlegg 8. Resultat fra BLAST-søk ved Sanger sekvensering

Tabell 8. Resultater fra BLAST-søk av contig sekvenser fra Sanger sekvensering.

Prøve	Produksjon	Bakterie (art)	% identitet
Sent uke 0	2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
Sent uke 0	2	<i>Leu. mesenteroides</i>	100
Sent uke 0	2	<i>Pediococcus parvulus</i>	99,85
Sent uke 0	3	<i>Lantiplantibacillus paraplantarum</i>	99,93
Sent uke 0	3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,93
Sent uke 7	2	<i>Ped. parvulus</i>	99,93
Sent uke 7	2	<i>Ped. parvulus</i>	99,86
Sent uke 7	2	<i>Ped. parvulus</i>	99,86
Sent uke 6	3	<i>Ped. parvulus</i>	100
Sent uke 6	3	<i>Ped. parvulus</i>	100
Sent uke 6	3	<i>Ped. parvulus</i>	99,93



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway