



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Proteolyse ved tilførsel av eksogene enzymer gir mulige effekter på spisekvalitet, proteinfordøyelse og bioaktivitet i *Semitendinosus*

Linn Christine Thormodsrud

Master i Bioteknologi Molekylærbiologi

Forord

Denne masteroppgaven er en del av «Sunn Mat» prosjektet utført ved forskningsinstitusjonen Nofima i perioden september 2017 til august 2018. Målet med forskningsprosjektet er å bidra med råvarer av høy kvalitet og helsegunstige produkter.

Jeg vil takke mine veiledere ved Nofima, Eva Veiseth-Kent og Mona Pedersen for den positiviteten, tålmodigheten og at døren deres alltid har vært åpen for meg gjennom hele arbeidet. Jeg vil også takke veilederen min ved NMBU, Gustav Vaaje-Kolstad for at du er detaljorientert og gav meg kritiske, men ærlige kommentarer for at jeg skulle utfordre meg selv i gjennomføringen av denne masteroppgaven.

Noen nøye håndplukket personer fortjener også en takk. Tusen takk til Trond Sjølund, Christian F. Holmboe og spesielt Geir Tjønnfjord for at dere har hjulpet meg i lang tid for at jeg er i stand til å fullføre masterstudiet. Prosessen har vært lang, men jeg er evig takknemlig for interessen og støtten dere har vist meg.

Videre vil jeg takke mine nærmeste venner - dere vet selv hvem dere er. Jeg er takknemlig for at vi både kan ha latterkramper eller gråte sammen og støtter hverandre gjennom tykt og tynt – akkurat som dere har hjulpet meg gjennom dette prosjektet. Tusen takk, Ragnhild og Siri for hjelpen i innspurten!

En ekstra stor takk til familien. Jeg gir dere tre av tre poeng, fordi det er en ære, et privilegium og ubetinget glede å ha akkurat dere som min familie. Utfordringer kommer og går, men denne familien består. Tusen takk for at dere i flere sammenhenger samler oss sammen og gir en trygghet full av kjærlighet. Tusen takk til min kjære samboer, Henrik Myklestu for tålmodighet, oppmuntring underveis og korrekturlesing av oppgaven.

Ås, august 2018

Linn Christine Thormodsrud

Sammendrag

Mørhet er avgjørende når forbruker velger kjøttstykke. I framtidens kjøttproduksjon kan tilførsel av eksogene enzymer muligens bidra til forbedret mørhet i seige muskler som normalt brukes til prosessert kjøtt. Videre kan enzymtilførselen gi potensielle positive helseeffekter.

Fra levende dyr blir ulike muskler konvertert til varierende mørt kjøtt gjennom biokjemiske reaksjoner og endringer i muskelstrukturen etter slakt. Muskler er bygget opp av myofibrill, samt stabiliserende bindevev med hovedandel av proteinet kollagen. Nedbrytning av proteiner fra myofibrill og bindevevet ved endogene enzymer bidrar til mørhet sammen med betingelsene ved slakt og post mortem lagring. Tilsetning av eksogene enzymer fra planter eller sopp har vist raskere og mer variert nedbrytning av myofibrill og bindevevsproteiner. Gjennom fordøyelsessystemet blir proteiner spaltet av endogene proteaser til peptider og frie aminosyrer. Måltider med store mengder protein kan føre til gastrointestinale plager, men ved samtidig inntak av kiwifrukt er det rapportert om færre tarmrelaterte symptomer. Peptidene dannet etter fordøyelse i magesekken og tynntarmen kan ha varierende helsefremmende bioaktivitet på ulike funksjoner i menneskekroppen.

I denne masteroppgaven ble analysene utelukkende gjennomført på *Musculus Semitendinosus* fra storfe. *Semitendinosus* ble lagret post mortem i syv dager før injeksjon av marinadeløsning med enzymer fra kiwifrukt (*Actinidia deliciosa*) og fungus (*Rhizomucor miehei*). Mørhet ble analysert ved Warner Bratzler skjærekraft og western blott ble brukt for å kartlegge nedbrytningsmønsteret i utvalgte myofibrill og bindevevsproteiner. Enzymbehandlet kjøttbiter ble kvernet og analysert ved *In vitro* fordøyelse modell, den vannløselige fasen etter proteinfordøyelse ble analysert ved SEC og kjemisk assay for blodsukkerregulering.

Injeksjon av aktinidin i *Semitendinosus* gav forbedret mørhet ved Warner Bratzler skjærekraft, mens samme muskel behandlet med Exocut-RM resulterte i signifikant nedbrytning av flere proteiner. Disse var myosin tung kjede, troponin T og biglykan, til tross for skjærekrefter målt tilsvarende kontroll kjøttet. Analyse av vannløselig fase etter *in vitro* fordøyelse viser resultatene fra størrelseseksklusjonskromatografi en klar indikasjon på at andelen mindre peptider er betydelig større etter duodenal fasen enn etter gastrisk fase, men ingen forskjeller mellom behandlingene ble detektert. Potensialet for gunstig effekt

mot høyt blodsukker ble vist i assay mot α -glukosidase som etter måltid gir rask økning i blodsukkeret.

Stykningsdelen lårtunge er egnet for studier av behandlingseffekt da den er kjent for å ha relativt uniforme skjærekraft verdier i hele muskelen og lite dyr-til-dyr variasjon.

Innsprøyting av marinaden med enkel kanal pipette var en tidkrevende prosess, men marinaden forble i kjøttstykket og systematisk innsprøyting resulterte i jevnere fordeling enn industriell multikanalinjeksjon.

I denne masteroppgaven viste samtlige behandlinger oppnådd skjærekrefter under 50 N/cm², inkludert kontroll som tyder på forsterket påvirkning fra endogene enzymer grunnet forlenget lagringsperiode. Årsaken til at resultater fra denne masteroppgaven varierer fra andre studier kan skyldes ulike konsentrasjoner eller opphav av enzymet, samt analysemetoder for å studere nedbrytning.

I videre arbeid er mer detaljerte analyser ved for eksempel proteomikk nødvendig for å avdekke faktiske forskjeller i proteolysegrad og dannelse av bioaktive peptider mellom enzymbehandlingene. Analyse av flere *in vitro* assay for å teste aktivitet mot patologiske tilstander, etterfulgt av cellemodeller ved påvist aktivitet vil være nyttige for å lete etter helsegunstige peptider.

Abstract

Tenderness is critical when the consumer is choosing a piece of meat. Considering the meat production of the future, the supply of exogenous enzymes may contribute to improved tenderness in tough muscles, which are normally used in the making of processed meat. Furthermore, the addition of enzymes can give potential positive health benefits.

In contrast to living animals, when slaughtered, different muscles are converted into varying levels of tender meat through biochemicals and changes in muscle structure. Muscles are built from myofibrill, as well as stabilizing connective tissue with the bulk of the protein collagen. Degradation of proteins from myofibrill and connective tissue by endogenous enzymes contributes to tenderness along with the conditions of slaughter and post-mortem storage. Addition of exogenous enzymes from plants or fungi has resulted in a faster and more varied breakdown of myofibrill and connective tissue proteins. Furthermore, through the digestive system, proteins are cleaved by endogenous proteases to peptides and free amino acids. Meals containing high amounts of protein can lead to gastrointestinal ailments, but with concomitant intake of kiwi fruit, fewer intestinal related symptoms have been reported. Peptides formed after digestion in the stomach and in the small intestine may have varying health promoting bioactivity on various functions of the human body.

In this study, the analyses were performed exclusively on *Musculus Semitendinosus* from cattle. *Semitendinosus* was stored post-mortem for seven days prior to injection of marinade solution made with enzymes from kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) and fungus (*Rhizomucor miehei*). Tenderness was analysed by Warner Bratzler shear force and western blot was used to map the decomposition pattern in selected myofibrill and connective tissue proteins. Enzyme-treated meat bites were digested by an *in vitro* digestion model, the water-soluble phase after protein digestion was analysed by SEC and chemical assay for blood glucose control.

The results suggested that injecting actinidine into *semitendinosus* improved the tenderness of the meat. In contrast, injecting the same muscle with Exocut-RM resulted in significant decomposition of some proteins. These were myosin heavy chain, troponin T and biglycan, despite the shear forces measured correspondingly to the control. Water soluble phase analysis after *in vitro* digestion suggests that the results of size exclusion chromatography shows a clear indication that the proportion of smaller peptides is significantly greater after

the duodenal phase than after the gastric phase. However no differences between the treatments were detected. The potential for beneficial effect to counteract high blood sugar was demonstrated in the α -glucosidase assay which resulted in rapid growth in blood sugar.

The Semitendinosus muscle is suitable for studying the effect of treatment as it is known to have relatively uniform shear values throughout the muscle and little animal-to-animal variety. Injection of the marinade with single channel pipette was a time consuming process, but the marinade remained in the meat and systematically injecting it resulted in a more even distribution as opposed to the distribution made by an industrial multi-channel injection.

In this thesis, all treatments received cutaneous forces below 50 N /cm², including control indicating enhanced effect from endogenous enzymes due to prolonged storage period. The reason why the results from this Master's Thesis differ from other studies may be due to different concentrations or origin of the enzyme, as well as methods of analysis to study degradation.

In further work, more detailed analyses as for example, proteomics are necessary to reveal actual differences in proteolysis degree and formation of bioactive peptides between enzyme treatments. Analysis of several in vitro assays to test activity against pathological conditions, followed by cell models of detected activity will be useful for looking for beneficial peptides.

Innholdsfortegnelse

Forord	ii
Sammendrag	iii
Abstract	v
Innholdsfortegnelse	vii
Forkortelser	x
1. Introduksjon	1
1.1 Spisekvalitet og næringsverdi	1
1.2 Anatomien til muskelvev	2
1.3 Proteiner i muskelen	5
1.3.1 Sarkoplasmaproteiner	5
1.3.2 Myofibrillproteiner	5
1.3.3 Bindevevsproteiner	7
1.3.3.1 Kollagen	7
1.3.3.2 Små leucine-repeterende proteoglykaner	8
1.4 Muskler	9
1.5 <i>Musculus semitendinosus</i>	10
1.6 Konvertering av muskel til kjøtt	10
1.6.1 Muskel kontraksjon	11
1.6.2 Biokjemiske reaksjoner i muskelen post mortem	12
1.7 Faktorer som påvirker mørhet	12
1.8 Naturlig proteolyse påvirker mørhet	14
1.9 Eksogene enzymer bidrar til mørhet i kjøttstykker	15
1.10. Proteaser	16
1.10.1 Cystein proteaser	16
1.10.2 Aspartat proteaser	17
1.11 Aktinidin	18
1.11.1 Effekt av aktinidin	19
1.12 Exocut-RM	20
1.13 Fordøyelse av proteiner i <i>in vitro</i> modell	22
1.13.1 Effekter av fordøyelse med aktinidin tilstede	23
1.14 Peptider med mulig bioaktivitet	24
1.14.1 Effekter av bioaktive peptider	24
2. Målet med studien	26

3. Materialer	27
3.1 Laboratorieutstyr og instrumenter	27
3.2 Programvarer	30
3.3 Kjemikaler og reagenser.....	30
3.4 Antistoff	33
3.5 Løsninger	34
4. Metodeprinsipper og prosedyrer	36
4.1 Tillaging av marinade	36
4.2 Råvarer og marinering	37
4.3 Warner Bratzler skjærekraft	37
4.4 Protein ekstraksjon	39
4.5 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon	41
4.6 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE).....	42
4.7 Western blott	44
4.8 Kvantifisering av bånd.....	48
4.9 <i>In vitro</i> fordøyelse	50
4.10 Størrelseseksklusjonskromatografi.....	55
4.11 Bioaktive assay	57
4.10.1 α -glukosidase.....	57
4.12 Statistikk.....	59
4.12.1 Variansanalyse (ANOVA)	59
4.12.2 Tukey test	60
5. Resultater	61
5.1 Warner Bratzler.....	61
5.2 Analyse av proteiner fra muskelprøver.....	62
5.3 Western blott	63
5.3.1 Myofibrillproteiner	63
5.3.2 Bindevevsproteiner	65
5.4 Størrelseseksklusjonskromatografi	68
5.5 Bioaktive assay	70
5.5.1 α -glukosidase.....	70
6. Diskusjon	71
6.1 Valg av stykningsdel	71
6.2 Marinering.....	71
6.3 Mørhet målt ved skjærekrefter	73
6.4 Protein nedbrytning	74

6.4.1 Nedbrytning av myofibrillproteiner	75
6.4.2 Nedbrytning av bindevevsproteiner.....	76
6.5 <i>In vitro</i> fordøyelse	78
6.6 Potensiale for bioaktive peptider.....	79
7. Videre arbeid	81
8. Referanser	82
9. Vedlegg.....	91

Forkortelser

°C	Grader Celsius
A-bånd	Anisotrope, dobbeltbrytende bånd
ADP	Adenosin Difosfat
ANOVA	Variansanalyse
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin Trifosfat
BF	<i>Biceps femoris</i>
BSA	Bovine serum albumin
CANP	Kalsium-aktiverede nøytral proteaser
Cys	Cystein
dH ₂ O	MilliQ®-Sterile Water
DTT	Dithiothreitol
ECM	Ekstra cellulær matriks
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FDA	Food and Drug Administration
G	Gravitasjonskraft
GAG	Glykosaminoglykan
Gln	Glutamat
HCl	Hydrogen klorid
His	Histidin
I-bånd	Isotrope, enkeltbrytende bånd
kDa	Kilo Dalton
kN	Kilo Newton
M	Molar
m-kalpain	Mikro-kalpain
mA	Milliamperere
mAU	Milli absorbans unit
MHC	Myosin tung kjede
MLC	Myosin lett kjede

MMP	Matriks metalloproteinaser
N/cm ²	Newton per kvadratcentimeter
N-glykosylering	Sukker som binder til nitrogenatomet asparagin eller arginin
nm	Nanometer
O-acetylering	Sukker som binder til hydroksylgruppen treonin, serin eller tyrosin
o/min	Omdreininger per minutt
PBS	Fosfat bufret saline
pH	pondus Hydrogenii
RM	Rhizomucor miehei
RPM	Runder per minutt
RT	Retensjonstid
SEC	Størrelseseksklusjonskromatografi
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese
SM	Semimembranous
ST	Semitendinosus
SLRP	Små leucine-rike proteoglykaner
SSF	Simulert spytt fluid
SGF	Simulert gastrisk fluid
SIF	Simulert intestinal fluid
TFA	Triflouroacetat
TPBS	Tris fosfat bufret saline
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TrpT	Troponin T
U ml ⁻¹	Units per milliliter
V	Volt
v/v	Volum over volum
W	Watt
WB	Warner Bratzler
Å	Ångstrøm

1.Introduksjon

1.1 Spisekvalitet og næringsverdi

Dietten til mennesket er sammensatt, bestående av både kjøtt, fisk og grønnsaker. Rødt kjøtt er næringsrikt med høy biologisk verdi. Næringsinnholdet i kjøtt opprettholder metabolismen og gir selv i små mengder den nødvendige porsjonen av proteiner og essensielle aminosyrer (Williams 2007). Animalske proteiner gir mye biotilgjengelig protein fordi sammensetningen av aminosyrer ligner oppbygningen i kroppen (FAO/WHO 1991).

Inntaket av proteiner er tilfredsstillende i Norge (Helsedirektoratet 2017) , men forbruker setter også høye krav til kvaliteten og forventer konsistente produkter (Kim et al. 2015).

Spisekvalitet omfatter egenskaper ved kjøttet som mørhet, saftighet, smak og marmoreringsgrad relatert til både muskelfibre og bindevevet (Bekhit et al. 2014; Totland et al. 1988). Ved undersøkelser rangerte forbruker mørhet som den viktigste egenskapen ved valg av kjøttstykket og vil betale mer for garantert mørt kjøtt (Boleman et al. 1997; Maltin et al. 2003)

Norsk kjøttindustri regner 10 % av skrotten til storfe som mørt kjøtt, mens 40 % anvendes til prosessert kjøtt (Personlig kommunikasjon; Rødbotten, 2018, Nofima). Bonden får betalt per kilo slaktevekt i Norge og ingen mørhetsnivåer gir forbedret avkastning. Inntak av prosessert kjøtt har vist assosiasjon med flere typer kreft og hjerte-karsykdommer (Santarelli et al. 2008), og derfor er det ønskelig å øke inntaket av rent kjøtt på bekostning av prosessert kjøtt.

Tilførsel av eksogene enzymer fra planter eller sopp kan forbedre mørhet tilstrekkelig for inntak av flere hele kjøttstykker (Marques et al. 2010). I tillegg kan enzymer minske mørhetsvariasjoner innenfor samme muskel og dyr-til-dyr variasjon og vil gi kvalitetsbevisste forbrukere et forutsigbart produkt (Koochmaraie & Geesink 2006).

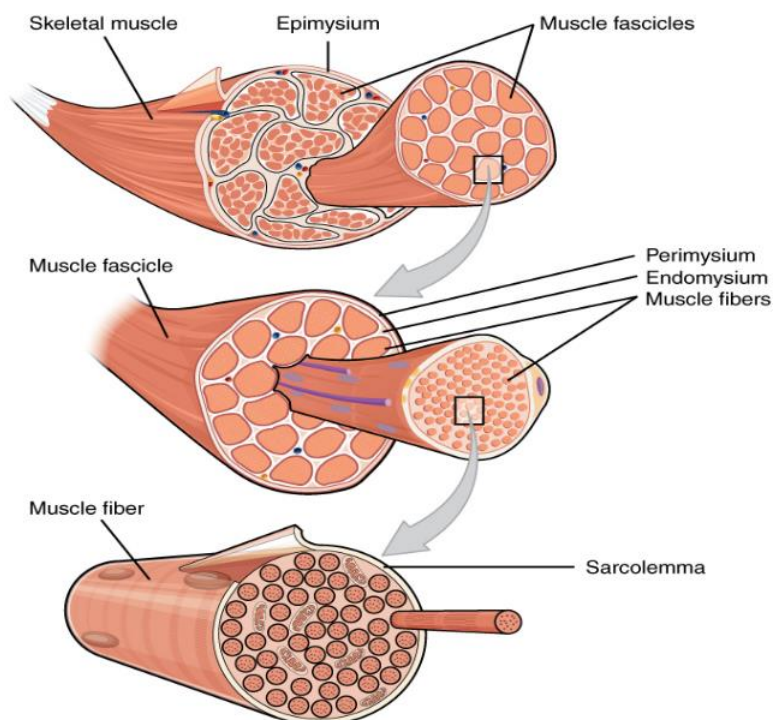
Inntak av kjøtt har formet fordøyelsessystemet hos mennesket (Pereira & Vicente 2013), derfor blir animalske proteiner enkelt fordøyd til varierende peptider i fordøyelseskanaalen (Wen et al. 2015). Enzym-behandlet kjøtt kan produsere bioaktive peptider som er fordelaktige for helsen (Lafarga & Hayes 2014), men for best virkning må peptidene bli frigjort på riktig tidspunkt i mage-tarmkanaalen (Rønning et al. 2016).

1.2 Anatomien til muskelvev

Den biologiske funksjonaliteten bestemmer i hvilken grad skjelettmuskelen bidrar til spiselig kjøtt (Sentandreu et al. 2002). Skjelettmuskulaturen er viljestyrt muskulatur festet til skjelettet med sener, der bevegelser blir initiert av elektriske impulser. I gjennomsnitt inneholder muskler 75 % vann, 20 % proteiner, 1-10 % lipider, 1 % karbohydrater og 1 % sporelementer (Listrat et al. 2016). Mengden lipider varierer mest mellom arter, men størrelsesforholdet av protein og væske er konstant 0,3 (Lana & Zolla 2016). Samtlige muskler har felles oppbygning med bindevev som adskiller muskellagene i muskelstrukturen (Listrat et al. 2016), men sammensetning av type muskelfiber og bindevev varierer mellom ulike muskler (Totland et al. 1988).

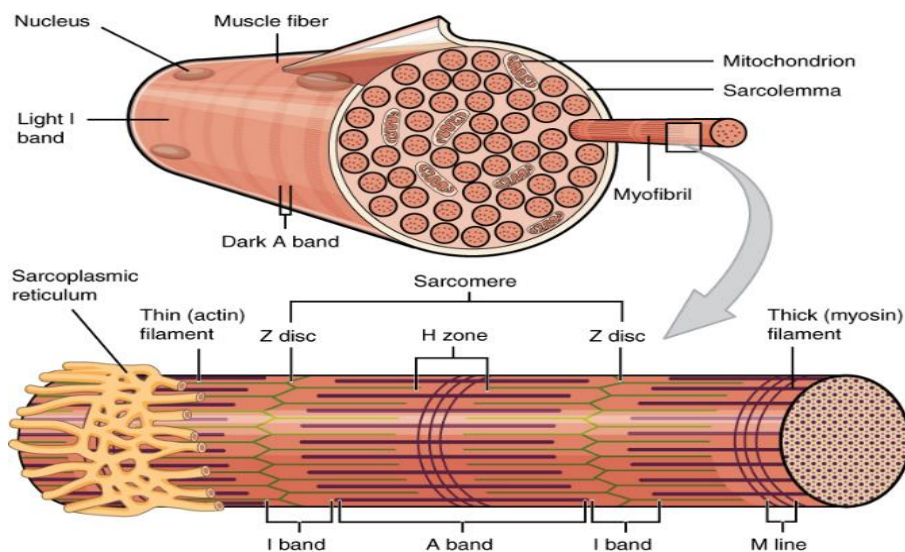
Bindevevet skal beskytte muskelstrukturen og overføre kraften fra musklene til skjelettet ved bevegelse, samt binde organer og individuelle muskler sammen. Det intramuskulære bindevevet er delt i tre hinner og gir muskelen helhetlig struktur: epimysium, perimysium og endomysium (Purslow 2014) (Figur 1). Ytterst ligger en heldekkende hinne kalt epimysium som separerer individuelle muskler. Hinnen består av flere lag med kollagen fibre og er sammenhengende med senen. Innenfor ligger langsgående bunter av muskelfibre adskilt med bindevevshinnen perimysium, men danner sener i enden som fester muskelen til skjelettet (Nishimura 2010). Mengden kollagenfibriller i perimysium varierer mest mellom ulike muskler og lagrer intramuskulært fett som bidrar til marmorering (Avery & Bailey 1995). Den minste forbindelsen til bindevevet, endomysium separerer individuelle muskelfibre.

Individuelle muskler har tråder i hele lengderetningen. Trådene er muskelfiber bunter med diameter på 2 mm synlig for det blotte øyet, mens mikroskopet viser individuelle lange muskelfibre som bygger opp muskelbuntene (Tornberg 1996). Innenfor en muskelfiber ligger cellemembranen kalt sarkolemma, og i cellevæsken sarkoplasma finnes alle organellene tilhørende levende celler. Organeller har spesialiserte funksjoner som konverterer kjemisk energi til mekanisk energi, for eksempel inneholder mitokondriet enzymer til aerob metabolisme og lysosomer som lagrer proteolytiske enzymer (Lana & Zolla 2016). I tillegg inneholder muskelcellene sarkoplasmatiske retikulum, et lager for Ca^{2+} nødvendig i muskelkontraksjon (Martonosi 2000).



Figur 1: **Organisering av muskel på makronivå.** Skjelettmuskulatur består av muskelfibre og en liten andel bindevev. Individuelle muskler er avgrenset med bindevevshinnen epimysium, deretter er muskelbuntene separert av perimysium og hver muskelfiber er adskilt av endomysium. Væsken som adskiller muskelfibre kalles sarkolemma, den inneholder proteiner som kontrollerer mange vevsfunksjoner og myoglobin som bærer oksygen til mitokondriet for å gi muskelcellene rød farge. Hentet fra OpenStax Anatomy and Physiology, 2013

Intracellulært i sarkoplasma finnes myofibrillene. Forstørrelse av myofibrillene i elektronmikroskop viser repeterende tykke og tynne filamenter. Proteinene myosin og aktin bygger opp hvert av filamentene og er avgjørende for muskelkontraksjon (Lafarga & Hayes 2014). Kontraksjonsenhetene kalt sarkomer gir myofibriller et karakteristisk tverrstripet utseende grunnet organisering av myosin og aktin (Huxley 1969). I tillegg til kontraksjonsproteinene består sarkomer av regulerende og organisatoriske proteiner.



Figur 2: **Organisering av muskelfiber på mikronivå.** Hver muskelfiber er adskilt med bindevevshinnen endomysium. En muskelfiber består av mange myofibriller som har repeterende kontraksjonsenheter kalt sarkomer. De viktigste delene er det tynne og tykke filamentet, som kryssbinder under kontraksjon (A-båndet). Z-disken koordinerer individuelle myofibriller og nærliggende I-båndet består av aktin og troponin-tropomyosin kompleks. Hentet fra OpenStax Anatomy and Physiology, 2013

Oppbygningen av sarkomer blir definert av interaksjon mellom filamentene og Z-disker som avgrensner hver sarkomer (Fasting 2016) (Figur 2). Det sentrale A-båndet omtales som tykt filament bestående av myosin, og er dobbeltbrytende i elektronmikroskop. Hvert tykke filament blir omringet av tynne filamenter bestående av aktin og tropomyosin-troponin kompleks. Filamentet viser et enkeltbrytende bånd i elektronmikroskop, derfor kalt I-båndet med forankringspunkt i Z-disken på begge sider av sarkomer. I Z-disken blir nærliggende tynne filamenter bundet sammen av α -aktinin (Agarkova & Perriard 2005). På samme måte i senter av A-båndet finnes tettliggende myosin filamenter bundet sammen av myomesin dimer til M-linjen nødvendig for pakking av det tykke filamentet (Knappes & Carlsen 1968). I hele lengderetningen til det tykke filamentet ligger titin proteiner for å holde myosin i senter av sarkomer. Nærliggende myofibriller blir bundet sammen til sammenhengende tredimensjonal struktur av desmin lokalisert i utkanten av Z-disk assosiert med cytoskjelettet som gir cellen form og struktur (Agarkova & Perriard 2005).

1.3 Proteiner i muskelen

Proteiner utgjør byggeklossen til muskler og vev, samtidig er det essensiell næring for mennesket. Hoveddelen av næringsstoffene i muskelen er proteiner. En typisk muskel har totalt 20 % proteiner kategorisert i tre hovedgrupper basert på funksjon og løselighet; 5,5 % sarkoplasma-, 12,5 % er myofibrill-, og 2 % bindevevsproteiner.

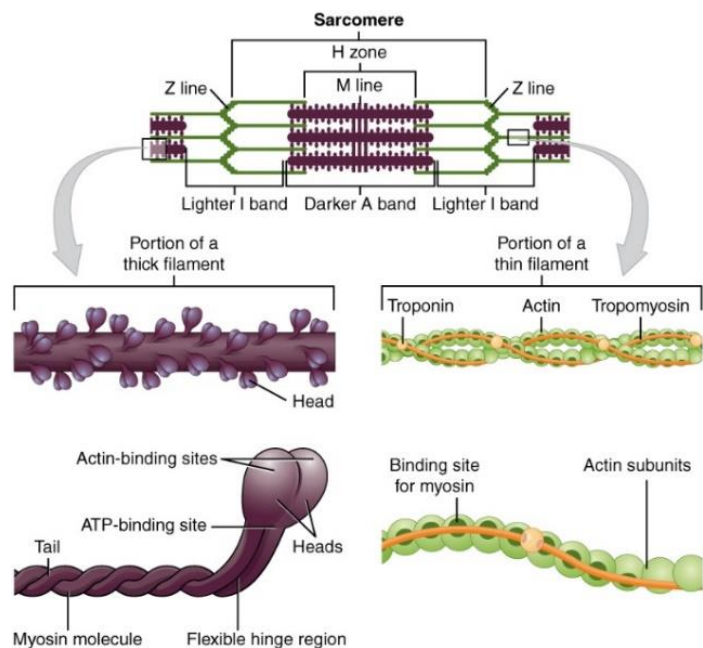
1.3.1 Sarkoplasmaproteiner

Proteiner som er ansvarlig for metabolisme i cellen ligger innenfor cellemembranen, sarkolemma. De blir kalt sarkoplasmatiske proteiner i muskelceller og er vannløselige (Bowker et al. 2012). Sarkoplasmatiske proteiner utgjør 30 % av muskel protein og kontrollerer mange vevsfunksjoner (Damodaran et al. 2008). Dette inkluderer enzymene som katalyserer biokjemiske reaksjoner i muskelen og myoglobin som gir kjøtt den røde fargen (Listrat et al. 2016).

1.3.2 Myofibrillproteiner

Proteinene i en myofibrill gjør muskelen i stand til å kontrahere, men regulerende og strukturelle proteiner er tilstede i små mengder. Kontraksjonsproteinene er løselige i konsentrerte saltløsninger og utgjør 50 % av muskel proteinene (Damodaran et al. 2008). En sammenstilling av myosin filamenter utgjør det tykke filamentet i sarkomer (Figur 3), bygget opp av hundrevis myosin molekyler som danner heliks struktur (Miroshnichenko et al. 2000). Hvert myosin filament

består av seks polypeptid kjeder; to identiske tunge kjeder danner dobbelheliks og to par tilhørende lette kjeder. Den ene lette kjeden kontrollerer kryssbindingen med aktin og den andre stabiliserer α -heliks nakken bestående av myosin tung kjede (Solaro & Leinwand 2012). I tillegg har lett kjede bindingssteder for Ca^{2+} nødvendig for



Figur 3: **Kontraksjonseenheten sarkomer.** Hver sarkomer består av kontraksjonsproteinene myosin og aktin, regulerende proteinene troponin og tropomyosin, samt assosierte og organisatoriske proteiner. Hentet fra OpenStax Anatomy and Physiology, 2013

å initiere kontraksjon (Blumenthal & Stull 1980).

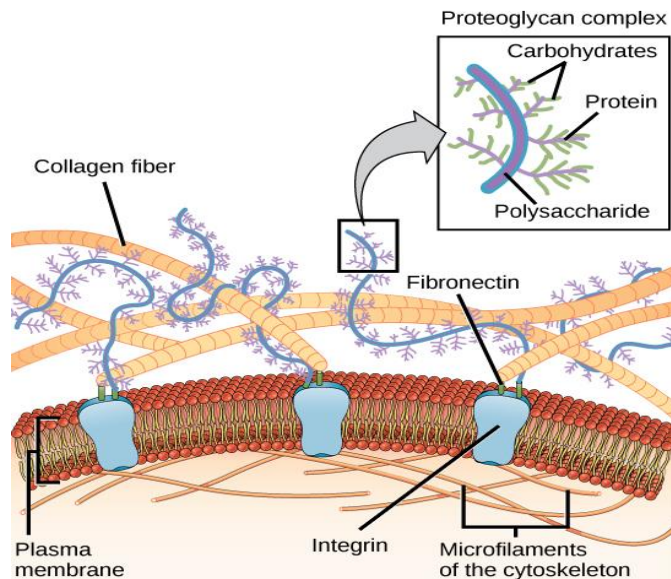
De tunge kjedene har tre domener med ulike funksjoner; en hoderegion essensiell for kontraksjon, nakke involvert i binding av lett kjede og halen sikrer posisjonen til tung kjede i sarkomeren. Hoderegion har et globulært motor domene med bindingssete for aktin og ATPase aktivitet som katalyserer hydrolysen fra ATP til ADP og fosfat (Listrat et al. 2016). Frigjøringen av energi og at motor domene fremkaller bevegelse selvstendig er essensielt for kontraksjon (MBInfo 2018).

Fra Z-disk mot senter av sarkomer er det tynne filamentet av aktin og regulerende troponin-tropomyosin forankret (Listrat et al. 2016) (Figur 3). Aktin bygges opp fra monomeren G-aktin som polymeriseres til dobbel heliks. Proteinet glir mellom myosinfilamentene når muskelen er avslappet fordi troponin dekker bindingssetene for myosin (Lehman et al. 2000). Flere enheter av tropomyosin omgir aktin i hele lengderetningen, mens troponin fester i endepunktene til tropomyosin. Dette komplekset, tropomyosin-troponin regulerer interaksjonen mellom aktin og myosin. Troponin består av flere isoformer; når Troponin C binder Ca^{2+} initieres strukturelle endringer i aktin-tropomyosin (Gomes et al. 2002; Lehman et al. 2000). Endringen fører til ATPase aktivitet og dermed muskel kontraksjon. Troponin I inhiberer aktiviteten til ATPase aktiviteten i hoderegion til myosin, mens troponin T danner kompleks med tropomyosin (Gomes et al. 2002).

Organisatoriske proteiner sikrer posisjonen til myofilamentene ved å holde strukturen sammen i lengderetning (Tornberg 1996). Titin og desmin er avgjørende proteiner for mekaniske egenskapene til myofibrill, mens nebulin og obscurin er mindre studert (Ertbjerg & Puolanne 2017). Titin binder sammen nabosarkomerer med forankringspunkt i myosin fra M-linjen til Z-disken. Dermed holder titin myosin filamentet i senter av sarkomer, og definerer lengden på sarkomer i avslappet muskel (Wang et al. 1979). Nabosarkomerer blir forbundet av desmin lokalisert i Z-disk til en sammenhengene struktur. Nebulin vedlikeholder lengden til det tynne filamentet, og sammen med titin hindrer at sarkomer blir overstrukket ved å definere bredden på Z-disken (Witt et al. 2006).

1.3.3 Bindevevsproteiner

Den sammenhengende skjelettmuskulaturen holdes oppe av intramuskulært bindevev. Av den totale proteinbestanddelen i en muskel utgjør bindevevsproteinene 10-20 %, hvor hoveddelen er kollagen. Disse proteinene er uløselige selv i konsentrerte saltløsninger (Damodaran et al. 2008).



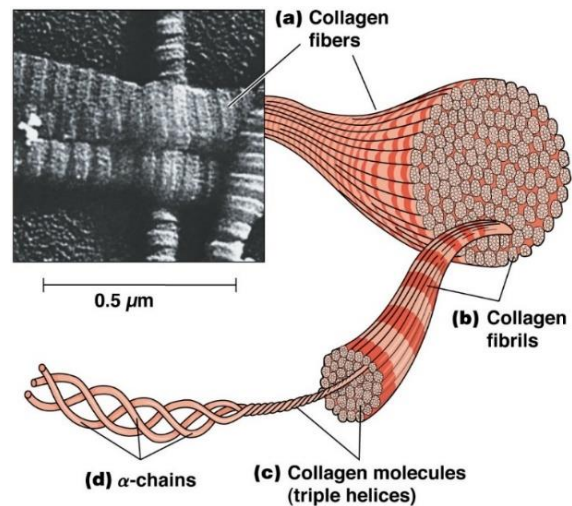
Figur 4: Ekstracellulær matrix er en del av intramuskulært bindevev bestående av kollagen og glykoproteiner omringet av proteoglykaner. Hentet fra Lumen, u.å (lest 15.05.18)

Intramuskulært bindevev består av celler og ekstracellulær matrix (ECM) med kollagen og glykoproteiner i et omfattende nettverk, omringet av proteoglykaner (Nishimura 2015) (Figur 4). ECM er viktig for biomekanisk styrke til bindevevet, elastisitet til muskelen og regulerer celledivisjonen til muskelcellene (Chen & Birk 2013).

1.3.3.1 Kollagen

Kollagen er hovedkomponenten i intramuskulært bindevev for sener, hud, blodårer og muskler. Det totale kollageninnholdet i biffmuskler varierer fra 1-15 % (Purslow 2005) og totalt finnes 28 isoformer av kollagen. I tillegg dannes hybrider av isoformer fra α -kjeder tilhørende to ulike kollagen som er fibrillære, non-fibrillære eller assosierende (Ricard-Blum 2011). I ulike bindevevslag er isoformer av kollagen er tilstede; epimysium inneholder type I, perimysium inneholder type I og III, mens endomysium inneholder type IV og V (Bailey & Sims 1977; Herod et al. 2016). I bindevevet er kollagen type I den rikeligste isoformen (Ha et al. 2013b) som består av to α_1 og en α_2 kjeder (Ricard-Blum 2011).

Kollagenfibre har lange fibre av regelmessig bundet kollagen fibriller (Lafarga & Hayes 2014), som er vist i figur 5. Aminosyrene i kollagen danner tre polypeptider kjeder kalt α -kollagen av repetitive glysin-x-y sekvens motiver, der x ofte er proline og y er 4-hydroksyproline (Ricard-Blum 2011). Intramolekylære disulfidbroer og hydrogenbindinger holder sammen trippel helikser av α -kollagen kjeder for å danne kollagen fibriller (Lepetit 2008) (Figur 5). Kryssbindingene gir stabilitet og styrke til fibrillen, men avhenger av pH og saltkonsentrasjoner (Sugiyama et al. 2005).



Figur 5: Organisering av kollagen fibre. Kollagen er bygget opp av aminosyrene glysin, proline og hydroxyprolin i repeterende mønster. Dette danner α -kollagener som tre og tre kveiles til trippel heliks for å danne kryssbundet kollagen fibriller. En nettverkstruktur blir til når individuelle fibriller bygger opp fibre.

Individuelle fibriller blir deretter satt sammen til kollagen fibre og danner en nettverksstruktur. Hos unge dyr er nettverket av kryssbindinger ustabil. Etterhvert som dyret vokser, øker mekaniske styrke og mengden bindevev (Purslow 2005). Dermed blir kryssbindingene mer stabile med alderen, samtidig som løseligheten til kollagen synker (Marsh 1977). Ved varmebehandling til 65 °C ble stabiliteten til kryssbindingene undersøkt av Torrescano et al, høyere stabilitet var korrelert med seigere kjøtt og fastheten varierte blant musklene (2003).

Ved varmebehandling omdanner kryssbindingene i kollagen til vilkårlig gel struktur, men omfanget avhenger av stabiliteten til bindevevet (Lepetit 2008). Kollagenettverk er ustabil hos unge dyr, danner trippel heliksen i kollagenet glatt og løselig gelatin (Sugiyama et al. 2005). Forbrukere oppfatter dette kjøttet som mørt og saftig, mens kjøtt fra eldre dyr har uløselig bindevev og gir seighet til kjøttet.

1.3.3.2 Små leucine-repeterende proteoglykaner

Ekstracellulærmatriks tilhørende bindevevslagene blir omringet av proteoglykaner (Chen & Birk 2013), bestående av kjerne protein og varierende kjeder glykosaminoglykan (GAG) bundet til serin-treonin i kjerne proteinet (Nishimura 2010). Proteoglykaner i familien «små leucine-repeterende proteoglykaner» (SLRP) interagerer med kollagen fibriller for å feste

fibrillene sammen til nettverksstruktur (Schönherr et al. 1995), dermed kan kollagen utføre mekanisk bevegelse (Vesentini et al. 2005). Karakteristisk for SLPR er proteiner med cystein rike områder ved N- og C-terminal som beskytter den sentrale regionen med repeterende leucin residuer (Bio-technique 2018).

Dekorin og biglykan er nært beslektet SLPR og antas å være resultat av gen duplikasjon. (Schönherr et al. 1995). Dekorin er modifisert med GAG kjede, i kontrast til biglykan med to N-glykosylerte GAG-kjeder (Nishimura 2015). Begge proteinene er betydningsfulle i organisering av kollagen matriksen (Schönherr et al. 1995). Proteinene har ulik lokalisering fordi sammensetningen i bein og sener krever interaksjoner med flere typer kollagen. Dekorin interagerer med kollagen type I, II og III (Hildebrand et al. 1994), mens biglykan interagerer sterkt med kollagen type II og har lavere affinitet for kollagen type I (Chen & Birk 2013).

Proteoglykaner danner en kappe over kollagenet og hindrer at enzymet kollagenase kommer til fibrill overflaten. Dermed beskytter proteoglykanene fibrill fra proteolytisk ødeleggelse og forsinker nedbrytningen (Roughley 2006). Under lagring av kjøtt blir proteoglykaner brutt ned og strukturelle endringer i EMC bidrar dermed til mørhet i modent (Lepetit 2008), som er til salgs etter 14 dager mørning (Lian et al. 2013).

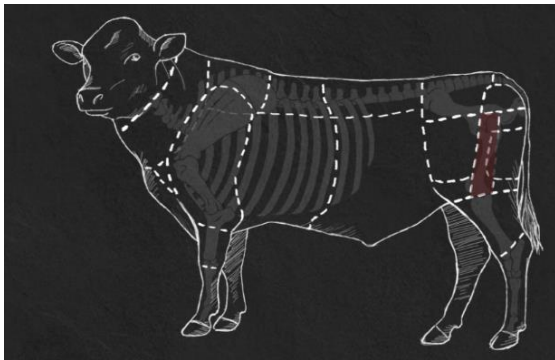
1.4 Muskler

Muskler varierer i form og størrelse, og heterogenitet mellom muskler reflekterer ulike funksjonelle oppgaver hos dyret (Pette & Staron 1990). Oksekjøtt har varierende spisekvalitet som brukes til ulike formål i matlaging. Hele 40 % av skrotten til norsk storfekjøtt benyttes som produksjonskjøtt (MatPrat 2018), dermed finnes potensiale for å anvende flere stykningsdeler som hele kjøttstykker.

Følgende muskler er blant de møreste, kategorisert av Belew et al. (2003) etter synkende mørhet; *psaos major* (indrefilet), *longissimus thoracis et lumborum* (ytrefilet og entrecôte), *triceps brachii* (bog plomme til oksestek) og *rectus femoris* (rundstek). Eksempler på noen mindre møre muskler er; *vastus lateralis* (rundstek), *semitendinosus* (lårtunge) samt *semimembranosus* og *adductor* (begge til flatbiff).

1.5 *Musculus semitendinosus*

I arbeidet som beskrives i denne masteroppgaven har eksperimentene utelukkende blitt utført på en spesifikk muskel: *semitendinosus* (ST), halvsenete lårmuskel eller lårtunge, som er vist i figur 6. Muskelen inngår i lårmuskulaturen og ligger mellom *semimembranous* (SM) og *biceps femoris* (BF), disse tre musklene utgjør senemuskulaturen på baksiden av kneet. Dette området har de største musklene og blir kategorisert som moderat møre til seige (Reuter et al. 2002). Stykningsdelen blir benyttet som produksjonskjøtt til pålegg, kjøttdeig, karbonadedeig og pølser avhengig av fettprosent.



Figur 6: Ulike stykningsdeler etter norsk inndeling av okse er vist i stiplet linjer. Muskelen studert i denne oppgaven heter *Semitendinosus*, vist i rødt. Denne inngår i lårmuskulaturen og danner senemuskulaturen bak kneet sammen med *semimembranous* og *biceps femoris*. Hentet fra Matprat, 2018.

Mørhetsmålinger kan variere i ulike deler av muskelen, resultater fra Shackelford viste gradvis signifikant nedgang i skjærekraft fra fremre til midtre del, og fra midte til distale delen (1997). Dermed foreslått at den midtre delen selges som førsteklasses rundstek, mens resten til produksjonskjøtt (Reuter et al. 2002).

Kategorisering av muskelen krever nøyaktig kunnskap om sammensetningen av muskelfibre og hvordan mørhet er fordelt i muskelen (Hildrum et al. 2009).

Semitendinosus har tilfredsstillende mørhetsmålinger tilsvarende mindre mørt kjøtt (Belew et al. 2003), men relativt mye bindevev gir seig smaksopplevelse (Totland et al. 1988). Intramuskulært fett bidrar til saftighet i kjøttstykker. Fettinnholdet i *Semitendinosus* (3-14 %) er varierende gjennom muskelen (Nishimura 2015), men på det laveste tilsvarende mørt kjøtt som indre- og ytrefilet (2-5 %).

1.6 Konvertering av muskel til kjøtt

I levende dyr sørger skjelettmuskulaturen for bevegelse. Når muskler konverteres til kjøtt er reaksjonene etter døden av størst betydning for kvalitet, men det krever kunnskap om muskelkontraksjon for å forstå konverteringen.

Slaktet utgjør 50-75 % av dyrets levende vekt og består av muskler, fett og bein (Huff Lonergan et al. 2010). Ved håndtering av skroten vil noen muskler trekkes sammen, mens

andre blir strukket ut og dette påvirker mørheten. Kort tid etter slakt skjer forandringer som gir dødsstivhet (rigor mortis), og senere blir endogene proteaser frigjort fra lysosomene for å bryte ned proteiner i muskelstrukturen (Kemp et al. 2010).

1.6.1 Muskel kontraksjon

En kontrahert muskel vil resultere i seigt kjøtt, derfor blir tilstanden til muskelkontraksjonen kontrollert før slakt (Herring et al. 1965). Energi i form av ATP brukes direkte i muskelkontraksjonen som omsettes fra næringsstoffer gjennom oksidativ eller glykolytisk reaksjonsvei (Listrat et al. 2016), men dannelse av ATP opphører etter slakt. Kontraksjonen igangsettes normalt når en nerveimpuls starter kalsiumpumper i sarkoplasmatiske retikulum drevet av ATP. Dette depolariserer sarkolemma og medfører at Ca^{2+} kan strømme inn i muskelcellene. Deretter overføres depolariseringen til sarkoplasmatiske retikulum membranene rundt hver myofibrill. Mangel på ATP hindrer regulering av kalsiumpumpen og fører til massiv lekkasje av Ca^{2+} ut av muskelcellene til sarkoplasma, hvilket medfører ukontrollert sammentrekning av muskelen (Lehman et al. 2000).

Ved normal muskelfunksjon aktiverer kalsiumionene ATPase funksjon i myosinhodet og metter troponin C. Dette forskyver tropomyosin og bindingssete på aktin blir tilgjengelig (Gomes et al. 2002). Aktin har høy affinitet for myosin og danner et midlertidig kompleks, kalt aktomyosin ved muskel kontraksjon (Huxley 1969). Dermed forkortes sarkomer 30 % av opprinnelig lengde og aktin filamentet møter M-linjen, bestående av myosin. Etter slakt under dødsstivhet fasen forblir binding av aktomyosin permanent grunnet mangel på ATP og sarkomer forkortningen bestemmer seigheten i muskelen. Under forkortningen i levende muskler hvor myofibrill er kontrahert, fester ATP til myosinhodet og spalter bindingen mellom aktin og myosin. Dette tvinger myosinhodet tilbake i opprinnelig vinkel, forberedt på den neste kontraksjonen. Når nerveimpulsen opphører blir Ca^{2+} reabsorbert til sarkoplasmatiske retikulum, og blir akkumulert i sarkoplasma når muskelen slapper av (Martonosi 2000).

Ved døden opphører blodsirkulasjonen og plutselig oksygentap inntreffer. Pre-dødsstivhet fasen etableres 3-6 timer etter slakt (Lana & Zolla 2016), likevel fortsetter muskelen å kontrahere samt gjendanne ATP fra energireservene.

1.6.2 Biokjemiske reaksjoner i muskelen post mortem

Ved anaerobe betingelser, omdannes pyruvat til laktat og muskelcellene tilføres ATP fra glykolysen. ATP konsentrasjonen vedlikeholdes helt til mangel på glukose eller utilstrekkelige betingelser som for lav pH inhiberer enzymene. Varigheten av glykolysen og nedkjøling leder musklene gjennom ulike pH og temperatur kombinasjoner (Ertbjerg & Puolanne 2017). Melkesyre akkumuleres i muskelen og etter 16-36 timer er muskelen forsuret fordi pH har sunket til 5,5 (Lana & Zolla 2016).

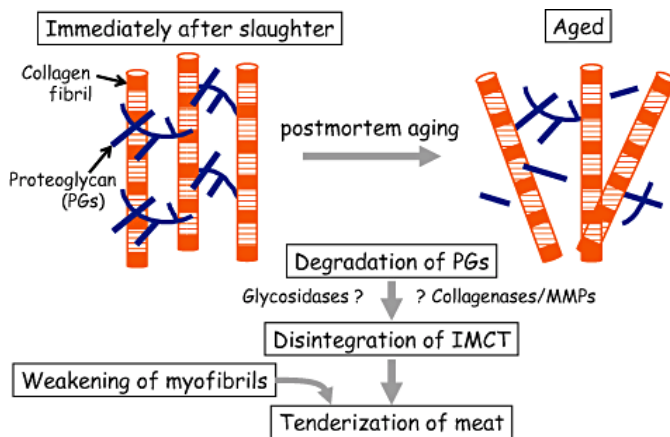
Muskelen etablerer rigor mortis 12-24 timer postmortal forekommer maksimal seighet (Koochmaraie 1996). Hver muskelfiber entrer rigor mortis avhengig av det initiale glykogen nivået. Når glykogen lagrene er brukt opp finnes ikke ATP lengre i kontraksjonssyklusen. Muskelen gjennomgår ukontrollerbare sammentrekninger grunnet massiv lekkasje av Ca^{2+} fra muskelcellene til sarkoplasma, og mangel på ATP forårsaker permanent binding av aktomyosin. Dermed blir lengden til sarkomer fastsatt og resulterer i forkortet muskelfibre (Herring et al. 1965). Dersom aktomyosin dekker et stort område av myofibrillene, vil varmebehandling resultere i koagulering av protein nettverket som vil resultere i seigere kjøtt.

1.7 Faktorer som påvirker mørhet

Etter rigor mortis blir musklene konvertert til varierende mørt kjøtt gjennom biokjemiske, biofysiske og strukturelle endringer i muskel strukturen (Paredi et al. 2012). Nedbrytning av bindevevet og myofibrill strukturen påvirker mørheten (Savell & Shackelford 1992). Iboende egenskaper endres lite ved post mortem lagring og intramuskulært fett øker mørhet i kjøttet (Sentandreu et al. 2002). Derimot er postmortale betingelser avgjørende for optimal mørt kjøtt og påvirkes av sarkomer lengde, temperatur, pH og proteolyse (Maltin et al. 2003). Seighet grunnet sarkomer forkortning forsvinner i liten grad ved modning, og det er vist negativ korrelasjon mellom kjøtt mørhet og sarkomer lengde med under 2 μm (Sentandreu et al. 2002). Sarkomer lengden i levende dyr er korrelert med mørhet i postmortal muskel (Herring et al. 1965), for eksempel har den seigere *Semitendinosus* (lårtunge) sarkomer lengde på 2,4 μm , mens *psaos major* (indrefilet) er lengden 3,2 μm som gjør denne muskelen mørere (Ertbjerg & Puolanne 2017).

Tilpasset hastighet på nedkjøling og temperatur ved dødsstivhet fasen, sikrer mørere kjøtt (Marsh 1977). Dersom muskelen blir dødsstiv ved 10-15 °C, vil dette medføre liten forkortning av myofibrill strukturen. Kjøtt blir generelt mørere om det entrer rigor under 15 °C fordi proteolytiske enzymer vil bryte ned myofibrill strukturen, mens enzymene vil denaturere ved høyere temperaturer (Kemp et al. 2010).

Nedbrytning av proteoglykaner er trolig hovedfaktor for svekkelse av intramuskulært bindevev, separasjon av kollagen fibriller og fiber fra endomysium og perimysium. Dette resulterer i delvis murning av kjøtt under postmortal modning som vist i figur 7 (Nishimura et al. 1996). Hydrolyse av myofibrill- og bindevevsproteiner ødelegger muskelstrukturen, samt nedbrytning av ekstracellulære matriksen gir minsket skjærekraft (Bailey & Light 1989).



Figur 7: Illustrasjon over stabilitet i kollagen nettverket etter slakt og modent kjøtt. Umiddelbart post mortem, binder proteoglykaner kollagen fibriller og stabiliserer bindevevet. Under post mortem modning, blir proteoglykaner nedbrutt og bindingen mellom kollagen fibriller blir svakere. Denne strukturelle endringen i bindevevet bidrar til mørhet i modent kjøtt. Figur hentet fra Nishimura, Hattori og Takahashi (1996a).

Mørhet skyldes også nedbrytning av myofibrill strukturen (Savell & Shackelford 1992). Mer bestemt regulerende proteiner, assosierte proteiner med Z-disk og proteiner tilhørende cytoskjelett som holder rammeverket i muskelfiberen (Herring et al. 1965; Sentandreu et al. 2002). Bidraget fra titin og desmin til cytoskjelett strukturen gjør proteinene til nøkkelsubstrater for kjøtt mørhet (Lian et al. 2013). Nettverket av α -aktinin i Z-linjen blir nedbrutt under modning av kjøtt. Den vanligste markøren for naturlig nedbrytning av myofibrill i post mortem kjøtt er forskjeller i 30 kDa fragmentet til Troponin T, selv om nedbrytning av Troponin T ikke påvirker mørhet direkte (Ryder et al. 2015). Ved

varmebehandling gir aktin og myosin seighet, mens bindevevet, spesielt fra unge dyr danner gelatin (Lametsch et al. 2003). Den endelige mørheten etter postmortal proteolyse reflekterer mengden nedbrutt myofibrill- og bindevevsproteiner. Post mortem proteolyse er beskrevet mer i detalj i det påfølgende kapitlet (1.8).

1.8 Naturlig proteolyse påvirker mørhet

I en levende muskel blir sarkomer kontinuerlig fornyet, men myofibrillproteinene blir brutt ned av proteolytiske enzymer i fungerende muskel (Ertbjerg & Puolanne 2017). Proteolytiske enzymer også kalt proteaser, har bred substrat spesifisitet til å hydrolysere peptidbindingene i proteiner og peptider. Proteaser er delt inn i seks klasser, inkludert cystein og aspartat proteaser. Inndelingen er basert på mekanisme og karakteristiske funksjonelle aminosyrer i det aktive setet.

Under mørningsfasen bidrar cystein proteaser som kalsium-aktiverte kalpainer, lokalisert i sarkoplasma, og cystein/aspartat katepsiner i lysosomene til mørere kjøtt grunnet nedbrytning av myofibrillproteinene (Sullivan & Calkins 2010). Kaspaser som normalt er involvert i apoptose er også foreslått å bidra i post mortem proteolyse (Bernard et al. 2007).

Enzymet kalpain består av tre proteaser i skjelettmuskulatur; μ -kalpain, m-kalpain og kalpain 3. Kalpainer har en sentral rolle i postmortal mørning ved å svekke proteiner i strukturen til myofibrill, men gir lite nedbrytning av kontraksjonsproteinene myosin og aktin (Geesink et al. 2005; Gil et al. 2006; Koohmaraie & Geesink 2006). Enzymene har optimal aktivitet ved nøytrale pH betingelser (Dransfield 1994). Aktiviteten forsvant 7 dager post mortem, og det ble dermed konkludert at enzymet deltar i modningen (Beltrán et al. 1997). Kalpain μ er aktivt *in vivo*, mens kalpain m deltar i nedbrytning av myofibrill ved høyere kalsium konsentrasjon (Boehm et al. 1998). Kalpain μ og m blir inhibert av kalpastatin som også aktiveres av kalsium, og kontrollerer aktiviteten til kalpain (Hopkins & Geesink 2009). Kun muskelvev inneholder kalpain 3, som er bundet til titin. Under postmortal mørning er kalpain 3 fritt i muskelcellen fordi Z-disken er brutt ned (Lian et al. 2013), men har liten betydning i postmortal mørning (Geesink et al. 2005).

Den lysosomale membranen i muskelceller inneholder ulike katepsiner som bidrar i protein turnover for blant annet myosin og aktin i levende muskelceller. I post mortem muskel blir

katepsiner frigjort til cytosol som inneholder inhibitoren cystatin (Kamphuis et al. 1985), dermed blir mørning av myofibrillene hemmet (Koohmaraie 1996).

Nedbrytning av bindevevet i muskel kommer av kollagenase aktivitet som kan bryte ned omkringliggende proteoglykaner og kollagen i ekstra cellulær matriks (Nishimura 2010). Mye oppmerksomhet er rettet mot kollagenaser tilhørende matriks metalloproteinaser (MMP), som har vist en potensiell rolle nedbrytning av bindevevet også i postmortal muskel (Purslow et al. 2012). Nylig er varierende aktivitet fra MMP-2 målt i ulike muskler og kan trolig forklare mørhetsvariasjonene forårsaket av bindevevet i musklene (Veiseth-Kent et al. 2018).

1.9 Eksogene enzymer bidrar til mørhet i kjøttstykker

Forbrukere oppgir mørhet som avgjørende egenskap ved valg av kjøttstykke (Boleman et al. 1997). Ulike muskler har forskjellig i mørhet, men inkonsekvent mørhet innenfor samme muskel skaper usikkerhet hos forbruker (Christensen et al. 2009). Tidligere ble mørhet oppnådd ved lagring i minst 14 dager (Lian et al. 2013), men proteaser fra planter og sopp har vist raskere og mer variert nedbrytning av myofibrill- og bindevevsproteiner (Han et al. 2009; Sullivan & Calkins 2010). Amerikanske myndigheter har fastsatt hvilke eksogene enzymer som trygt kan benyttes i matlaging, deriblant mange cystein og aspartyl proteaser (FDA 1999).

Eksogene enzymer må etterligne forandringer i post mortem muskelcelle og være tilgjengelige til cytoskjelett proteiner i myofibrill for å kunne gi effekt (Lian et al. 2013). Videre burde enzymene ha spesifisitet for å bryte ned kollagen eller elastin (Marques et al. 2010) som bidrar til seighet. Effekten til eksogene enzymer kan forekomme under lagringsperioden (Resources 2009) eller etter varmebehandling avhengig av betingelsene til enzymet (Marques et al. 2010).

Tilførsel av eksogene enzymer foregår via infusjon, marinering eller injeksjon (Bernard et al. 2007). Marinering eller injeksjon utføres på post mortem muskel, enten som marinade eller injeksjon ved hjelp av sprøyter. Ved infusjon blir marinaden direkte innført i blodomløpet pre-rigor. Denne teknikken er forbudt i Norge grunnet helserisiko for dyret og potensiell kontaminasjon i kjøttet. Enzymene forekommer som pulver eller væske, men blir uansett tilsatt løsning av vann, fosfat og salt, hvor vannet kun er bærer for enzymet. Fosfat

interagerer med proteiner i muskelstrukturen, dermed forblir væsken på innsiden av kjøttet ved varmebehandling, mens salt bidrar til å fordele marinaden bedre i kjøttet (Alvarado & McKee 2007).

1.10. Proteaser

Proteiner blir brutt ned til peptider og aminosyrer av proteaser. Enzymene katalyserer spaltningen av terminale aminosyrer eller visse peptidbindinger inne i proteinkjeden. Enzymatisk aktivitet krever folding av proteasene til tredimensjonal struktur da katalytiske aminosyrer ofte ligger langt fra hverandre i primær sekvensen, men aminosyrene blir fysisk nærme hverandre etter folding. Proteaser har varierende substrat spesifisitet som fører til ulik nedbrytning av proteiner, grunnet forskjellige preferanser til aminosyresekvensen i substratet som må passe inn i det aktive setet til enzymet.

De fleste eksogene proteaser fra planter eller sopp blir injisert i aktiv form for å gi mulige effekter på mørning av kjøtt (Bekhit et al. 2014). I denne masteroppgaven er aktinidin (EC 3.4.22.14), en cystein protease fra moden kiwifrukt (Resources 2009) og Exocut-RM (Tail21), en aspartyl protease fra soppen *Rhizomucor miehei* (RM) tilført i ulike deler av muskelen (Personlig kommunikasjon, Rødbotten, 2018, Nofima).

1.10.1 Cystein proteaser

Cystein proteaser er endopeptidaser som katalyserer spaltningen av peptidbindinger til ulike aminosyrer inne i proteinkjeden. Cystein subfamilien papain-lignende proteaser (C1.A) inkluderer enzymene papain (papaya), brommelin (ananas), fikin (fiken), zingibain (ingefær) og aktinidin (kiwifrukt) (Rawlings et al. 2018). Enzymene har lik folding av sekundærstruktur og benytter tilsvarende reaksjonsmekanisme (Kamphuis et al. 1985) fordi samme katalytiske aminosyrer forekommer i det aktive sete for hele subfamilien (Boland 2013). Essensielt for enzymatisk aktivitet til sub-familien er dannelse av reaktivt thiolat/imidazolium (Cys-S-/His-Im+) ione par i det aktive setet mellom de to adskilte domenene (Verma et al. 2016).

Til tross for lik mekanisme har cystein proteasene vist ulik effekt på nedbrytning av myofibrill og bindevevsproteiner (Bekhit et al. 2014; Sullivan & Calkins 2010). Papain har vist god effekt på elastin og fibrillproteiner som aktin, myosin, titin og nebulin (Ha et al. 2012), men påvirker saftighet og konsistens negativt (Calkins & Sullivan 2007). Derimot har brommelin

god effekt på kollagen, mens fikin gav den mest balanserte nedbrytning både av myofibrillproteiner og kollagen (Sullivan & Calkins 2010). Likevel er enzymene forbundet med overmørning av kjøtt overflaten grunnet spesifisitet for mange substrater (Ashie et al. 2002). Aktinidin har vist mildere mørningseffekter (Ha et al. 2012; Zhang et al. 2017), men hvilke peptidbindinger enzymet bryter ned er ukjent (BRENDA 2018). Av cystein proteasene viste zingibain best effekt på kollagen, men er den eneste avgir bitterhet og usmak i kjøttet (Ha et al. 2012).

1.10.2 Aspartat proteaser

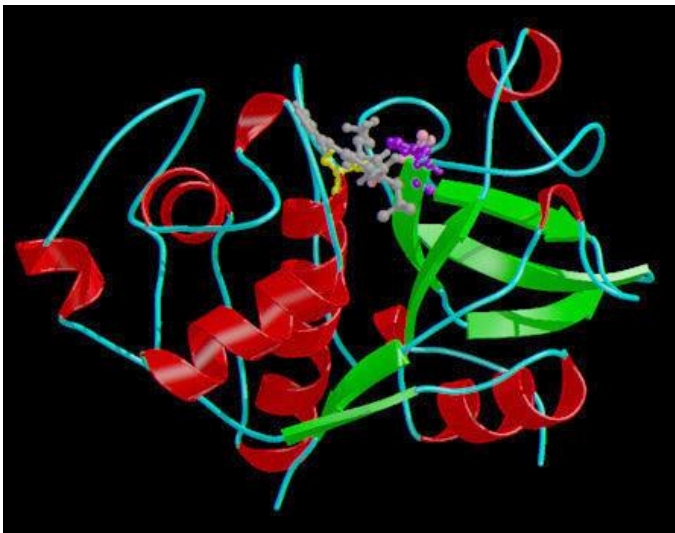
Proteaser ekstrahert fra fungi har vist større spesifisitet mot substratet enn proteaser fra planter (Sun et al. 2018), og kan bli ekstrahert ut uavhengig av sesong (Bekhit et al. 2014). Aspartat proteaser i pepsin-lignende subfamilie (A1.A) har tredimensjonale struktur liknende pepsin (Andreeva & Rumsh 2001), og består av inaktive endopeptidaser som blir aktive ved sure pH nivåer grunnet høy andel sure aminosyrer (Rawlings et al. 2018). Medlemmene i subfamilien inkluderer flere varianter av pepsin, katepsin D og E samt fungale proteaser, som *Aspergillus oryzae* og *Rhizomucor miehei*. Enzymene består av to identiske monomerer adskilt av en kløft med det katalytiske senteret (Yang et al. 1997). De katalytiske enzymene er to aspartat residues ansvarlig for aktivitet ved sure betingelser (Andreeva & Rumsh 2001). Aspartat proteaser kløyver spesifikt peptidbindingen til aminosyrer med store hydrofobe sidekjeder som fenylalanin, metionin, tryptofan og trolig også leucine og isoleucine (Ichishima 2004).

Studier på mørningseffekt ved bruk av aspartat proteaser er nesten utelukkende på *Aspergillus oryzae*, men nylig viste behandling med *Rhizomucor miehei* forbedret mørhet i grisekjøtt (Sun et al. 2018). Amerikanske myndigheter har ansett proteaser fra *Aspergillus oryzae* som trygg i matlaging (FDA 1999). Enzymet er aktivt ved sure pH betingelser og temperatur opp til 60 °C (Ashie et al. 2002). Måling av skjærekrefter viste forbedret mørhet (Ashie et al. 2002; Pietrasik & Shand 2011), og hverken usmak eller grøtete tekstur grunnet selvbegrensende proteolytisk aktivitet (Calkins & Sullivan 2007). *Aspergillus oryzae* har vist moderat hydrolyse på myofibrillproteiner (Ashie et al. 2002), men ingen effekt på løselighet (Calkins & Sullivan 2007) eller nedbrytning av kollagen (Pietrasik & Shand 2011).

1.11 Aktinidin

Aktinidin er et eksogent proteolytisk enzym ekstrahert fra moden kiwifrukt (*Actinidia deliciosa*). Seks ulike cystein proteaser utgjør aktinidin (Sugiyama et al. 1996), og en thiol gruppe er essensiell for aktiviteten (Pastorello et al. 1998). Derfor tilhører enzymet cystein proteaser, og har tilsvarende mekanisme som øvrige medlemmer i peptidase subfamilie papain. Den biologiske rollen til cystein proteaser i planter er ukjent, men aktinidin beskytter trolig frukten fra patogene mikroorganismer under modning (Boland 2013). Kiwifrukt blir konsumert over hele verden, og blir vurdert av amerikanske myndigheter til å være trygg i matlaging (FDA 2018). Flere studier har vist at aktinidin bidrar til mørere kjøtt ved å bryte ned myofibrillproteiner og har kollagenase aktivitet i bindevevet (Lewis & S. Luh 2007; Resources 2009; Sugiyama et al. 2005).

Aktinidin har to adskilte domener, der det aktive sete er lokalisert i kløften mellom domenene. Tilsvarende for papain er dannelse av reaktivt ionepar fra cystein (151) og histidin (288) kritisk for enzymatisk aktivitet i aktinidin (Rawlings et al. 2018) (Figur 8). Enzymet har tre insersjoner og en delesjon sammenlignet med papain (Kamphuis et al. 1985). Basert på foldingen og katalytiske egenskaper til aktinidin og papain har de trolig samme opphav og blir derfor klassifisert i samme familie.



Figur 8: Tredimensjonal struktur av det proteolytiske enzymet aktinidin ekstrahert fra kiwi frukt (*Actinidia deliciosa*). Enzymatiske aktiviteten skyldes dannelse av reaktivt ionisk par mellom cystein (gul) og histidin (lilla). Nærliggende Asn (rosa) til His orienterer imidazolium ringen i histidin for enzymatisk aktivitet. Hentet fra Rawlings, 2018.

Optimal aktivitet til enzymet forekommer ved tilstedeværelse av cystein og EDTA (Yamaguchi et al. 1982). Enzymet brukt i denne masteroppgaven er ekstrahert fra moden kiwifrukt og har vist aktivitet ned til 2 °C, men denaturerer ved 38 °C (Resources 2009).

Dermed gir enzymet effekt under lagringsprosessen og en studie med aktinidin enzymer vist aktivitet ni dager etter injeksjon i kjøttet (Christensen et al. 2009). Etter ekstraksjon ble fruktsaften homogenisert, ultrafiltrert og frysetørket for å fremstille et pulver bestående av aktinidinekstrakt og maltodextrin fra potet (Resources 2009). Maltodextrin fungerer som bæresubstrat for å stabilisere aktinidin. Produsenten har oppgitt optimal pH til 3,4-4,5, men det er påvist aktivitet helt til pH 8,5, tilsvarende pH-område for aktivitet er også vist i et annet studiet (McDowall 1970).

1.11.1 Effekt av aktinidin

Aktinidin har vist mildere mørningseffekt enn andre tradisjonelle cystein proteaser fra papaya, ananas og fiken (Sullivan & Calkins 2010). Det har resultert i fast overflate uten å påvirke saftighet, smak eller tekstur (Christensen et al. 2009; Lewis & Luh 1988), som er kjente problemer for andre cystein proteaser. Dette tyder på at aktinidin har spesifikk nedbrytning av muskelproteinene som påvirker seighet (Lewis & Luh 1988). Proteolytiske effekt av aktinidin gav signifikant forbedret spisekvalitet ved tilførsel av 10 % kiwi ekstrakt fra *Actinidia chinensis* (Lee et al. 2010), og bryter ned både myofibrill- og bindevevsproteiner (Christensen et al. 2009; Toohey et al. 2011).

Flere studier har vist signifikant lavere skjærekrefter sammenlignet med kontroll ved injeksjon av kiwifrukt i kjøtt fra okse, (Christensen et al. 2009; Toohey et al. 2011), lam (Han et al. 2009), gris (Liu et al. 2011; Zhang et al. 2017) og kanin (Zhang et al. 2017). Aktinidin behandlet kjøtt ($2,8 \text{ g L}^{-1}$) lagret i to dager tilsvarte mørhetsnivået for kontroll kjøtt lagret i ni dager (Christensen et al. 2009), Han et. al (2009) gav samme konklusjon etter lagringstid i tre uker. Om minsket skjærekraft skyldes nedbrytning i myofibrill eller bindevev er ikke diskutert detaljert, men Sugiyama et. al (2005) oppgir i motsetning til Lewis et.al (1988) at reduksjonen skyldes endringer i bindevevet. I tillegg er renheten til aktinidin av betydning for effekt på skjærekrefter, der kun rensset aktinidin behandlet prøver gav signifikant effekt (Zhang et al. 2017).

Injeksjon av aktinidin viste klar nedbrytning av myosin (Christensen et al. 2009; Lewis & Luh 1988; Liu et al. 2011; Wada et al. 2002) med nye peptid fragmenter (Han et al. 2009), men også forandret ultrastruktur av aktin (Wada et al. 2002). Proteiner tilknyttet aktin filamentet, troponin I og T viste klar nedbrytning etter seks dager i lammeskrott behandlet med aktinidin (Han et al. 2009). Nabosarkomerer blir bundet sammen av desmin, ved tilsetning av

aktinidin ble proteinet signifikant nedbrutt (Han et al. 2009), og nedbrytningen økte ved store mengder (10 g L⁻¹) aktinidin (Christensen et al. 2009).

For bindevevsproteinene er nedbrytning av kollagen type I nøye studert i aktinidin behandlet ekstrakter og hele stykningsdeler. Tilførsel av aktinidin gav signifikant nedbrytning av kollagen type I (Ha et al. 2013b; Mostafaie et al. 2008; Sugiyama et al. 2005) og økte løseligheten av kollagen etter varmebehandling (Christensen et al. 2009; Wada et al. 2002) eller i rått kjøtt (Wada et al. 2004) sammenlignet med kontroll. Kollagen består av flere isoformer, og etter inkubering med kiwifrukt ble totalt kollagen nedbrutt til subenheter av α - og β kjeder (Wada et al. 2004), men β - og γ -kjeder ble også konvertert til α -kjeder etter behandling (Sugiyama et al. 2005). I et annet studiet av kollagen type I behandlet med rent aktinidin, ble uløselig kollagen ved pH 3 omdannet til subenheter av kollagen α -kjeder (Ohyama et al. 1997). Aktinidin benyttet i denne masteroppgaven har vist kollagenase aktivitet (Resources 2009), men studiene fra Sugiyama er trippel heliks domene intakt og dermed mangler kollagenase aktivitet (2005).

Litteraturen mangler informasjon om nedbrytning av assosierte bindevevsproteiner som dekorin og biglykan i kjøtt behandlet med aktinidin. Langtidssteking på lave temperaturer har vist å frigjøre kollagen relaterte peptider og tilførsel av kiwi bidrar til ytterligere oppløsning av bindevevet (Sugiyama et al. 2005). Enzymer fra kiwi eller selve kiwijuicen har vist å være effektiv i mørningsprosessen av myofibrill- og bindevevsproteiner. Tilførsel av kiwi kan fremskynde mørningen og dermed spare lagringsplass (Han et al. 2009).

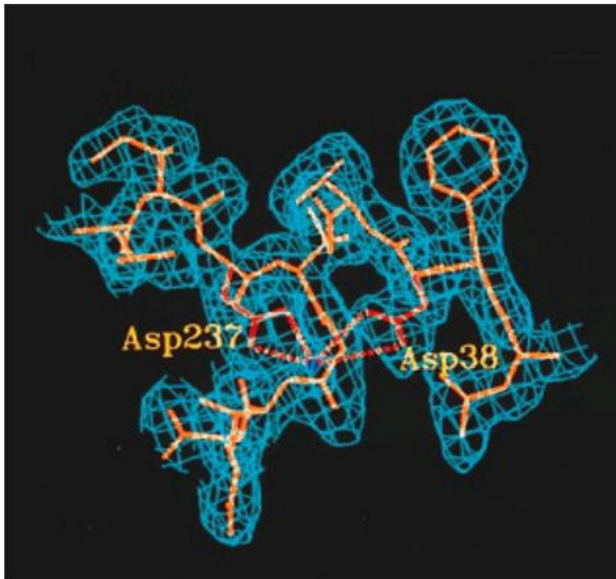
1.12 Exocut-RM

Enzymet Exocut-RM er termofil aspartisk protease produsert ved fermentering av soppen *Rhizomucor miehei* (RM) (Preetha & Boopathy 1997). Yang et al. (1997) klassifiserte enzymet i subfamilie A1.A, pepsin lignende proteaser, selv om sekvenssammenstillingen og den tredimensjonale strukturen er avvikende fra andre enzymer fra sopp og pattedyr i samme subfamilie. Amerikanske myndigheter har lenge klassifisert enzymer fra RM som trygt i produksjon av ost, men det har nylig blitt rapportert at enzymet også gir effekt ved mørning av kjøtt ved relativt lave konsentrasjoner (0,25 mg/100 g kjøtt) (Sun et al. 2018).

Aspartat proteaser viser normalt nedbrytning av kollagen (Ashie et al. 2002; Pietrasik & Shand 2011), men enzymer fra *Rhizomucor miehei* viste ingen aktivitet mot kollagen (Sun et

al. 2018). Optimal aktivitet til enzymet er antatt å være mellom pH 4,0- 5,5 (Preetha & Boopathy 1997; Sun et al. 2018). Proteaser i samme subfamilie har vanligvis optimal aktivitet i pH området 3,0 – 5,5 og er stabile innenfor surt til nøytralt pH område (Bekhit et al. 2014). Aktiviteten til enzymet er antatt å være optimal ved 55 °C (Sun et al. 2018) og proteolysen foregår etter varmebehandling av kjøttet.

Aktiviteten til enzymer fra *Rhizomucor miehei* er antatt å være tilsvarende som andre aspartat proteaser i subfamilien pepsin-lignende. Aspartat residuene er ansvarlig for aktivitet (Figur 9), den ene reaktivt, som gjennom nukleofilt angrep av aktivert vann molekyl gir kløyving av peptidbåndene i substratet (Andreeva & Rumsh 2001). Enzymet fra *Rhizomucor miehei* inneholder 361 aminosyrer, hvor de 22 første aminosyrene er signal peptid og 47 påfølgende aminosyrer utgjør et prosegment som gir aspartat proteaser riktig folding i modent enzym (Boel et al. 1986). Blant aspartat proteaser er enzymer fra RM av de mest glykosylerte, med to N-glykosylert seter (Boel et al. 1986) og fleksible karbohydratkjeder fungerer som varme reservoar er trolig årsaken til stabilitet selv ved høye temperaturer (Yang et al. 1997).



Figur 9: Tredimensjonal framstilling av det aktive setet til aspartat protease fra *Rhizomucor miehei*. Aspartat residuene som er essensielle for aktivitet er plassert i en kløft mellom to beta-sheets domener. Ett vann molekyl danner hydrogenbindinger mellom karboksylgruppene i aspartat residuene og blir deprotonert når substratet binder til det aktive setet. Hentet fra Yang, 1997

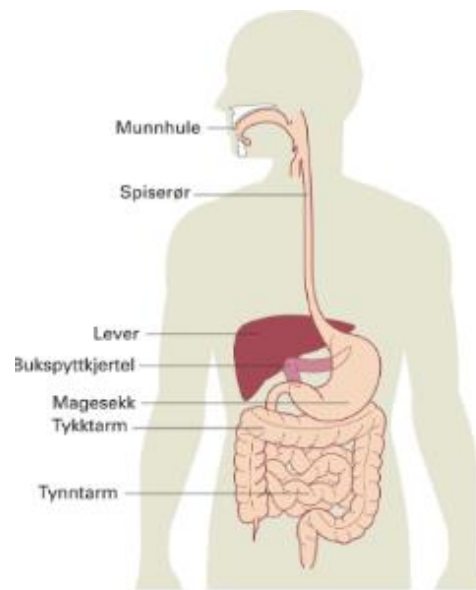
1.13 Fordøyelse av proteiner i *in vitro* modell

Fordøyelsessystemet skal sørge for optimalt opptak av alle næringsstoffer, og i denne masteroppgaven er hovedfokuset protein fordøyelse. Et protein er et polypeptid med spesifikk funksjon og struktur bygget opp av minst 50 enkeltamino-syrer. Under fordøyelse, nærmere bestemt proteolyse med pepsin og trypsin proteaser henholdsvis i magesekken og den øverste delen av tynntarmen, blir proteiner spaltet til peptider med varierende lengde og tilslutt frie aminosyrer (Sand et al. 2006). *In vitro* modellen utarbeidet av Minekus (2014) skal etterligne de fysiologiske betingelsene hos et friskt voksent menneske.

I den orale fasen blir maten tygget til akseptabel størrelse og blir bløtgjort av spyttet bestående av 99,5 % vann, 0,3 % proteiner og elektrolytter, til sammenhengende masse bolus (Saladin 2010). For å etterligne den orale fasen blir elektrolytter tilsatt i *in vitro* modellen, men proteinene i spyttet som α -amylase hadde komplisert modellen og er ubetydelig for protein fordøyelse.

Fra spiserøret kommer bolus ned i magesekken som har hovedfunksjon å levere fordøyd materiale porsjonsvis til duodenum, dermed blir duodenale fordøyelsen optimalisert. Innholdet blir knadd av peristaltiske bevegelser til en flytende masse, kymus og maten blir blandet med gastrisk jus av utskilte enzymer og saltsyre (Saladin 2010; Sand et al. 2006).

Surt miljø er bakteriedrepende, proteiner blir denaturert og gir optimale betingelser for det protein spaltende fordøyelsesenzymeret pepsin. Gastrisk tømning foregår gradvis over 3-4 timer til øverste del av tynntarmen, duodenum da er 20 % av proteinene spaltet til oligopeptider og mindre peptider (Minekus, M. et al. 2014). De minste peptidene er resistente til nedbrytning av tarm enzymene og blir direkte absorbert i jejunum, den lengste delen av tynntarmen hvor opptaket av næringsstoffer foregår (Sand et al. 2006).



Figur 10: Forenklet illustrasjon av hovedelementene i fordøyelsessystemet inkludert munnhule, spiserør, lever, bukspyttkjertel, magesekk, tynntarm og tykktarm. Proteiner blir brutt ned til polypeptider og oligopeptider i magesekken av pepsin, mens videre nedbrytning til mindre peptider og frie aminosyrer skjer i tynntarmen av pankreas enzymer. Hentet fra Sand 2006.

Tynntarmen hos mennesket er relativ lang (Pereira & Vicente 2013) og delvis nedbrutt materiale blir nøytralisert av bikarbonat og blandet med tarmsaft i duodenum. Tarmsaften inneholder pankreatin proteaser som trypsin og kymotrypsin (Sentandreu et al. 2002) i børstesømmen av tarmveggen. Peptidbindingene som gjenstår fra gastrisk fase blir spaltet inne i peptidkjeden for å danne biologisk aktive tri- og dipeptider, samt frie aminosyrer. Ved aktiv transport av membranproteiner blir peptidene og aminosyrene absorbert av intestinale epitelceller, for eventuelt å bli spaltet til frie aminosyrer inne i tarmcellene av cytoplasmapeptidaser (Rønning et al. 2016). Ufordøyde proteiner og peptider fra tynntarmen blir fermentert av tarmbakterier i tykktarmen til kortkjedet fettsyrer og ulike nitrogenforbindelser.

1.13.1 Effekter av fordøyelse med aktinidin tilstede

Proteinfordøyelse starter i magesekken, hvor pepsin hydrolyserer proteiner til oligopeptider av varierende størrelse. Måltider med store mengder proteiner kan føre til gastrointestinale plager som forstoppelse, ufordøyelig, oppblåsthet og overmetthet, men ved samtidig inntak av kiwifrukt er det rapportert om færre tarmrelaterte symptomer (Donaldson et al. 2014; Kaur & Boland 2013). Selv om aktinidin kan fremme allergiske reaksjoner (Pastorello et al. 1998) gir aktinidin økt gastrisk protein fordøyelse der større mengde fordøyd materiale entrer tynntarmen. Det ville vært etisk uforvarselig å måle gastrisk aktivitet hos mennesker (Donaldson et al. 2014), men *in vivo* studier er utført på dyr. Inntak av biffproteiner sammen med kiwi hos griser viste raskere gastrisk tømmehastighet enn normalt (Montoya et al. 2014), dermed kan kiwifrukt redusere følelsen av overmetthet og gastrisk ubehag ved inntak av proteinrikt måltid (Kaur & Boland 2013).

In vitro studier av biffproteiner tilført aktinidin viste 40 % økt gastrisk proteinfordøyelse, spesielt ble proteiner større enn 25 kDa signifikant brutt ned (Kaur et al. 2010a; Montoya et al. 2014). Mens i tynntarmen ble ingen forsterket endring av fordøyelsen observert (Kaur et al. 2010b). Proteaser fra kiwifrukt viste bedre aktivitet ved pH 3,1 sammenlignet med reelle pH i magesekken på 1,9 (Donaldson et al. 2014).

Aktinidin tilført biffproteiner gav ulikt og mer fragmentert peptidmønster sammenlignet med hydrolysen fra naturlige fordøyelsesenzymmer som pepsin, dermed gir aktinidin mindre spesifikk nedbrytning av peptidbindingene (Kaur et al. 2010a; Kaur et al. 2010b). Betydelig høyere gastrisk fordøyelse av MHC, β -aktinin, α -aktinin, aktin, MLC1 og troponin I er

observert ved tilstedeværelse av kiwi sammen med pepsin (Kaur et al. 2010a; Rutherford et al. 2011). Bindevevsproteinet kollagen viste derimot ingen effekt av aktinidin etter fordøyelse (Kaur et al. 2010a), trolig fordi et høyt innhold av de rigide aminosyrene proline og hydroksyprolin hindrer binding av enzymet i det aktive setet. Kollagen får en rigid struktur i pH området 3-7 fordi enzymer inkludert aktinidin ikke bryter ned trippel heliks domene (Sugiyama et al. 2005).

I tynntarmen varierer fysiologisk pH fra 6,4-7,4 og kiwifrukt viste liten effekt på forsterket fordøyelse av kjøtt proteiner (Donaldson et al. 2014). Tilstedeværelse av pankreatin proteaser som trypsin og kymotrypsin dekker muligens over effekten til aktinidin i tynntarmen, men hydrolyse ved aktinidin dannet andre peptider enn fordøyelse med tarm proteaser (Kaur & Boland 2013), og gir mulighet for dannelse av andre gunstige bioaktive peptider.

1.14 Peptider med mulig bioaktivitet

Inntak av proteiner kan føre til dannelse av peptider etter fordøyelse med varierende helsefremmende bioaktivitet på hjerte/kar-, immun- og tarmsystemet (Lafarga & Hayes 2014). Peptidene er inaktive innenfor opphavsproteinet, men blir frigjort av endogene enzymer under gastrointestinal fordøyelse (Di Bernardini et al. 2011) eller hydrolyse av eksogene enzymer kan fremkalle andre bioaktive peptider (Albenzio et al. 2017). Bioaktive peptider består av 2 til 30 aminosyrer (Bhat et al. 2015) og egenskapene avhenger av molekylmasse og aminosyresammensetning (Albenzio et al. 2017).

Aktivitet kan være påvist *in vitro*, men tilstrekkelig aktivitet i fordøyelseskanaalen krever høyere biotilgjengelighet (Albenzio et al. 2017). For å kunne gi *in vivo* helseeffekter må bioaktive peptider frigis ved rett tidspunkt i tarmen etter fordøyelse og entre blodbanen intakt i betydelig tilgjengelig dose (Lafarga & Hayes 2014). Peptidene kan dermed utøve fysiologisk effekter i tarmen eller andre steder i kroppen (Di Bernardini, 2011). Peptidene må samtidig være resistente mot endogen nedbrytning, som bestemmes av lengde og sammensetning.

1.14.1 Effekter av bioaktive peptider

Produksjonen av bioaktive peptid sekvenser fra protein hydrolysater utgjør et nytt forskningsområde med potensiell nytteverdi for helse, medisin og matindustri (Udenigwe &

Howard 2013). Mest omtalt er peptider med aktivitet mot ACE inhibering nyttig for blodtrykket og antioksidant effekt funnet i hydrolysater (Mazorra-Manzano et al. 2017). Fra muskelprotein hydrolysater er følgende *in vitro* effekter gunstige på patologiske tilstander funnet; antihypertensjon (Di Bernardini et al. 2012; Lafarga et al. 2016), antioksidant (Gu et al. 2012; Saiga et al. 2003; Sun et al. 2012), antitrombotisk (Shimizu et al. 2009), ACE-inhibering (Arihara et al. 2001; Gu et al. 2012; Ryan et al. 2011; Sun et al. 2018) og blodsukkerregulering (Yu et al. 2012; Zambrowicz et al. 2015). Enkelte peptider fra eggehvite (RVPSLM, KLPGF) (Yu et al. 2011; Yu et al. 2012) og sardin muskel (YYPL) (Matsui et al. 1999) er antatt å virke gunstig på blodsukkerregulering grunnet aminosyresammensetningen. Nedsatt blodsukkerregulering kan forårsake høyt blodtrykk og er en årsak til diabetes 2 (Helseinformatikk 2016). De siste 30 årene har tilfeller av diabetes 2 blitt tredoblet i Norge. Derfor støttes forskning til bruk av enzymer i utvikling av råvarer for å muligens fremkalle bioaktive peptider for forebygging eller tidlig behandling av blodsukkerregulering.

2. Målet med studien

Forekomsten av seigt kjøtt i Norge fører til stor andel prosessert kjøtt, men ved bruk av eksogene enzymer kan mørhet bli tilstrekkelig til å selge kjøttet som hele kjøttstykker og samtidig tilfredsstille kvalitetskravene til forbrukeren. Sammenhengen mellom inntak av prosessert kjøtt og kreft er tidligere påpekt, derfor vil inntak av hele kjøttstykker og mindre prosessert kjøtt være ønskelig. Tilfredstillelse av forbruker er essensielt og for å etterkomme kvalitetskravene er behovet for mørere kjøtt nødvendig. I tillegg er forbruker mer opptatt av egen helse enn tidligere, og eksogene enzymer kan bidra til å lette fordøyelse ved inntak av kjøtt og frigjøre andre helsegunstige bioaktive peptider.

Denne masteroppgaven er en del av «Sunn Mat» programmet ved forskningsinstitusjonen Nofima. Målet med forskningsprogrammet er å bidra med råvarer av høy kvalitet som kan tilfredsstille forbruker og øke forekomsten av helsegunstige komponenter fra den norske råvareproduksjonen. Derfor har følgende forskningsspørsmål blitt utarbeidet til denne masteroppgaven:

Overordnet forskningsspørsmål:

Kan proteolyse i kjøtt påvirke spisekvalitet, protein fordøyelse og dannelse av bioaktive peptider?

Dermed følger følgende under forskningsspørsmål:

- Undersøke graden av proteolyse i lårtunge behandlet med aktinidin fra kiwi eller Exocut-RM fra soppen *Rhizomucor miehei*
- På hvilken måte påvirker enzymbehandlet kjøtt spisekvalitet og fordøyelse i gastrisk- og intestinale fase
- Finnes det helsegunstige bioaktive peptider for blodsukkerregulering i kjøtt behandlet med aktinidin fra kiwi eller Exocut-RM fra soppen *Rhizomucor miehei*

3. Materialer

Alt utstyr, instrumenter, programvarer og kjemikaler som er brukt i de ulike forsøkene i denne masteroppgaven er vist under i tabeller tilhørende denne seksjonen.

3.1 Laboratorieutstyr og instrumenter

Underseksjonen viser tabeller over laboratorieutstyr (tabell 1) og instrumenter (tabell 2) benyttet i ulike forsøk kategorisert etter formål og tilhørende leverandør

Tabell 1: **Laboratorie utstyr.** Diverse laboratorie utstyr som ble brukt i de ulike forsøkene er listet opp under i kategorier med tilhørende leverandør.

Kategori	Utstyr	Leverandør
Filtreringsutstyr	BD Plastipak™ Concentric Luer-Slip Three-Piece Syringe (300185)	Fisher Scientific
	Fine-Ject® 4710008050	Henke-Sass Wolf
	Millex® HV Sterile Syringe Filter with Durapore® PVDF Membrane, 0.45µm (MIL- SLHV033RB)	Merck KGaA
	Millex®-GS Syringe Filter Unit, 0.22 µm (SLGSV255F)	Merck KGaA
	Millipak® 40 Gamma Gold Filter (MPGL04GK2)	Merck KGaA
Geler	NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Gel (NP0322BOX)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
	NuPAGE™ 10 % Bis-Tris Gel	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Glass utstyr	Begerglass	VWR
	Målekolbe	Duran
	Målesylinder	Duran Silber brand
	Pyrex glassflaske	Duran brand
	Warner Bratzler skjære mal	Selvlaget Nofima
Pipetter	Automated Single Channel Pipettes	Thermo Fisher Scientific
	Picus® electronic pipette	Sartorius
	Quality Pipette tips	Starstedt Ag & Co

Kategori	Utstyr	Leverandør
Rør og plater	Eppendorfrør (211-0015)	VWR International
	Microplate 96 well, PS F-bottom clear sterile (655161)	Greiner bio-one
	Precellys® CK28 Lysing Kit, Hard Tissue Homogenizing	Bertin Technologies
	Tube 15 ml, 120x17 mm (62.554.502)	Sartedt AG&Co.KG
	Tube 50 ml, 114x28 mm (62.547.254)	Sartedt AG&Co.KG
	Vials N11 (702016)	Macherey-nagel GmbH &Co.KG
Øvrig	Aluminum Micro Weighing Dishes .35 ml	VWR International
	BioSep-SEC-s2000 kolonne	Phenomenex
	Blotting roller	Thermo Fisher Scientific
	Chromacol 11-AC7	Thermo Fisher Scientific
	S&S Rundfilter, 185 mm (300114)	Schleicher & Schull GmbH
	Stainless Steel Surgical blades	Swann-Morton
	Quantum® EX Polishing Cartridge (QTUM000EX-M)	Merck KGaA

Tabell 2: **Instrumenter.** De ulike instrumentene med tilhørende leverandør som ble brukt i forsøkene i denne masteroppgaven.

Kategori	Instrument	Leverandør
Generelle	Fryser, -20 °C	Bosch
	Forma 700 series, -80°C	Thermo Fisher
	iBlot™	Invitrogen
	Kjøleskap, 4°C	Bosch
	pHM210 Std PH Meter	MeterLab® Radiometer analytical
	pH7110	inoLab WTW
	PowerEase 500	Invitrogen
	Magnetic hotplate stirrer, RCT classic IKAMAG®	IKA®

Kategori	Instrument	Leverandør
	Milli-Q® Direct 16 Water Purification System	Merck KGaA
	Quick Mini Chopper 6720	OBH Nordic
Inkubator og ristere	HS501 digital	IKA Labortechnik
	Innova® 40 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific
	MS1 Minishaker	IKA®
	Precellys Evolution	Bertin Technologies
	See-saw rocker SSL4	Stuart
Sentrifuge	Heraeus Multifuge 4KR Centrifuge	Kendro Laboratory products
	Micro star 17	VWR
Skanner	Epson Perfection 4990 Photo	Epson
	Ettan™ DIGE Imager 1.0	GE Healthcare
	GBox	Syngene
Vannbad	Vannbad GFL® 1086, 95°C	A/S E. Pedersen & Sønn laborieutstyr
	Vannbad GFL® 1083, 37 °C	A/S E. Pedersen & Sønn laborieutstyr
	Sub Aqua 5, 50°C	Grant Instruments
Vekt	Delta Range® AG204	METTLER TOLEDO
	Delta Range® PG5002-S	METTLER TOLEDO
	Mikrovekt, Mettler MT5	Mettler
Øvrige	Electromechanical testing system, 5940 Series Single Column Table Frames	Instron
	Agilent 1200 Series, HPLC	Agilent Technologies
	Synergy HI microplate reader	BioTek

3.2 Programvarer

Tabell 3 viser programvarene med tilhørende leverandør som ble benyttet i gjennomføringen av de ulike forsøkene i denne masteroppgaven.

Tabell 3: **Programvarer.** De ulike programvarene som ble brukt i de ulike forsøkene i denne masteroppgaven.

Programvare	Leverandør
Bluehill 3 Testing Software	Instron
Epson Perfection 4990 Photo	Epson
Ettan™ DIGE Imager 1.0	GE Healthcare
Gen 5.302	Biotek Instruments
GenSys V.1.5.6.0	Syngene
ImageQuant TL 7.0	GE Healthcare
Microsoft Excel	Microsoft
Minitab® Statistical Software 18	Minitab
OpenLab, 2014	Agilent Technologies

3.3 Kjemikaler og reagenser

Seksjonen viser tabeller over kjemikaler og reagenser (tabell 4) med tilhørende katalognummer og leverandør, mens kit som ble brukt i denne masteroppgaven er vist i tabell 5.

Tabell 4: **Kjemikaler og reagenser.** De ulike kjemikalene og reagensene med tilhørende katalognummer og leverandør som ble benyttet i gjennomføringen av forsøkene i denne masteroppgaven.

Kjemikaler og reagenser	Katalognummer	Leverandør
4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside	N1377-1G	Sigma-Aldrich
α -glukosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	G5003-1KU	Sigma-Aldrich
Acetic acid	1.00063.2500	Merck KGaA
Acetonitrile	1.00030.2500	Merck KGaA
Acorbose	A8980-1G	Sigma-Aldrich

Kjemikaler og reagenser	Katalognummer	Leverandør
Albumin from chicken egg white	A7641	Sigma-Aldrich
Angiotensin II human	A9525	Sigma-Aldrich
Aprotinin from bovine lung	A1153	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin	A3608	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin Stock	23209	Thermo Fisher Scientific
Bradykinin Fragment 1-7	B1651	Sigma-Aldrich
Bromophenol blue indicator	1.08122.0005	Merck KGaA
CaCl ₂ (H ₂ O)	1.02382.0500	Merck KGaA
Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes	C3934	Sigma-Aldrich
Coomassie brilliant blue R-250	IC821616	VWR
Cytochrome c from bovine heart	C2037	Sigma-Aldrich
[D-Ala ²]-Leucine enkephalin	E5008	Sigma-Aldrich
dH ₂ O		Millipore
Dithiothreitol (DTT)	R0861	Thermo Fisher Scientific
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	6381-92-6	Merck KGaA
ELC™ Plex Fluorescens Rainbow marker, Full range	RPN850E	GE Healthcare
ELC Prime™ Blocking agent	RPN418V	GE Healthcare UK Limited
Exocut-RM	Tail21	Tailorzyme Aps
Glycerol 85 %	1.04094.2500	Merck KGaA
HCl	1.00317.2500	Merck KGaA
Insulin Chain B Oxidized from bovine pancreas	I6383	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	1.04873.1000	Merck.KGaA
KCl	1.04936.1000	Merck KGaA
Kiwifriut powder extract	OT1005X (34123)	CRNZ, New Zealand
Lysozyme	10837059001	Sigma-Aldrich

Kjemikaler og reagenser	Katalognummer	Leverandør
Methanol	1.06009.4000	Merck KGaA
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	M2670-100G	Sigma-Aldrich
Milli-Q® Type 1 Ultrapure Water Systems		
NaCl	1.06404.1000	Merck KGaA
NaHCO ₃	27775.293	VWR Prolabs® Chemicals
NaH ₂ PO ₄	1.06586.0500	Merck KGaA
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.06346.1000	Merck KGaA
NaN ₃	1.06688.0250	Merck KGaA
NaOH	1.06462.1000	Merck KGaA
Na ₅ P ₃ O ₁₀	72061-500G	Sigma-Aldrich
(NH ₄) ₂ CO ₃	207861-500G	Sigma-Aldrich
NuPAGE® MPOS SDS Running buffer (20x)	NP0001	Novex by Life Technologies
Pancreatin from porcine pancreas	P1750	Sigma-Aldrich
Pepsin from porcine gastric mucosa	P7000	Sigma-Aldrich
PBS Tablets (1 tablett i 1 L vann gir 0,14 M NaCl, 0,0027 M KCl og 0,010 M Fosfat buffer pH 7.4)	09-9400-100	Medicago AB
Renin Substrate Tetradecapeptide porcine	R8129	Sigma-Aldrich
SDS	1610302	Bio-Rad
Trifluoroacetic acid	302031-M	Merck KGaA
Trizma® Base	T1503	Sigma-Aldrich
Tryptophan	PHR1176	Sigma-Aldrich
Tween® 20	P1379	Sigma-Aldrich
Val-Tyr-Val	V8376	Sigma-Aldrich

Tabell 5 viser kitene som ble benyttet i gjennomføring av forsøkene, med innholdet og tilhørende leverandør.

Tabell 5: **Kit.** De ulike kittene som ble brukt i forsøkene i denne masteroppgaven.

Kit	Innhold	Leverandør
DC Protein assay (500-0116)	-Reagens A, alkali kobber tartrat løsning - Reagens B, fortynnet Folin reagens - Reagens S	Bio-Rad
iBlot™ Transfer Stack, nitrocellulose, regular (IB301001)	iBlot® NC Anode Stack BOTTOM Regular iBlot® Cathode Stack TOP Regular iBlot® Filter Paper Regular iBlot® Disposable Spong Blotting Roller	Thermo Fisher Scientific

3.4 Antistoff

Seksjonen viser tabeller for primære (tabell 6) og sekundære (tabell 7) antistoffer brukt i western blott forsøk. I tabell 6 og 7 er antistoff ID (Saper 2011), leverandør og fortynningen som ble brukt i forsøket inkludert.

Tabell 6: **Primære antistoff til western blott.** Primære antistoff benyttet i western blott analyse med tilhørende antistoff ID og leverandør. Fortynningen som ble benyttet for de ulike antistoffene er også inkludert.

Primære Antistoff	Vert	Antistoff ID	Leverandør	Fortynning
Goat pAb to Biglycan	Geit	AB_58562	abCam	1:1000
JLT12-s (Troponin T)	Mus	AB_2618103	DSHB	1:2000
MF20	Mus	AB_2147781	DSHB	1:1000
Rb pAb to Collagen I	Kanin	AB_34710	abCam	1:1500
Shp pAb to Decorin	Sau	AB_35378	abCam	1:1000
T14	Mus	AB_531865	DSHB	1:1000

Tabell 7: **Sekundære antistoff til western blott.** Sekundære antistoff benyttet til western blott analyse med tilhørende antistoff ID og leverandør. Fortynninger som ble benyttet for de ulike antistoffene er også inkludert.

Sekundære Antistoff	Vert	Antistoff ID	Leverandør	Fortynning
Alexa Flour® 488 donkey anti-sheep IgG (H+L)	Esel	Ab_2534082	Life Technologies	1:2500
DyLight™ 549 conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+i). Fortynnet 1:2 i glyserol	Esel	AB_2340427	Jackson ImmunoResearch	1:2500
ECL™Plex goat-α-mouse IgG, Cy™3	Geit	AB_772196	GE Healthcare	1:2500
ELC™Plex goat- α-rabbit IgG Cy™5	Geit	AB_772205	GE Healthcare	1:2500

3.5 Løsninger

Seksjonen viser tabeller for tillaging av løsninger som ble benyttet i ulike buffer. Tabell 8 viser innholdet for å lage 1,5 M Tris som ble brukt i proteindenatureringsbuffer. For tillaging ble Tris løst opp i vann ved hjelp av magnetrører og pH ble justert til 6,8 med HCl. Den nødvendige mengden dH₂O ble tilsatt til 100 ml og løsningen ble lagret ved 4 °C.

Tabell 8: **Innhold i 1,5 M Tris med pH 6,8 til proteindenatureringsbuffer.**

Kjemikaler	Mengde
Tris	18,171 g
HCl	Juster til pH 6,8
dH ₂ O	Nødvendig mengde til 100mL

Tabell 9 viser innhold for å lage 10 % SDS løsning. Pulver bestående av SDS ble løst opp i vann ved hjelp av magnetrører og nødvendig mengde dH₂O ble tilsatt til 500 ml, løsningen ble lagret ved romtemperatur.

Tabell 9: *Innhold i 10 %-SDS løsnning.*

Kjemikaler	Mengde
Sodium dodecyl sulfate	50 g
dH ₂ O	Nødvendig mengde til 500mL

Tabell 10 viser innhold til 0,8 % bromofenol løsnning. Pulver av bromofenol ble løst opp i vann ved hjelp av magnetrører og nødvendig mengde dH₂O ble tilsatt til 50 ml, løsnningen ble lagret ved romtemperatur.

Tabell 10: *Innhold i 0,8 %-Bromofenol løsnning.*

Kjemikaler	Mengde
Bromofenol	400 mg
dH ₂ O	Nødvendig mengde til 50mL

4. Metodeprinsipper og prosedyrer

4.1 Tillaging av marinade

Marinade benyttes for å forbedre smak, saftighet og mørhet i tilberedt kjøtt (Bekhit et al. 2014). Marinade består oftest av vann, salt og alkalisk fosfat. I denne masteroppgaven har enzymene OT-1005X (aktinidin) og Exocut-RM blitt løst opp hver for seg i marinaden. Enzymene er eksogene og er isolert fra henholdsvis kiwifrukt og soppen *Rhizomucor miehei*.

Utstyr:

- Exocut-RM enzym fra Tailorzyme Asp
- OT-1005X (aktinidin) enzym fra CRNZ, New Zealand
- Magnetrører
- pH-meter
- Kjemikaler; $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, NaCl, dH_2O ,
- NaOH og HCl

Løsninger med to enzymer, OT-1005X (aktinidin) og Exocut-RM ble laget for innsprøyting i kjøttet. Først ble det laget seks liter marinadeløsning bestående av 3 % v/v $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, 2 % v/v NaCl og dH_2O , løsningen ble justert til pH 8,4 ved bruk av 1 M HCl og 1 M NaOH avhengig av start pH. To liter av denne marinadeløsningen ble benyttet som kontroll marinade. Ett enzymatisk produkt OT-1005X, bestående av aktinidinekstrakt og hjelpestoffet maltodextrin, ble tilsatt i to liter marinadeløsning. Sluttkonsentrasjonen tilsvarte 0,5 % for enzymløsningen. Produsenten oppgir at enzymet har optimal pH ved 3,4-4,5, men er aktivt helt til pH 8,5. I tillegg denaturerer dette enzymet ved 38 °C og har vist aktivitet helt ned til 2 °C (Resources 2009). De resterende to liter av marinadeløsningen ble tilsatt enzymet Exocut-RM. Sluttkonsentrasjonen utgjorde også 0,5 % for denne enzymløsningen. Produktet har aktive cystein proteaser isolert fra soppen *Rhizomucor miehei*. Optimale betingelser for enzymet er ukjent, men basert på andre studier med Exocut-RM er optimal pH antatt til 5,5 og temperaturoptimum til 55 °C (Sun et al. 2018).

4.2 Råvarer og marinerings

Eksogene enzymer fra planter og sopp har vist å forbedre mørhet i seigt kjøtt (Han et al. 2009). Injeksjon av marinade tillater eksakt dosering og jevn fordeling uten å ødelegge strukturen til muskelfibre eller bindevev (Xargayó et al. 2001). Kjøttet ble rotert manuelt og marinadeløsningene ble sprøytet inn systematisk for jevn fordeling. Risikoen ved innsprøyting i kjøttet må vurderes. Minstekravet er rent utstyr, hansker og sterile sprøytespisser for å tillage et trygt produkt (Brooks 2007).

Utstyr:

- Hel *Semitendinosus muskel* (lårtunge) fra 17 måneder gammel krysning av storfe kjøpt hos slakter
- Marineringsløsninger beskrevet i avsnitt 4.1 (en vanlig marinade, en tilsatt aktinidin og en tilsatt Exocut-RM)
- Sterile sprøyter
- Kniv
- Skjærebrett
- Maskin til vakuumpakning

Semitendinosus muskel fra 10 unge okser, omtrent 17 måneder gamle kjøpt hos slakter utgjorde materialet til denne masteroppgaven. Hele muskelen hadde blitt oppbevart ved 4 °C i åtte dager post mortem før kjøttet ble kuttet i tre like store deler av 10 cm brede stykker. Løsninger tilsvarende 10 % av vekten til kjøttet, ble rotert manuelt og injisert systematisk i kjøttet ved romtemperatur. Marinert kjøtt ble skåret i biter 3x10x5 cm før vakuumpakning og oppbevart ved 4 °C i syv dager før videre analyser. Heretter omtales kjøtt sprøytet inn med vanlig marinade som «kontroll», OT-1005X som «aktinidin» og Exocut-RM (Tail21) som «Exocut-RM».

4.3 Warner Bratzler skjærekraft

Warner Bratzler skjærekraft er en mekanisk målemetode for å evaluere mørhet i biff, og er dokumentert å være korrelert med sensorisk analyse av mørhet (Instron 2005). Kjøttet varmebehandles og blir nedkjølt til romtemperatur før det skjæres langs muskelens fiberretning til kuber. For et representativt utvalg må prøvene skjæres ut fra omtrent samme

sted i muskelen og unngå områder med store bindevevsstrukturer. Måling av Warner Bratzler skjærekrefter blir utført av et V-formet blad som skjærer med konstant hastighet på tvers av muskelfiberen. Vevet som måles blir fullstendig deformert og motstanden blir uttrykt i maksimal kraft (målt i N/cm²). Denne kraften reflekterer seigheten i kjøttprøven.

Utstyr dag 1:

- Vakuumpakket kjøttbiter fra *Semitendinosus* muskel injisert med vanlig marinade, aktinidin eller Exocut-RM
- Vannbad justert til 70 °C
- Isbad

Utførelse dag 1:

- Enzymbehandlet kjøttbiter oppbevart i vakuumposer ble varmebehandlet i vannbad ved 70 °C i 70 minutter.
- Etter varmebehandling ble kjøttbitene avkjølt i et isbad i 45 minutter.
- Kjøttbitene ble videre oppbevart ved 4 °C til dagen etter.

Utstyr dag 2:

- Varmebehandlet kjøttbiter fra dag 1 i vakuumposer
- Universell test maskin til skjærekraft (her Instron 5944) med tilhørende programvare
- V-formet knivblad
- Kniv og skjærebrett
- Warner Bratzler mal
- Quick Mini Chopper (her 6720 fra OBH Nordic)
- Minitab® Versjon 2018, Statistikk program

Utførelse dag 2:

- Kjøttbitene ble avkjølt til romtemperatur og skåret langs fiber retningen til kuber av 1x1x2 cm ved bruk av mal.
- For å få et representativt utvalg ble det skåret 10 paralleller av hver prøve.
- Instrumentet Instron 5944 ble innstilt på 2 kN for å måle skjærekraft.

- Prøvene ble samlet opp og kvernet hver for seg i mini kjøkkenmaskin før videre analyser.
- Gjennomsnitt verdiene til maksimal skjærekraft for de ulike prøvene ble sammenlignet med ANOVA for å teste signifikante forskjeller.

4.4 Protein ekstraksjon

Ved analyse av spesifikke næringsstoffer som proteiner er det nødvendig kun ha proteiner i løsningen. Derfor blir proteiner ekstrahert ut fra matriksen i vevet ved hjelp av mekanisk kraft og tilsatt buffere som hemmer Ca^{2+} for å hindre videre proteinnedbrytning fra proteaser i nærheten av kontraksjonsenheten. Materialet veies ut for å oppnå eksakt vekt og det tilsettes ekstraksjonsbuffer med pH 8,3. Bufferen inneholder Trisma® base som stabiliserer pH i kjøttet og EDTA som binder toverdige ioner. Dermed hemmes aktiviteten til enzymer i kjøttet som kalpain og katespiner. For kjøttprøver benyttes keramikkuler og typisk homogeniseringstid er 30 sekunder (Verollet 2008). Homogenisering ved mekanisk kraft gjør at celleveggen blir ødelagt, dermed frigjøres proteiner og nukleinsyrer fra vevsmatriksen. I homogenisert prøve er post-mortale pH variasjoner stabilisert, og tilsetter proteindenatureringsbuffer med pH 6,8, som er nærmere pH i postmortal muskel. Denne bufferen inneholder også EDTA og Trisma® base, i tillegg til SDS som denaturere proteinene og glyserol som gir tyngde til prøven. Prøvene varmebehandles for å sikre at proteinene blir denaturert og cellulært sediment løses opp. Deretter blir prøvene sentrifugert for at det uoppløste materialet danner pellet og det oppløste som er ekstrahert ut kan overføres til nye rør for videre analyse.

Utstyr:

- Skalpell og skjærebrett
- Vekt (måler mg)
- Eppendorfrør
- Precellys rør med keramikkuler
- Ekstraksjonsbuffer (Tris-EDTA) (tabell 11)
- Homogeniseringsmaskin
- Proteindenatureringsbuffer (tabell 12)
- Vannbad justert til 50 °C

- Bordsentrifuge
- -20 °C fryser

Utførelse:

- Kjøttet ble skåret i små biter med skalpell.
- 100 mg muskelprøve ble veid ut i Precellys rør med keramikkuler og tilsatt 1 ml kald Tris-EDTA ekstraksjonsbuffer med pH 8,3, beskrevet i tabell 11.
- Prøvene ble homogenisert ved 6000 RPM i 2 × 20 sekunder med 5 sekunder pause mellom seriene.
- Videre ble 500 µl av prøvene overført til et nytt eppendorfrør. Den pipetterte væsken var jevn og uten store bindevevsbiter. Det ble tilsatt 500 µl proteindenatureringsbuffer med pH 6,8 (tabell 12) og blandet godt ved å pipettere opp og ned.
- Prøvene ble plassert i vannbad 20 minutter ved 50 °C, deretter blandet og ytterligere 5 minutter i vannbadet.
- Deretter sentrifugert i 20 minutter ved 4 °C på 7800 x G.
- Tilslutt ble 800 µl supernatant overført til nytt eppendorfrør og fryst ved -20 °C.

Tabell 11: **Innhold i Tris-EDTA ekstraksjonsbuffer.** Kjemikalene og tilhørende mengder for å lage Tris-EDTA ekstraksjonsbuffer. Kjemikalene løses i vann og pH justeres til 8,3 ved hjelp av 1 M HCl. Volumet justeres til 1 liter med dH₂O.

Kjemikaler	Mengde
50 mM Tris	6,06 g
10 mM EDTA	3,72 g
dH ₂ O	Nødvendig mengde til 1 l

Tabell 12: **Innhold i proteindenatureringsbuffer.** Kjemikalene og tilhørende volum som trengs for å lage proteindenatureringsbuffer.

Kjemikaler	Volum
1,5 M Tris med pH 6,8 (tabell 8)	0,83 ml
10 % SDS	4,00 ml
87 % Glycerol	2,30 ml
dH ₂ O	0,87 ml

4.5 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon

Det benyttes en kolorimetrisk metode for å måle proteinkonsentrasjon, for å standardisere proteinkonsentrasjonen i prøvene før gel elektroforese (Mahmood & Yang 2012). Metoden baseres på at Commasie Brilliant Blue G-250 fargestoff binder proporsjonalt til proteinmengden og gir fargeutvikling (Bradford 1976). En løsning av natrium kalium tartrat stabiliserer Cu^{2+} og det utvikles gul farge forårsaket av en redoksreaksjon i komplekset. I kontakt med proteiner reduseres det gule fosfomolybdenkomplekset og blåfarge blir produsert. Intensitet til blåfargen er avhengig av mengden protein. Fargeutviklingen er stabil i 1 time og måles ved 750 nm, som er toppunktet for folin. Proteinkonsentrasjonen bestemmes ved hjelp av standardkurve med kjente konsentrasjoner for bovine serum albumin (BSA). Protokollen ble hentet fra BIORAD DC for 96 brønn mikroplate og er en modifisert versjon av Lowry et al. (1951).

Utstyr:

- Vannbad justert til 50 °C
- 96 brønn mikroplate
- BSA stokkløsning
- dH_2O
- Biorad DC protein assay kit
- Mikroplate leser med absorbans måler
- Elektroforese loadingbuffer med DTT og bromofenol
- Vortex

Utførelse:

- Prøvene ble tint og plassert 10 minutter i varmebad ved 50 °C.
- Varmebehandlet prøver ble fortynnet 1:10 med dH_2O . Standarder ble seriefortynnet fra 2 mg/ml BSA stokkløsning til 1, 0,5, 0,25 og 0 mg/ml.
- Reagens A' ble laget av 20 μl reagens S (5 % SDS) per 1 ml A (alkali kobber tartrat).
- Hver brønn i mikroplaten ble fylt med 5 μl standard/prøve, 25 μl av A' og 200 μl av reagens B (ferdig fortynnet folin reagens). Alle prøvene ble målt i triplikater for et troverdig resultat.

- Mikroplaten ble ristet i 5 sekunder på benk og deretter inkubert ved romtemperatur i 15 minutter før maskinavlesning. Absorbans ble avlest ved 750 nm av tilhørende programvare.
- Proteinkonsentrasjoner ble regnet ut ved hjelp av regresjonslikningen ($y = ax + b$) til standardkurven og absorbans til den respektive prøven. Standardkurven ble laget ved å blotte konsentrasjon av standardene mot tilhørende absorbans. Absorbans må ligge innenfor standardkurven for en valid proteinkonsentrasjon.

$$\text{Proteinkonsentrasjon} = \frac{\text{Absorbans} - b}{a}$$

Likningen gir proteinkonsentrasjon for fortynnet prøve, alle verdiene ble ganget med fortynningsfaktoren 10 for å finne konsentrasjon i en ufortynnet prøve.

- Prøvene ble fortynnet til 2 mg/ml med elektroforese loadingbuffer med DTT og bromofenol beskrevet i tabell 13. Nødvendig mengde buffer og prøve ble regnet ut ved hjelp av fortynningslikningen.

$$c_1v_1 = c_2v_2$$

- Etter fortynning ble vortex benyttet for å blande prøveinnholdet, deretter ble prøvene varmebehandling ved 50 °C i 10 minutter.

Tabell 13: **Innhold i elektroforese loadingbuffer med DTT og bromofenol.** Kjemikalene med tilhørende volum som er nødvendig for å lage elektroforese loadingbuffer med DTT og bromofenol brukt ved fortynning av prøvene før gel kjøring. Løsningen kan alikvoteres og fryses ned, ellers må løsningen lages fersk.

Kjemikal	Volum
Proteindenatureringsbuffer	8,00 ml
(tabell 12)	
1 M DTT	2 ml
0,8 % Bromofenol	0,5 ml

4.6 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE er en polyakrylamid gel elektroforese som benyttes for separering av proteiner. Proteiner separeres i et elektrisk felt etter molekylvekt gjennom matriksen under denaturerte betingelser.

Netto ladningen til proteinene vil påvirke bevegelsen i et elektrisk felt, derfor tilsettes

sodium dodecyl sulfat (SDS) som denaturerer proteiner i prøvene og buffer. Dermed får proteinene negativ ladning som er proporsjonal med proteinstørrelse, og sikrer at bevegelsen avhenger kun av molekylmasse. Bufferen i prøvene inneholder flere komponenter som hjelper elektroforesen. Dithiothreitol reduserer disulfidbroer som holder proteinet i tertiærstruktur og bromofenol som synliggjør vandringsene av proteinene. Prøvebufferen inneholder også glyserol som gir tyngde til prøvene for å enklere applisere prøvene på gel. I tillegg til prøvene appliseres en molekylvekt standard på gelen for å kunne estimere molekylvekt for de detekterte båndene.

I gradient gel øker akrylamid konsentrasjonen nedover og gir separasjonsområdet 15-260 kDA. Øverst er det 4 % akrylamid som separerer de største proteinene, mens 12 % akrylamid separerer middels og mindre proteiner (LifeTechnologies 2015). Denne graderingen er nyttig for kjøttprøver hvor proteinene har stor forskjell i molekylvektene. Nøytral pH gir bedre protein stabilitet og resulterer i skarpere bånd oppløsning, samt minimaliserer modifikasjoner i proteinene.

Når alle prøvene er applisert, settes en spenning over gelen. Dermed vandrer de negativt ladde protein-SDS kompleksene mot anoden. Proteinene vandrer i gelen etter størrelse og de minste vandrer lengst. Etter at proteinene er separert kan de detekteres med Commasie-farging eller identifisere enkeltproteiner ved immunofarging, for eksempel western blotting.

Utstyr:

- Vannbad justert til 50 °C
- NuPage geler (4-12 % eller 10 %)
- NuPage-MOPS SDS Runningbuffer
- dH₂O
- ECL PlexFluorescent Rainbow
- Elektroforese
- Gelkar
- Commasie farge buffer
- Vippe
- Avfargingsbuffer
- Skanner og tilhørende programvare

Utførelse:

- Ved SDS-PAGE ble prøvene tint og varmebehandlet ved 50 °C i 10 minutter. Gelene ble skylt med dH₂O og elementene i gelkammeret montert.
- Etter montering av gelkammeret ble 500 ml fortynnet runningbuffer tilsatt. Fortynnet runningbuffer ble laget av 25 ml NuPAGE-MOPS SDS Runningbuffer og 475 ml dH₂O.
- ECL PlexFluorescent Rainbow ble brukt som molekylvekt standard, 2 µl av standarden og 10 µl fortynnet prøve ble applisert i brønnene.
- Innstillingene for gel elektroforesen ble satt til 200 V, 125 mA og 25 W. Gelen skulle kjøres i 1 time eller til prøvene hadde nådd kobberet i karet, vandringen til proteinene ble indikert i blått av bromofenol.
- For å detektere alle proteinbåndene ble gelen farget med Commasie farge buffer i 1 time på vippe innstilt på 42 o/min. Commasie fargebuffer ble laget av 0,1 % Commasie, 50 % metanol, 7 % acetat og dH₂O.
- Det overflødig av farge ble skylt bort med dH₂O i gelkar, men ikke direkte på gelen før avfargingsbuffer ble tilsatt. Avfargingsbuffer ble laget av 20 % MeOH, 7 % HAc og dH₂O. Av fargning ble gjennomført i 2 timer på vippe innstilt på 42 o/min.
- Til slutt ble gelen godt skylt med dH₂O, samtlige detekterte proteinbånd vises på farget SDS-PAGE gel.
- Gelene ble oppbevart i dH₂O og kunne skannes.

4.7 Western blott

Western blotting brukes til å identifisere enkeltproteiner (Mahmood & Yang 2012).

Teknikken kalles også immunoblotting fordi antistoff brukes til å detektere spesifikt antigen i en blanding av proteiner (ThermoFisher 2015). Metoden krever flere trinn; SDS-gel elektroforese separerer proteinene, blotting av proteinbåndene til membran og blokkering av membranen. Videre tilsettes primært og deretter sekundært antistoff før membranen framkalles og bånd kan detekteres.

Først utføres en SDS-gel kjøring for å separere proteinene i prøven. Ved blotting i et tørt system, plasseres membran-gel sandwich mellom en gel matrix med ioner. Matriksen inneholder ione-reservoar med anode og katode buffere inkorporert i gelen, i tillegg til kobber elektrode som kreves for elektroforese. Når strøm tilføres systemet, beveges den

høye ionetettheten og proteinbåndene på gelen overføres til nitrocellulose membranen. Proteinene immobiliseres grunnet hydrofobiske interaksjoner med membranen, som har høy affinitet for proteiner. Binding av proteiner er uspesifikk og membranen inkuberes med blokkeringsløsning som binder setene på membranen. Ubundet reagenser vaskes bort gjentatte ganger med tris fosfat bufret saline (TPBS) og minimerer bakgrunnsstøyen. Når primært antistoff tilsettes vil det festes spesifikt til proteinets bindingssete. Det primære antistoffet gjenkjenner et spesifikt protein eller epitope på en gruppe proteiner, men påvises ved hjelp av fluorescens i det sekundære antistoffet. For å oppnå signal må det sekundære antistoffet være arts spesifikt og gjenkjenne subklassen til det primære antistoffet. Fluorescens signalet blir detektert av laser tilhørende en skanner. Intensiteten til det detekterte signalet fra protein-antistoff-antistoff komplekset er proporsjonalt til proteinmengden på membranen. De detekterte proteinbåndene kan kvantifiseres og beregne signifikante forskjeller ved hjelp statistiske metoder.

Tørrblotting ble utført ifølge prosedyre fra produsent (Thermofisher 2009), men en kort beskrivelse fremstilles her.

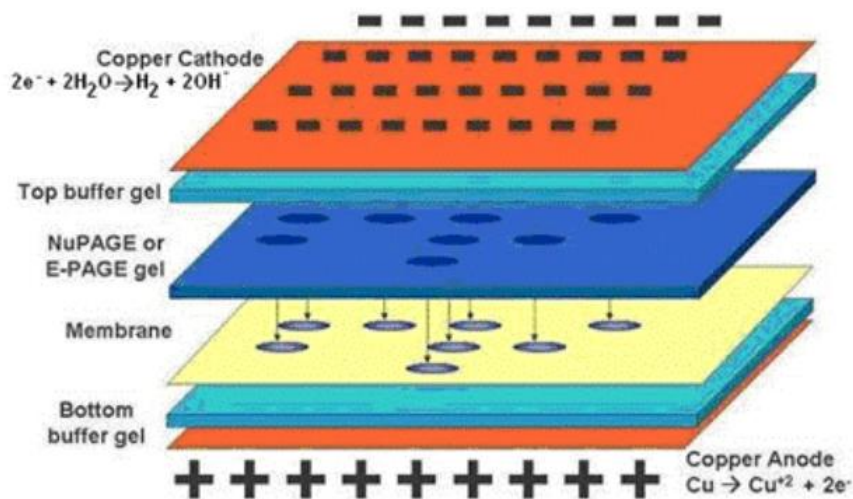
Utstyr dag 1:

- Gel kjørt etter SDS-PAGE prosedyre, men farging utelates (seksjon 4.6)
- iBlot™ Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Kit
- iBlot™
- dH₂O
- Blotting roller
- Blottingkar
- Blokkeringsløsning av ELC Prime™ Blocking agent
- Vippe

Utførelse dag 1:

- Proteinene har blitt separert ved gel elektroforese og konsentrasjonen av akrylamid i gelen er avhengig av hvilke proteiner som skal detekteres.

- Blottingen ble gjennomført med kittet iBlot™ Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, vist i figur 11, kittet inneholder alle nødvendige komponenter for å utføre blotting på iBlot™ maskin. iBlot™ Anode Stack ble lagt nederst i maskinen.
- Gelen ble deretter plassert med en sammenhengende bevegelse på membranen tilhørende iBlot™ Anode Stack, fordi proteiner kan begynne å feste seg til membranen idet gelen treffer.
- Et iBlot™ filterpapir ble fuktet med dH₂O for å beskytte interaksjoner med gelen. Tilhørende rulle ble brukt noen ganger over filterpapiret for å fjerne bobler.
- Deretter ble iBlot™ Catode Stack lagt over gelen med kobberelementene pekende oppover for å sikre strømtilførsel. Rullen ble brukt igjen ett par ganger over stabelen. Før lokket lukkes igjen ble iBlot™ Disposable Sponge lagt i toppen for å absorbere overflødig væske.
- Det ble brukt program 2 (23 Volt) som pågikk i 6 minutter.
- Membranen ble lagt i 2 % blokkeringsløsning (ELC Prime™ Blocking agent) fortynnet i TPBS (i utførelse dag 2), i 1 time på vippe med 32 osc/min eller over natt i kjøleskap.



Figur 11: Oppsett av iBlot™ gel sandwich. Proteinene er negativt ladet og vandrer til det positive ladet ione-reservoaret nederst i sandwichen. Membranen oppå tar dermed imot proteinene separert etter størrelse ved hjelp av SDS-kjøring. Et fuktet filterpapir legges over gelen for å beskytte gelen mot interaksjoner. For at strømmen skal gå gjennom systemet består det øverste ione-reservoaret av negative ladninger. Figur hentet fra Thermo Fisher, 2009.

Utstyr dag 2:

- Fosfat bufret saline (PBS)
- Tween 20
- Magnetrører
- Blottet og blokkert gel fra dag 1
- Vippe
- Primært antistoff
- Sekundært antistoff
- Filterpapir
- Skanner og tilhørende programvare

Utførelse dag 2:

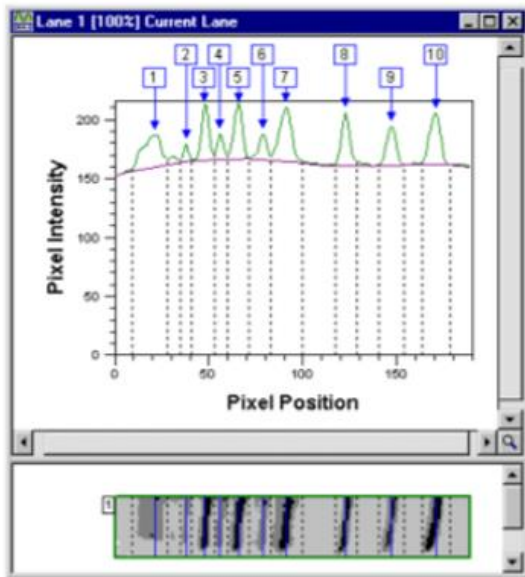
- Vaskebufferne ble laget av en tablett PBS løst i 1 liter dH₂O ved hjelp av magnetrører. 500 ml av denne løsningen ble bruk som PBS, mens resterende 500 ml ble tilsatt 500 µl Tween 20 og utgjorde TPBS.
- Membranen ble skylt og vasket i blottingkar liggende på vippe (32 o/min) med TPBS ved romtemperatur:
 - Skylt × 2 og vasket i 2 × 5 minutter
 - Inkubert med 15 ml primært antistoff i 90 minutter. Primært antistoff ble fortynnet i TPBS, fortynninger er vist i tabell 14.
 - Skylt × 2 og vasket i 2 × 5 minutter
 - Inkubert med 15 ml sekundært antistoff i 60 minutter. Sekundært antistoff ble fortynnet i TPBS, fortynninger er vist i tabell 14. Herifra ble membranen beskyttet mot lys av aluminiumsfolie.
 - Skylt × 3 og vasket i 4 × 5 minutter
- Tilslutt ble membranene vasket × 3 med PBS, og tørket på filterpapir i minst 45 minutter.
- Membranene ble avbildet av Ettan™ DIGE Imager eller GBox skanner. Programvaren til de ulike skannerne er henholdsvis Ettan™ DIGE Imager 1.0 og GenSys V.1.5.6.
- Filter i skanner ble valgt avhengig av det sekundære antistoffet på membranene.
- Bildet lagres som TIF fil for at kvantifiseringsprogrammet skal kunne åpne denne.

Tabell 14: **Primære og tilhørende sekundære antistoff.** Ved western blott analyse tilsettes primært antistoff som gjenkjenner epitope på et bestemt protein. For å påvise signal kreves fluorescens fra et sekundært antistoff som gjenkjenner subklassen til det primære antistoffet. Fortynningene som ble benyttet er inkludert for samtlige antistoff.

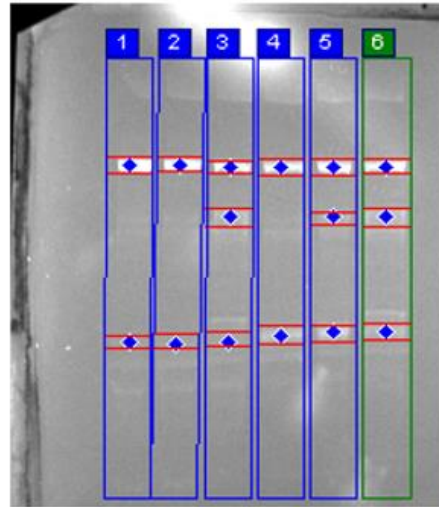
Primært antistoff	Fortynning	Tilhørende sekundært antistoff	Fortynning
Goat pAb to Biglycan	1:1000	Dylight 549	1:2500
JLT12-s (Troponin T)	1:2000	Cy TM 3	1:2500
MF20	1:1000	Cy TM 3	1:2500
Rb pAb to Collagen I	1:1500	Cy TM 5	1:2500
Shp pAb to Decorin	1:1000	Alexa488	1:2500
T14	1:1000	Cy TM 3	1:2500

4.8 Kvantifisering av bånd

Synlige fragmenter på western blott kan detekteres og kvantifiseres for å lete etter signifikante endringer fra kontroll til prøvene behandlet med enzymer. Kvantifisering foregår i tre trinn: avbildet membran, seleksjon av synlige fragmenter og at programvaren bestemmer optisk tetthet. Deteksjonssystemet genererer et to-dimensjonalt bilde. Antall ønsket baner som skal analyseres blir angitt under «Lane Creation» (Healthcare 2011). Ved å definere hele analyseområdet vil programvaren generere individuelle baner for analyse. Korreksjon av bakgrunnsstøy i bildet gjennomføres av rullende ball algoritme tilhørende programvaren. Den rullende ball algoritmen tolker hele bilde som en overflate, hvor optisk tetthet (OD) er dybden av denne overflaten. Deretter blir en ball med bestemt radius rullet over hvert punkt på hele overflaten. Desto mindre ballen, jo dypere faller den inn i hulrommene skapt av intensitet (Gassmann et al. 2009). Hvis ballen har større radius enn hulrommene vil ikke disse bli fjernet og mer bakgrunnsstøy er i bildet. Deretter lages profil for hver bane som viser piksel intensitet på y-aksen og piksel posisjon på x-aksen, de ulike toppene representerer fragmentene fra blottet. I neste trinn blir selekterte fragmenter på blottet detektert og videre avgrenset med horisontale linjer over og under området, disse blir omtalt som bånd.



B)



Figur 12: **Baneprofil og detekterte bånd.** Profil for hver bane viser de ulike toppene representerer fragmentene fra blottet, piksel intensitet vises på y-aksen og piksel posisjon vises på x-aksen (A). Selekterte fragmenter er detektert og avgrenset med horisontale linjer over og under området (B) dermed kan programvaren kan bestemme signal intensiteten. Hentet fra Healthcare, 2011

Innenfor de definerte kantene, båndarealet (mm^2) beregner programvaren mengden som piksel intensitet (INT) ved hjelp av densitometri, måling av optisk tetthet eller lysabsorpsjon. Dermed tillegges en tredje dimensjon som beskriver det avgitte kjemiluminescent signalet som en topp fra overflaten av blottet og ned i bildet. Signal intensiteten til et bånd blir målt som volum definert som $\text{INT} \times \text{mm}^2$. Intensiteten til pikslene varierer mellom bilder. For å kunne sammenligne kvantifiserte bånd fra ulike bilder må verdiene normaliseres ved båndvolum delt på total intensitet i analyseområdet.

Programvaren kan også beregne molekylstørrelse til båndene. En molekylvektstandard har kjente molekylstørrelser og appliseres i en bane. Som funksjon av bånd posisjon kalkulerer kalibreringskurven molekylstørrelse for båndene i de påsatte prøvene.

Utstyr:

- Skannet SDS-PAGE farget gel (seksjon 4.6) eller fra western blott (seksjon 4.7)
- Kvantifiseringsprogram, ImageQuant TL 7.0

Utførelse:

- Bildet av membranen (TIF fil) som skal analyseres ble åpnet i ImageQuant.
- Det ble valgt «Stepwise analysis» og analysen ble gjennomført med parameteren «Invert measurement». Antall ønsket baner som skulle analyseres ble angitt under «Lane Creation», en for hver prøve applisert. Ved å definere hele analyseområdet vil programvaren generere individuelle baner for videre analyse.
- Bakgrunnsstøy ble trukket fra automatisk med «rullende ball» metode etter standard fabrikk-innstillinger i programvaren.
- En profil for hver bane ble generert og viser intensitet av fragmentene. Ved deteksjon av bånd, måtte areal avgrensingen bli utført av en person da dette er basert på subjekt vurdering. Dermed beregnet programvaren signal intensiteten av båndet ($\text{INT} \times \text{mm}^2$), definert til båndvolum.
- Flere geler hadde samme antistoff, men piksel intensiteten varierte for hvert blott. Prøver fra ulike blott måtte normaliseres før sammenligning. Ett nytt bilde av samme blott ble generert, deretter detektert ett bånd avgrenset i hele det selekterte analyseområdet for å bestemme total intensiteten i bildet. Ved å dele båndvolumet fra ett individuelt bånd på total intensiteten i bildet blir relativ verdi for dette båndet beregnet.
- For å sjekke signifikante endringer mellom behandlingene ble statistikk analysene ANOVA og Tukey test benyttet.

4.9 *In vitro* fordøyelse

En forenklet *in vitro* modell utarbeidet av Minekus et.al (2014) simulerer fordøyelse i munn, magesekken og øverste del av tynntarmen med enzymer og elektrolyttløsninger basert på *in vivo* data og etterligner fordøyelsen av råvarer hos mennesket. Inntak av mat starter i munnhulen. Maten bløtes opp av spyttet og tygges for å danne en sammenhengende masse, kalt bolus som kan svelges. Størrelsen på en munnfull er individuelt, men modellen bruker ett gram kvernet mat for å representere råvaren og kunne utføre forsøket i laboratorieskala. Mengden mat til fordøyelsesvæsker, som lages av elektrolytter blir anbefalt til 50:50. Elektrolyttløsningen til den orale fasen skal etterligne spytt og består av natrium, kalium, kalsium, magnesium, fosfat og bikarbonat som løses opp i dH₂O. Munnen har nøytral pH og

derfor justeres elektrolyttløsningen til pH 7. *In vivo* er tyggetiden kort, men for å kunne reproducere modellen blir simuleringen anbefalt å vare i 2 minutter ved 37 °C, tilsvarende kroppstemperatur.

Fra spiserøret kommer bolus ned i magesekken, som bryter ned innholdet mekanisk og kjemisk. Innholdet fra spiserøret har nøytral pH og magesekken har pH rundt 2 mellom måltider. Ved inntak av måltid stiger pH i magesekken til rundt 5 grunnet buffer kapasiteten i maten. Funksjonene til magesekken fungerer best ved lav pH, og sekresjon av HCl senker pH til 2. Dermed er betingelsene for pepsin optimale, enzymet bryter ned proteiner til oligopeptider. I *in vitro* modellen ble derfor elektrolyttløsningene og væsken etter den orale fasen justert til pH 3 ved hjelp av 1 M HCl. Mekanisk nedbryting utføres av peristaltiske bølger *in vivo* og etterlignes av risteinkubator i modellen.

I den intestinale fasen blir det sure mageinnholdet nøytralisert av bikarbonat. Duodenum har pH rundt 6,5, men nivået avhenger av måltidet og gastrisk tømmehastighet. I den distale ileum øker pH til 7,5 og derfor anbefales pH 7 i elektrolyttløsningen for intestinale fasen. Elektrolyttløsningen og væsken etter den gastriske fasen justeres til pH 7 ved hjelp av NaOH. I tynntarmen brytes oligopeptider ned til mindre peptider og frie aminosyrer av pankreatin fra bukspyttet. Modellen benytter pankreatin fra gris som har alle de nødvendige enzymene, men enzymmengden er basert på aktiviteten til trypsin (100 U ml^{-1}). Enzymene bryter ned spesifikke peptidbindinger for å danne tri- og dipeptider samt frie aminosyrer som kan tas opp gjennom epitelet i tarmveggen. Det fordøyde materialet finnes i væskefasen, og sentrifugering separerer kun det uløselige materialet fra det som er løst opp.

Utstyr dag 1:

- Kjemikaler til elektrolyttløsninger for oral, gastrisk og intestinal fase
 - o KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ og NaCl
- Andre kjemikaler: $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, NaOH, HCl og dH_2O
- Liten kjøkkenmaskin
- Vekt (måler i mg)
- 50 mL rør

Utførelse dag 1:

- Elektrolyttløsningene ble laget (tabell 15) og kan oppbevares ved 4 °C inntil 4 uker. I tillegg ble det laget $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ løsning med 44.1 g/l fortynnet i dH_2O som kan oppbevares ved romtemperatur inntil 4 uker.

Tabell 15: *Simulerte elektrolyttløsninger for munn, mage og tynntarm fasene for in vitro fordøyelse. Tabellen viser kjemikaler, stokk løsning og uttak i milliliter for de ulike elektrolyttløsningene. Stokkløsningene kan fryses ned ved -20 °C og ferdige elektrolyttløsninger kan oppbevares ved 4 °C inntil 4 uker.*

Væsker	Kjemikaler	Konsentrasjon til stokkløsning (g/l)	Uttak fra stokkløsning(ml)
Simulert spytt fluid (SSF)	KCl	37,3	15,1
Fylles med vann til 500 ml, juster pH til 7 med 1M HCl	KH_2PO_4	68	3,7
	NaHCO_3	84	6,8
	$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	30,5	0,5
	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	48	0,06
Simulert gastrisk fluid (SGF)	KCl	37,3	6,9
Fylles med vann til 500 ml, juster pH til 3 med 1M NaOH	KH_2PO_4	68	0,9
	NaHCO_3	84	12,5
	NaCl	117	11,8
	$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	30,5	0,4
	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	48	0,5
Simulert intestinal fluid (SIF)	NaHCO_3	84	42,5
Fylles med vann til 500 ml, juster pH til 7 med 1 M HCl			

- Nødvendig mengder av elektrolyttløsninger til hver fase og tilhørende mengde enzym ble beregnet før, vist i tabell 16.

Tabell 16: **Oversikt fordøyelsesvæsker til in vitro fordøyelse.** Fordøyelsesvæskene skal inneholde de ulike komponentene tabellen viser. Dette inkluderer elektrolyttløsninger med riktig pH for hver fase. Kalsiumløsning for den orale og gastriske fasen og enzymer i den gastriske og duodenale fasen.

Væsker	Vekt/volum	Innhold
Råvare	1 gram	
Simulert spytt fluid (SSF)	1 ml	Elektrolyttløsning pH 7 CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ , 44,1 g/l (5 µl/ml SSF, 1,5 mM)
Simulert gastrisk fluid (SGF)	2 ml	Elektrolyttløsning pH 3 CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ , 44,1 g/l (0,5 µl/ml SGF, 0,15 mM) Pepsin (4000 U/ml SGF)
Simulert intestinal fluid (SIF)	4 ml	Elektrolyttløsning pH 7 Pankreatin 2,5 mg/ml SIF
Totalt volum	8 ml	

- Kjøttet ble kvernet til jevn masse som ligner tygget mat ved hjelp av kjøkkenmaskin.
- Kjøttprøver fra hver behandling (kontroll, aktinidin og Exocut-RM) ble veid ut 10 x 2 paralleller til uttak etter gastrisk fase og duodenale fase.
- Det ble veid ut 1 gram prøve i hvert rør og blank prøve bestående av 1 ml dH₂O.

Utstyr dag 2:

- Kjøttbiter veid ut i 50 mL rør
- Elektrolyttløsninger til orale, gastriske og intestinale fasen
- Kjemikaler; CaCl₂(H₂O)₂, NaOH, HCl og dH₂O
- Enzymer; Pepsin og Pankreatin
- Vannbad justert til 37 °C
- Vannbad justert til 95 °C
- Risteinkubator med temperaturinnstilling
- Stor Sentrifuge

Utførelse dag 2:

- Elektrolyttløsninger tilsvarende spytt (SSF), gastrisk (SGF) og intestinal (SIF) fase ble varmet i vannbad ved 37 °C, og ble værende i vannbadet til de skulle brukes.
- Til hver prøve ble det tilsatt 1 ml simulert spytt fluid løsning (SSF) med pH 7 og 5 µl CaCl₂(H₂O) per ml SSF. Prøvene ble inkubert i vannbad ved 37 °C i 2 minutter.
- I ventetiden ble pepsin veid ut. Pepsin bryter ned sine egne enzymer i temperaturer over -20 °C og ble tint på is rett før bruk.
- Deretter startet den gastriske fasen:
 - Til hver prøve ble det tilsatt 2 ml SGF, 0,5 µl CaCl₂(H₂O) per ml SGF og 8,7 mg pepsin per ml SGF.
 - Prøvene ble ristet for hånd og justert til pH 3 med 1 M HCl. De tre første prøvene ble justert manuelt og resten ble tilsatt dette volumet i de resterende prøvene.
 - For å etterligne peristaltiske bevegelser i gastrisk fase stod prøvene 2 timer i risteinkubator ved 215 RPM og 37 °C.
 - Etter risting ble 10 paralleller fra hver behandling kokt ved 95 °C i 15 minutter for å stoppe enzymaktiviteten og sentrifugert ved 4000 G i 10 minutter. Disse prøvene representerte fordøyelse etter gastrisk fase.
- Til slutt, den intestinale fasen som representerer den første delen av tynntarmen:
 - 10 paralleller av hver behandling gjenstod til den duodenale fasen. Til hver prøve ble det tilsatt 4 ml SIF og 2,5 mg pankreatin (P1750) per ml SIF.
 - Prøvene ble ristet for hånd og pH justert til 7 med 1 M NaOH. De første tre prøvene ble pH justert manuelt, deretter tilsatt dette volumet i de resterende prøvene.
 - For å etterligne peristaltiske bevegelser i tynntarmen stod prøvene 80 minutter i risteinkubator ved 215 RPM og 37 °C.
- Etter risting ble prøvene kokt ved 95 °C i 15 minutter for å stoppe enzymaktiviteten.
- Tilslutt ble prøvene sentrifugert ved 4000 G i 10 minutter for å skille fordøyd materiale fra det ufordøyd. Disse prøvene representerte nedbrytningen etter den duodenale fasen.

4.10 Størrelseseksklusjonskromatografi

Størrelseseksklusjonskromatografi er en type væske kromatografi. Metoden brukes til å separere polymer basert på størrelse i en vandig løsning (AgilentTechnologies 2015).

Systemet består av en pumpe, mobilfasereservoar, injektor, kolonne, detektor og programvare til å vise resultatene.

Prøven pumpes til injektor, som introduserer polymer løsningen til mobilfasen. Buffer tilsettes i mobilfasen for å unngå sekundære interaksjoner i porene. Løsningen har polymere med ulik størrelse og vil komme ut av porennettverket ved forskjellige tidspunkt. Kolonnen har et porennettverk av sfæriske mikroporøse porer av silika som utgjør den stasjonære fasen (Agilent Technologies 2015). Oppløsning blir bedre ved lengre kolonner enn kortere, fordi materialet bruker lengre tid gjennom porennettverket. Porennettverket består av ulike porestørrelser og elueringstiden avhenger av hvordan molekylene vandrer (Phenomenex 2018). Molekyler som er større enn den største poren tvinges utenfor nettverket og elueres ut først, mens de mindre kan entre porene og separeres etter minkende størrelse. Metoden er basert på den hydrodynamiske radiusen til polymer i løsning, dermed vil sylindrerformet polymer komme ut tidligere enn kompakte proteiner med samme molekylvekt. Formen til proteinene avhenger av miljøet de utsettes for, og varierer med ionisk styrke og pH. Kromatogrammet kan kalibreres mot standarder for å bestemme molekylvekten til prøvene.

Utstyr:

- Fordøyde kjøttprøver fra *in vitro* fordøyelse
- Instrument: Agilent 1200 serie (Santa Clara, CA, USA).
- Kolonne: BioSep-SEC-s2000 kolonne (Phenomenex, 300 x 7,8 mm)
- Kjemikalier: acetonitril, MilliQ vann, 0,05 % trifluoroacetat, NaH₂PO₄ (0,10 M)
- Standarder: bovine serum albumin, albumin fra eggehvite, carbonic anhydrase fra storfe erythrocytter, lysozyme, cytochrome c fra storfe hjerte, aprotinin fra storfe lunge, insulin chain B oksidert fra storfe pankreas, renin substrat tetradecapeptid gris, angiotensin II human, bradykinin fragment 1–7, [D-Ala²]-leucin encephalin, Val-Tyr-Val og tryptofan
- Analyseprogram: OpenLab CDS Rev 01.07 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).

Utførelse:

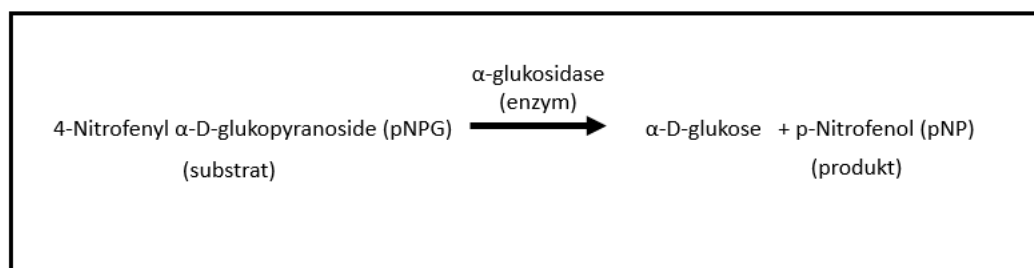
- Fordøyde kjøttprøver fra *in vitro* fordøyelse ble filtrert for å separere ut uoppløste partikler og peptider større enn porene i kolonnen brukt i væske kromatografi analysen. Før injeksjon ble prøvene filtrert gjennom Millex® Syringe filter for å unngå ødeleggelse av kolonnen. Prøvematerialet består nå av vannløselig fase etter *in vitro* fordøyelse.
- Standarder ble fortynnet i MilliQ vann til konsentrasjonen 2 mg/ml.
- Analysen ble utført av instrumentet Agilent 1200 serie (Santa Clara, CA, USA).
- Injeksjonsvolumet av hver prøve og standarder var 10 µl og separering ble utført ved 25 °C ved bruk av BioSep-SEC-s2000 kolonne (Phenomenex, 300 x 7,8 mm). Denne kolonnen passer for prøver med små proteiner fordi kulene er 5 µm og porestørrelsen er 145 Å. Proteiner og peptider med størrelse 0,2 – 75 kDa ble detektert.
- Mobilfasen bestod av acetonitril og ultra rensset vann i 30:70 v/v, og inneholdt også 0,05 % trifluoroacetat (TFA). Sammensetningen av mobilfase ble holdt konstant under hele elueringsperioden med hastighet på 0,9 mL min⁻¹ i 17 minutter.
- Mobilfasen ble erstattet med vaskebuffer, NaH₂PO₄ (0,10 M) etter 17 minutter og fortsatte til 20 minutter.
- Mellom 20 og 20,1 minutter ble betingelser for eluering gjenopprettet og kolonnen ble satt i likevekt til 25 minutter passert.
- Spektrofotometrisk detektor ved 214 nm framstilte kromatogrammer som ble analysert ved hjelp av OpenLab CDS Rev 01.07 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).
- Kromatogrammene ble kalibrert ved hjelp av løsninger med kjente molekylvekter og gav standardkurve. Ut i fra kromatogrammet ble prøver med tilfredsstillende signal valgt ut og analysert for bioaktivitet.
- Statistikk analysen ANOVA ble gjennomført for å lete etter signifikante forskjeller mellom behandlingene.

4.11 Bioaktive assay

Det er mulig å teste om ulike komponenter har en biologisk effekt etter fordøyelse, det vil si om de påvirker cellulære, fysiologiske eller metabolske prosesser i kroppen. *In vitro* assay er utviklet for en enkel screening av materialet. Her måles effekten ved kjemiske eller enzymatiske målinger. Ved videre bekreftelse av bioaktivitet vil uttesting ved *in vitro* cellemodeller, musemodeller og videre kliniske intervensjonsstudier være nødvendig. Ulike bioaktive assays har blitt utviklet for å teste biologisk aktivitet, for eksempel regulering av blodsukker.

4.10.1 α -glukosidase

Metoden er utviklet av Watanabe et al. (1997), men en optimalisert versjon av Schmidt et al. (2012) danner grunnlaget for betingelsene i dette forsøket. I metoden måles enzymaktiviteten til α -glukosidase og skal undersøke om råvarer kan gi reduksjon i blodsukker nivået ved å hemme dette enzymet. Etter inntatt måltid bidrar α -glukosidase i spalting av komplekse sukkerarter i tarmen og gir dermed raskt økning i blodsukker nivået. Det skal undersøkes om kjøtt behandlet med vanlig marinade, aktinidin og Exocut-RM inneholder inhibitorer for α -glukosidase. Inneholder de inhibitorer kan det gi gunstige effekter på blodsukkeret til diabetikere. Filtrerte kjøttprøvene fra *in vitro* fordøyelse forsøket tilsettes enzymet α -glukosidase for å sammenligne enzymaktivitet med kontrollprøvene. Inhibitoren til α -glukosidase er akarbose og gir lokal blodsukkersenkende effekt i tarmen. Akarbose forsinker opptaket av karbohydrater fra tarmen etter måltid, dermed unngås forhøyet blodsukker etter måltid. Diabetikere har fått utjevnet glukose nivået etter måltid ved bruk av inhibitoren akarbose (Schmidt et al. 2012). I dette forsøket brukes akarbose som positiv kontroll for inhibering fordi hensikten er å undersøke mulige inhibitorer for blodsukkeret i den vannløselige fasen etter *in vitro* fordøyelse.



Figur 13: **Kjemisk reaksjon i α -glukosidase assay.** Substratet p-Nitrofenyl α -D-glukopyranoside reagerer med enzymet α -glukosidase og gir α -D-glukose og p-nitrofenol. Produktet til reaksjonen er p-Nitrofenol og mengden av denne måles ved 405 nm. Absorbans nivået reflekterer enzymaktiviteten i prøvene.

Enzymaktiviteten til produktet av reaksjonen mellom enzymet α -glukosidase og tilhørende substrat måles ved hjelp av absorpsjon ved 405 nm, reaksjonen er vist i figur 13. Produktet er p-nitrofenol som er fargeløst ved pH under 5,4, men blir gul ved pH over 7,5. Bufferen i forsøket må ha pH ved 7,5 for fargeutslag i reaksjonen.

Utstyr:

- Prøver i vannløselig fase etter *in vitro* fordøyelse (seksjon 4.10)
- Mikroplate med 96 brønner
- Elektronisk pipette
- Kjemikaler: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$, NaN_3 , NaOH , dH_2O
- Substrat: 4-nitrofenyl- α -D- glykopyranoside
- Enzym: α -glukosidase
- Positiv kontroll: akarbose
- Plateleser (405 nm)

Utførelse:

- Prøvene ble tint og regnet ut nødvendig mengde til forsøket.
- Følgende løsninger ble laget:
 - Buffer løsningen ble laget av 2,34 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4,70 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ og 0,10 g NaN_3 løst i 500 ml dH_2O . pH ble justert til 7,5 med 1M NaOH .
 - Enzym løsning bestod av 0,95 mg α -glukosidase enzym fra tørrstoff (2,0 U/ml) løst i 10 ml buffer. Enzymet er α -glukosidase isolert fra *Saccharomyces cerevisiae*.
 - Substrat løsning ble laget av 60,2 mg 4-nitrofenyl- α -D- glykopyranoside (10 mM) løst i 20 ml buffer.
 - Positiv kontroll bestod av inhibitor løsning, og ble laget av 0,013 g (20 mM) akarbose løst i 1 ml buffer.
- Ufortynnet prøve og 1:10 fortyning ble benyttet for hver prøve. Grunnet begrenset mengde materiale ble kun to konsentrasjoner benyttet. Prøvene ble analysert i triplikater.
- Det ble brukt mikroplate med 96 brønner til forsøket. Kontroller og prøver ble tilsatt:

- Positiv kontroll bestod av 95 μl bufferløsning og 5 μl inhibitor løsning, og det ble blandet i brønnen.
- Negativ kontroll bestod av 100 μl buffer løsning.
- Av hver prøve ble 100 μl pipettert i brønnene.
- Det ble regnet ut nødvendig mengde enzym- og bufferløsning som skulle tilsettes i alle brønnene og ble blandet sammen. I hver brønn ble det tilsatt 5 μl enzymløsning og 75 μl buffer løsning.
- Deretter ble platen ristet av mikroplate leser i 10 sekunder før platen ble inkubert ved 28 °C i 10 minutter.
- Det ble tilsatt 20 μl substrat løsning og platen ble igjen ristet i 10 sekunder i mikroplate leser.
- Absorbans ble avlest ved 405 nm hvert 30 sekund i 35 minutter.
- Det ble regnet ut prosentvis inhibering av alle prøvene. Signifikante forskjeller ble undersøkt mellom behandlingene ved hjelp av ANOVA og Tukey test.

4. 12 Statistikk

Statistiske analyser for å finne signifikante endringer mellom enzym- og kontrollprøver ble utført ved ANOVA og Tukey test i Minitab® versjon 18. I forsøksoppsettet ble det antatt samme varians for prøvene.

4.12.1 Variansanalyse (ANOVA)

Variansanalyse undersøker relasjonen mellom kvantitative responsvariabler og kategoriske forklaringsvariabler, med flere enn to grupper i forsøksoppsettet. Prøvene må være uavhengige, responsvariablene må være normfordelte og ha samme varians, fordi metoden baseres på delvarians. Gjennomsnittet av variansene blir sammenlignet mellom og innad i gruppene, deretter uttrykker Fischer F-test resultatet som p-verdi ved hjelp av en statistisk programvare. Normalt velges signifikantnivået til 0,05 og en p-verdi under 0,05 angir signifikante forskjeller mellom gruppene, men sier ikke noe om hvilke grupper som er signifikant forskjellige. Ved signifikant forskjell blir nullhypotesen om at populasjonene er like forkastet.

4.12.2 Tukey test

Variansanalyse sammenligner gjennomsnittet i flere populasjoner og forklarer om resultatene generelt har signifikante forskjeller. Ved signifikante p-verdier beskriver Tukey's HSD (honest significant difference) videre hvilke grupper som signifikant skiller seg fra hverandre basert på Q-fordeling. Modellen forutsetter homogene varians verdier og uavhengige observasjoner innenfor og blant gruppene.

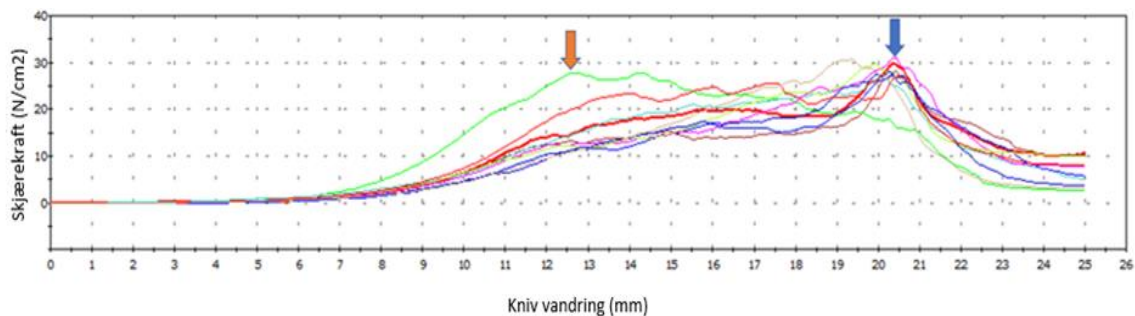
Utførelse:

Statistiske analyser for å finne signifikante forskjeller mellom enzym- og kontrollprøver ble utført med Minitab® versjon 18. Variansanalyse (ANOVA) viste om det fantes signifikante forskjeller mellom noen av gruppe. Ved signifikante forskjeller ble Tukey test utført for å nyansere resultatet. Testen viser spesifikke grupper som har signifikante forskjeller. Stolpediagram med standardavvik og gruppering laget i Excel ble brukt til å fremstille resultatene fra Tukey test.

5. Resultater

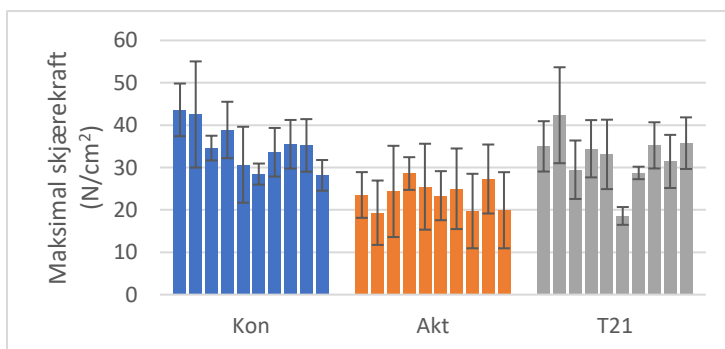
5.1 Warner Bratzler

Mørhet i *Semitendinosus* muskel med aktinidin eller Exocut-RM i tillegg til kontroll ble målt ved Warner Bratzler (WB). Den maksimale skjærekraften ved WB indikerer mørhet i kjøtt. En representativ deformasjonskurve er vist i figur 14, denne gir informasjon om bidraget til mørhet fra myofibrillproteiner og bindevevet i kjøttet. Det V-formet knivbladet møter kjøttet etter omtrent 8 mm, og den første toppen representerer skjæremotstanden som kreves gjennom myofibrillproteinene. Den maksimale skjærekraften måles 20 mm ned i kjøttet og representerer bidraget fra bindevevet til mørhet.



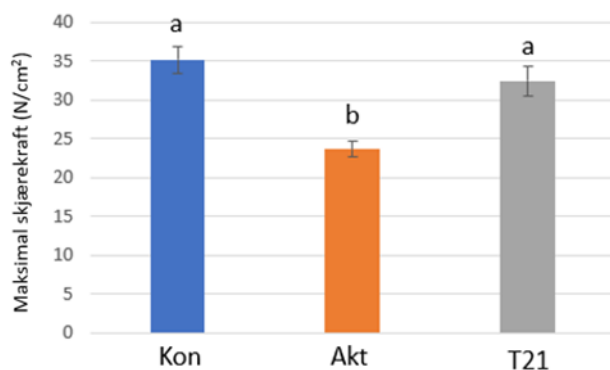
Figur 14: **Deformasjonskurve for Warner Bratzler skjærekraft.** En representativ Warner Bratzler deformasjonskurve vist med samtlige 10 paralleller for en muskelprøve etter varmebehandling. Syv dager før Warner Bratzler måling ble bitene injisert med marinade og dagen før kokt ved 70 °C i 70 minutter. I kurven vises skjærekraften etter kniv vandring i millimeter på x-aksen og den maksimale skjæremotstanden på y-aksen indikerer kjøttets mørhet. Bidrag fra myofibrillproteinene til mørhet blir vist i den første toppen (oransje pil), mens maksimale skjærekraften kommer fra bindevevet (blå pil).

Gjennomsnittlig maksimal skjærekraft oppnådd for *Semitendinosus* muskel fra 10 unge okser målt i 10 paralleller, hvor hver muskel ble injisert med tre ulike behandlinger er vist i figur 15. Ved visuell inspeksjon har kontroll marinaden generelt de høyeste skjærekraft målingene, mens aktinidin har jevnt over de laveste skjærekraft målingene.



Figur 15: **Maksimal skjærekraft påvirkes av ulike enzym-behandlinger.** Lårtunge fra 10 ulike unge okser ble injisert med enzymløsninger og varmebehandlet før måling av Warner Bratzler skjærekraft. Gjennomsnittlig maksimal skjærekraft for hver av musklene målt i 10 paralleller med ulik behandling og ± standardavviket for hver av parallellene er indikert. Kon: Vanlig marinade, Akt: Aktinidin marinade og T21: Exocut-RM marinade.

Ved ANOVA viste gjennomsnittlige verdier for Warner Bratzler skjærekraft signifikante forskjeller mellom de tre behandlingene (Figur 16). Kjøtt injisert med aktinidin hadde den laveste gjennomsnittlige skjærekraften (23,6 N/cm²) og er signifikant lavere (p<0,001) enn kjøtt injisert med vanlig marinade (35,1 N/cm²) og Exocut-RM (32,4 N/cm²).

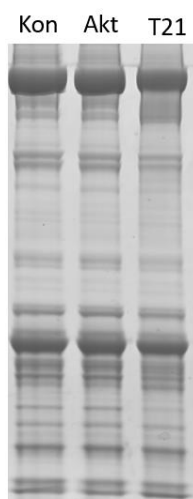


Figur 16: **Ulike enzym-behandlinger påvirker mørhet.** Maksimal skjærekraft fra Warner Bratzler mørhetsmåling blir påvirket av enzymløsninger vist med gjennomsnittsmålinger for hver behandling ± standardavvik. For hver behandling ble lårtunge fra ti storfe individer analysert (n=10). Signifikante forskjeller av gjennomsnittet for hver behandling er indikert med bokstaver, hvor ulike bokstaver angir signifikante forskjeller (p<0,05). Kon: vanlig marinade, Akt: aktinidin i marinade og T21: Exocut-RM i marinade.

Etter måling av mørhet ble kjøttet kvernet i kjøkkenmaskin. Kjøttmassene med ulike behandlinger viste varierende konsistenser, tekstur og farge. Aktinidin og kontroll behandlet kjøtt og hadde en fast konsistens og hadde appetittlig rødfarge, mens kjøttet behandlet med Exocut-RM viste mer grøtete konsistens og grålig farge.

5.2 Analyse av proteiner fra muskelprøver

For å undersøke om protein ekstraksjon var vellykket ble profilen til de vannløselige proteinene fra kjøttprøver med forskjellig marinadebehandling analysert. Proteinene er ekstrahert fra muskelprøver og har blitt separert etter molekylvekt med 4-12 % gradient gel som har separasjonsområde fra 15-260 kDa (Thermofisher u.å.-a). En representativ 1D-SDS-PAGE gel farget med Commasie er vist i figur 17, ekstraherte muskelprøver fra alle behandlingene. Alle proteinene kommer tydelig fram og 1D-SDS-gelen viser sammensatt protein profil, men ingen tydelige forskjeller mellom behandlingene.



Figur 17: **1D-SDS-PAGE**. Ett representativt 1D-SDS-PAGE av proteiner ekstrahert fra muskelprøver behandlet med ulike enzymer. Farging med Commasie av SDS-PAGE viser en grov fordeling av alle proteinene i prøvene etter molekylvekt. Kon: Vanlig marinade, Akt: Aktinidin marinade og T21: Exocut-RM marinade

5.3 Western blott

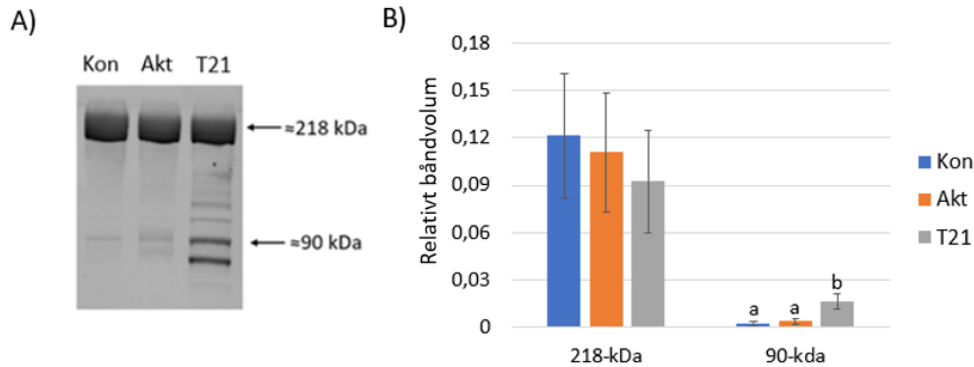
For å kartlegge nedbrytningsmønsteret til *Semitendinosus muskel* behandlet med vanlig marinade, aktinidin marinade og Exocut-RM marinade ble spesifikke proteiner detektert ved hjelp av western blott. Det ble benyttet ulike antistoffer rettet mot proteiner i myofibrill og bindevevet. Full lengde proteinet ble kvantifisert og nedbrytningsfragmenter ble valgt ut basert på tydelig bånd gjennomgående for behandlingene. I tillegg ble fragmenter kvantifisert basert på subjektiv vurdering av sannsynlige signifikante forskjeller mellom behandlingene.

5.3.1 Myofibrillproteiner

Proteinene i myofibrill gjør muskelcellene i stand til å kontrahere og muskelen kan dermed beveges. I muskelkontraksjonen er myosin, aktin, troponin og organisatoriske proteiner involvert. I denne masteroppgaven har myosin tung kjede (MHC), myosin lett kjede (MLC) og troponin T (TrpT) blitt studert ved western blott.

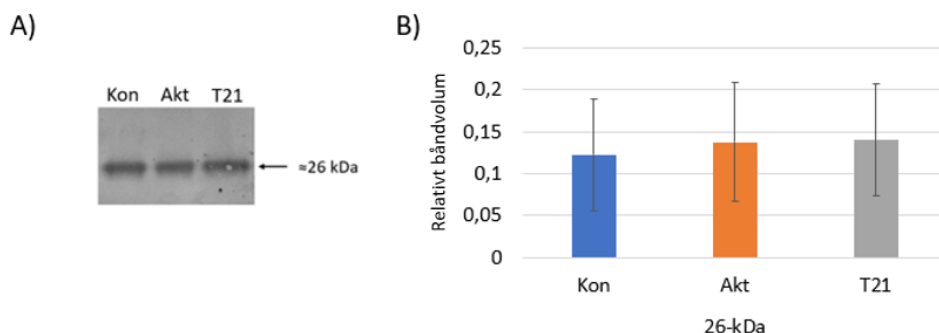
Myosin består av to subenheter, myosin tung og lett kjede. Myosin tung kjede er det største proteinet i myofibrillen og full lengde protein er angitt ved 218 kDa (Figur 18) (R&D-Systems 2018). Ingen signifikante forskjeller ble påvist mellom de tre behandlingene i full lengde proteinet. I kjøttet injisert med Exocut-RM marinaden viser ett representativt western blott at MHC er tydelig brutt ned (Figur 18). Ett nedbrytningsfragment ved 90 kDa ble kvantifisert etter vurdering om trolig signifikante forskjeller mellom behandlingene.

Nedbrytningsfragmentet ble funnet å være signifikante større ($p < 0,05$) for kjøttet injisert med Exocut-RM marinade enn kjøtt injisert med kontroll marinade.



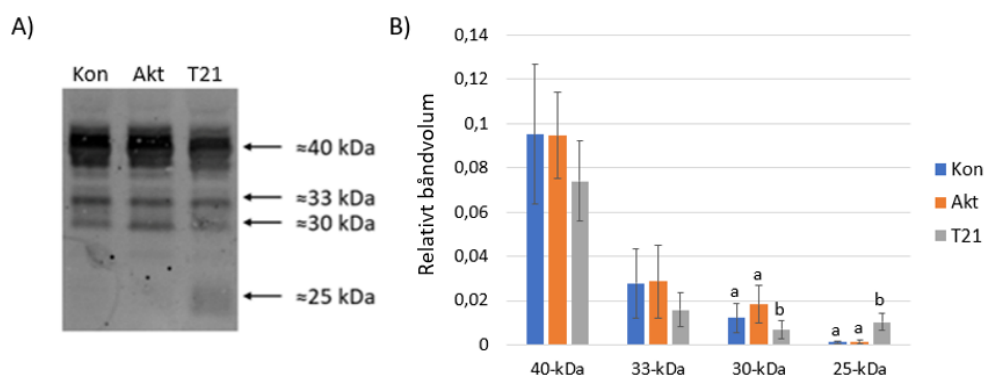
Figur 18: **Myosin tung kjede analysert med western blott.** Ett representativt western blott av myosin tung kjede viser 218-kDa og 90-kDa fragment (A). I analysen er det benyttet primært antistoff MF20 (1:1000) og fluorescerende sekundært antistoff Cy3 (1:2500). For hver behandling ble lårtunge fra ti storfe individer analysert ($n=10$). Signifikante forskjeller ble funnet for 90-kDa og kvantifiseringsverdier er framstilt i figur B). Feilsøylene i figur B) indikerer gjennomsnittets standardavvik. Signifikante forskjeller i relativt båndvolum analysert ved ANOVA av gjennomsnittet mellom behandlingene er indikert med bokstaver, hvor ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($P < 0,05$). Kon: vanlig marinade, Akt: Aktinidin i marinade og T21: Exocut-RM i marinade.

Myosin lett kjede (MLC) består av komponenter essensielle for funksjonalitet til myosin enzymene. Figur 19 viser western blott av MLC, men kun full lengde proteinet ble detektert og er estimert til 26 kDa (CellSignaling 2010a). Ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom de tre behandlingene.



Figur 19: **Myosin lett kjede analysert ved western blott.** Ett representativt western blott av myosin lett kjede viser 26-kDa fragment. I analysen er det benyttet primært antistoff T14 (1:1000) og fluorescerende sekundært antistoff Cy3 (1:2500). For hver behandling ble lårtunge fra ti storfe individer analysert ($n=10$). Ingen signifikante forskjeller i relativt båndvolum ved ANOVA ble funnet mellom de tre behandlingene. Kon: Vanlig marinade, Akt: aktinidin i marinade og T21: Exocut-RM i marinade.

Myofibrill har også regulerende proteiner, ett av disse er Troponin T. Proteinet er bundet regelmessig til aktin og bidrar med å regulere interaksjonene til myosin og aktin filamentet under kontraksjon. Et representativt western blott av TrpT vist i figur 20, er full lengde proteinet angitt ved 40 kDa (CellSignaling 2010b) og nedbrytningsfragmenter ved 33 kDa, 30 kDa og 25 kDa. Hverken full lengde proteinet eller isoform av troponin T detektert ved 33-kDa viste signifikante forskjeller mellom behandlingene. Fragmentet ved 30 kDa er nedbrytningsprodukt og en vanlig markør for kjøtt mørhet (Anderson et al. 2012). I denne masteroppgaven viste fragmentet signifikante forskjeller ($P < 0,05$) for kjøtt behandlet med Exocut-RM enzymet fra kontroll kjøttet. Et annet nedbrytningsfragment fra Troponin T med størrelse 25 kDa er signifikant forskjellig ($P < 0,05$) for kjøtt behandlet med Exocut-RM, denne forskjellen kan ses visuelt på blottet (figur 20).



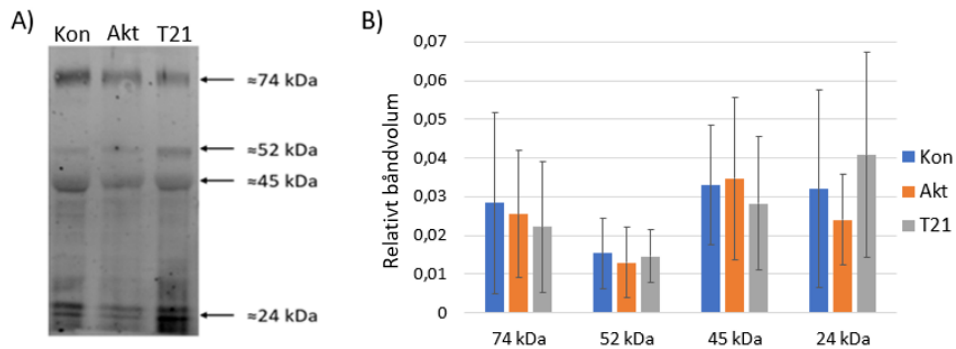
Figur 20: **Troponin T analysert ved western blott.** Ett representativt western blott av Troponin T viser 40-kDa, 33-kDa, 30-kDa og 25-kDa fragment (A). I analysen ble det benyttet primært antistoff JLT12 (1:2000) og fluorescerende sekundært antistoff Cy3 (1:2500). For hver behandling ble lårtunge fra ti store individer analysert ($n=10$). Signifikante forskjeller mellom behandlingene ble funnet for 30-kDa og 25-kDa fragmentet og kvantifiseringsverdiene er framstilt i figur B). Feilsøylene i figur B) indikerer gjennomsnittets standardavvik. Signifikante forskjeller i relativt båndvolum ved ANOVA av gjennomsnittet mellom behandlingene er indikert med bokstaver, hvor ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($P < 0,05$). Kon: vanlig marinade, Akt: aktinidin i marinade og T21: Exocut-RM i marinade.

5.3.2 Bindevevsproteiner

Den ekstracellulære matrisen er et sammensett nettverk av bindevevsproteinene kollagen og omkringliggende proteoglykaner (Nishimura 2015). I denne masteroppgaven har kollagen type I, dekorin og biglykan blitt studert ved western blott.

Kollagen er hovedproteinene i bindevevet og definerer bakgrunnsseighet til kjøttet. Ved oppvarming omdannes strukturen til geleaktig konsistens, som kan minskes hvis kollagenet er nedbrutt. Western blott analysen gav mange nedbrytningsprodukter som ble antatt å ha

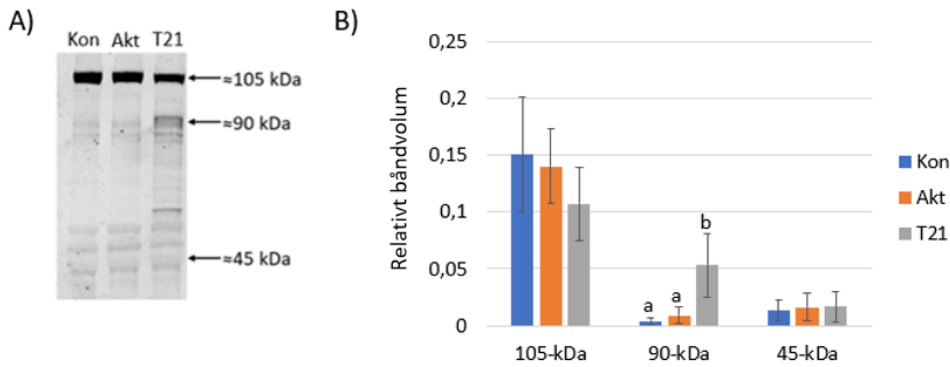
signifikante forskjeller, men ingen av de utvalgte fragmentene viste signifikante forskjeller fra kontrollen (Figur 21).



Figur 21: **Kollagen type I analysert ved western blott.** Ett representativt western blott for kollagen type I viser 24-kDa, 45-kDa, 52-kDa og 74-kDa fragment (A). I analysen ble det benyttet primært antistoff Kollagen type I (1:1500) og fluorescerende sekundært antistoff Cy5 (1:2500). For hver behandling ble lårtunge fra ti storfe individer analysert (n=10). Ingen signifikante forskjeller i relativt båndvolum ved ANOVA ble funnet mellom behandlingene (B). Kon: vanlig marinade, Akt: aktinidin marinade og T21: Exocut-RM marinade.

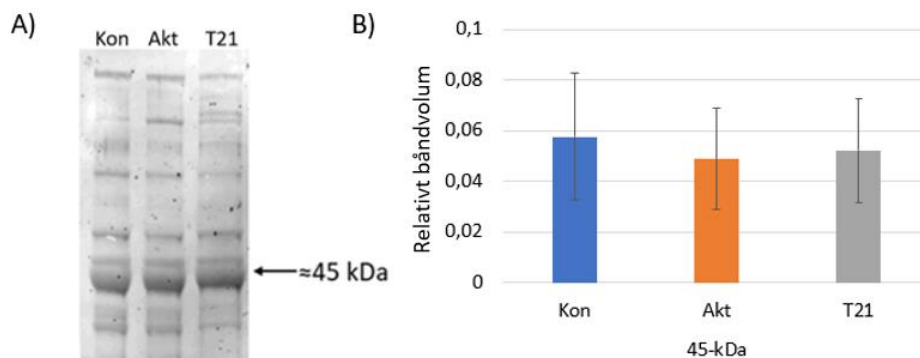
Det omfattende nettverket til intramuskulært bindevev er omringet av proteoglykaner, deriblant biglykan og dekorin.

Biglykan er i familien SLRP som bidrar i organisering av kollagen nettverket. Biglykan er modifisert med to rettkjedede GAG i tillegg til vanlig N-glykosylering. Full lengde proteinet uten karbohydratkjeder er angitt til 45-52 kDa (Rafii et al. 2006) Modifisering med GAG og N-glykaner øker størrelsen til biglykan, og det ble detektert henholdsvis 90 kDa og 105 kDa. Ett tidligere studie har detektert biglykan med GAG'er rundt 60 kDa-100 kDa (Rafii et al. 2006). Det ble funnet signifikant høyere mengde av 90 kDa i kjøttet behandlet med Exocut-RM. Forskjellen kommer også tydelig fram i western blottet som er framstilt i figur 22. Hele fragmenteringsmønsteret viser igjen mest nedbrytning i kjøttet behandlet med Exocut-RM.



Figur 22: **Biglykan analysert ved western blott.** Ett representativt western blott av Biglykan viser 105-kDa, 90-kDa og 45-kDa fragment (A). I analysen ble det benyttet primært antistoff Biglykan (1:1000) og fluorescerende sekundært antistoff DyLight549 (1:2500). For hver behandling ble lårtunge fra ti storfe individer analysert (n=10). Signifikante forskjeller mellom behandlingene ble funnet for 90-kDa fragment og kvantifiseringsverdiene er framstilt i figur B). Feilsøylene i figur B) indikerer gjennomsnittets standardavvik. Signifikante forskjeller i relativt båndvolum ved ANOVA av gjennomsnittet mellom behandlingene er indikert med bokstaver, hvor ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($P < 0,05$). Kon: vanlig marinade, Akt: aktinidin marinade og T21: Exocut-RM marinade.

Dekarin er også et protein i familien SLRP. Proteindelen er modifisert med rettkjedede karbohydrat og er i tillegg N-glykosylert. Hele proteoglykanet i storfe prøver har vist en størrelse rundt 100 kDa (Pedersen et al. 2001). Ved western blott analyse er full lengde proteinet uten karbohydratkjeder angitt til 45 kDa (Figur 23). Ingen signifikante forskjeller ved ANOVA ble funnet mellom behandlingene.



Figur 23: **Dekarin analysert ved western blott.** Ett representativt western blott av dekarin viser 45-kDa fragment (A). I analysen er det benyttet primært antistoff Dekarin (1:1000) og fluorescerende sekundært antistoff alexa488 (1:2500). For hver behandling ble lårtunge fra ti storfe individer analysert (n=10). Ingen signifikante forskjeller ved ANOVA ble funnet mellom de tre behandlingene. Kon: Vanlig marinade, Akt: aktinidin i marinade og T21: Exocut-RM i marinade.

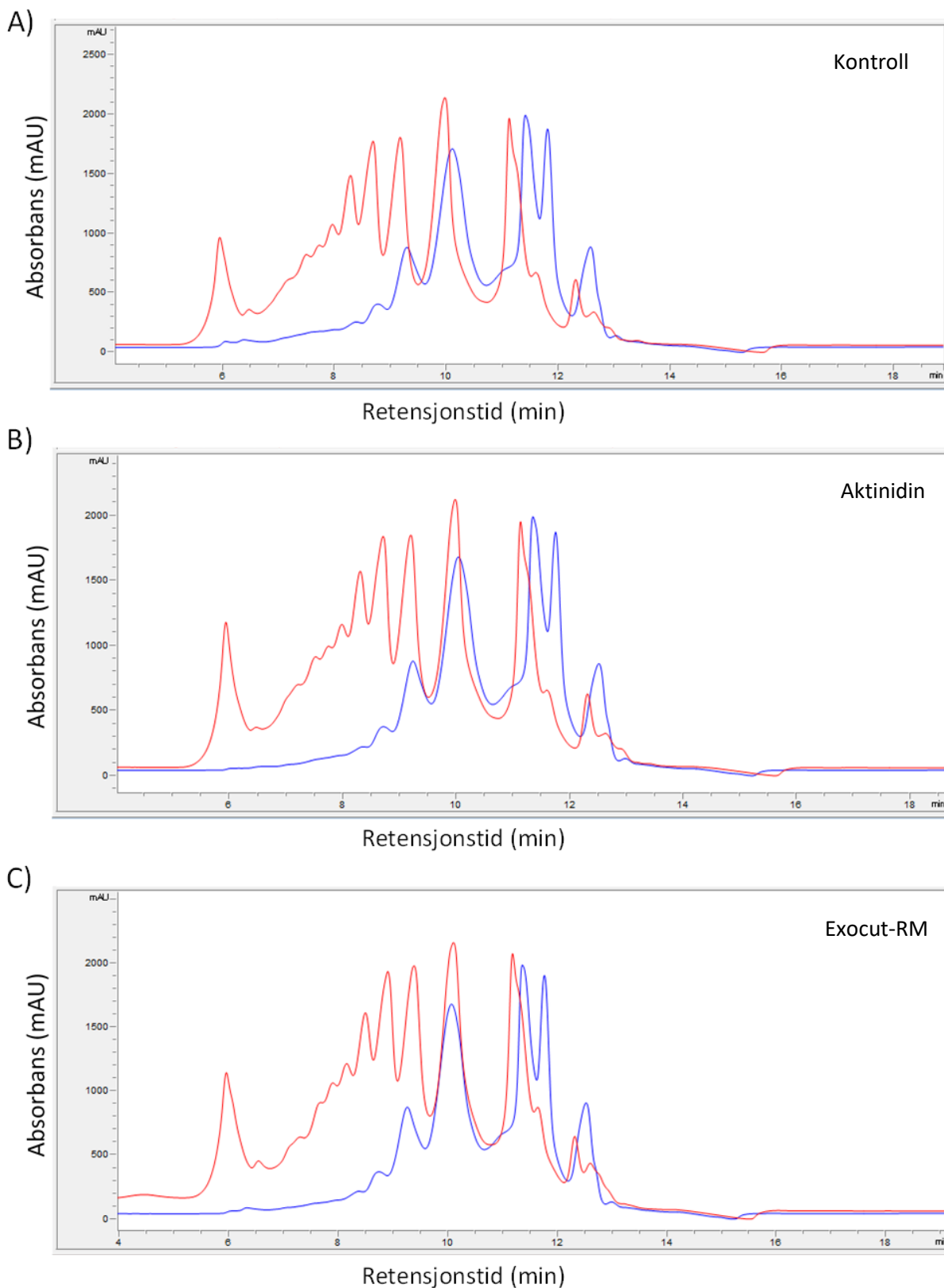
5.4 Størrelseseksklusjonskromatografi

Fordøyde prøver ble analysert ved størrelseseksklusjonskromatografi for å skille peptidene grovt etter størrelse. Under *in vitro* fordøyelse ble prøver tatt ut etter gastrisk fase og etter duodenal fase, den øverste delen av tynntarmen. Figur 24 viser utsnitt av kromatogram fra fordøyde prøver behandlet med ulike enzymløsninger etter gastrisk og fra duodenal fase. I hvert kromatogram representerer rød linje uttak etter gastrisk fase, mens blå linje representerer uttak etter duodenal fase.

Tidlig i elueringsperioden på kromatogrammene observeres tydelige forskjeller mellom gastrisk og duodenal fase. Den første elueringen etter gastrisk fase for alle behandlingene forekommer etter 6 minutter, ifølge kalibreringskurven har peptidene molekylvekt på ca. 44 kDa. I samme tidsperiode er peptidmengden fra duodenal fase fraværende, de første peptidene kommer ut etter 8,5 minutter. Kalibreringskurven viser at disse peptidene har molekylvekt på 1,8 kDa, men mengden er beskjeden ut ifra kromatogrammet.

Peptidmengden fra gastrisk og duodenal fase ligger på samme nivå mellom 9,6 og 11,6 minutter hvor peptider med størrelse på henholdsvis ca. 1 kDa og ca. 400 Da ble detektert. Derimot er andelen peptider ved 10 minutter større fra gastrisk fase (2250 mAU) enn andelen fra duodenal fase (1750 mAU).

Ved 12,5 minutter er peptidmengden fra gastrisk fase beskjeden (<600 mAU), mens uttak fra duodenal fase viser betydelig høyere mengde (ca. 1800 mAU og 750 mAU) av små peptider med molekylvekt ca. 200 Da ifølge kalibreringskurven.



Figur 24: **Kromatogram tilhørende fordøyde prøver behandlet med enzymløsninger etter gastrisk og duodenal fase.** Representative kromatogram fra SEC kjøring viser fordøyde kjøttprøver behandlet med vanlig marinade (A), aktinidin (B) og Exocut-RM (C) etter gastrisk og duodenal fase. I alle kromatogrammene representerer rød linje uttak etter gastrisk fase og blå linje representerer uttak etter duodenal fase. Peptidene kommer ut gjennom porenettverket til detektoren avhengig av størrelse og mengden måles etter Lambert-Beers lov i milli absorbans enheter vist på y-aksen i figuren. Elueringstiden for peptidene er vist på x-aksen.

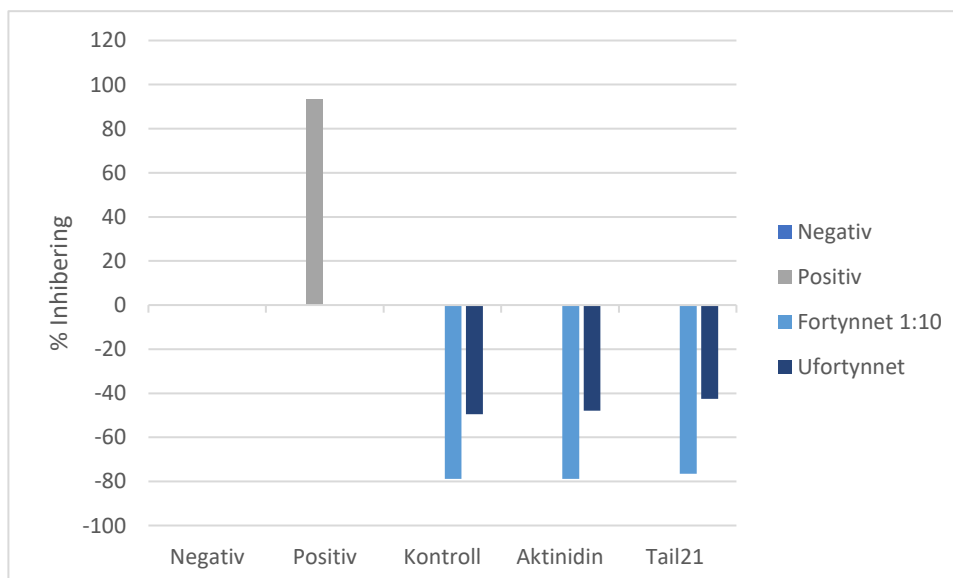
Gjennomsnittlig molekylvekt fra uttak i gastrisk (ca. 5 kDa) og duodenal fase (1 kDa) er signifikante forskjellig ($p < 0,005$). Derimot ble det ikke funnet signifikante forskjeller innad i gastrisk eller duodenal fase mellom de ulike behandlingene. Uttaket etter gastrisk fase gav flere svake resultater fra SEC analysen for Exocut-RM behandling, og datagrunnlaget er mindre enn kjøtt behandlet med vanlig marinade og aktinidin i marinade.

5.5 Bioaktive assay

Bioaktive peptider kan tas opp i tynntarmen og gi funksjonelle gunstige helseeffekter hos mennesket. Det ble undersøkt om kjøtt behandlet med aktinidin eller Exocut-RM enzym har ulik bioaktivitet for blodsukkerregulering.

5.5.1 α -glukosidase

Fordøyde kjøttprøver ble testet for α -glukosidase bioaktivitet i ufortynnet prøve og prøve fortynnet 1:10. Den positive kontrollen (acarbose) ble 93 % inhibert. For alle behandlingene viste fortynnet prøve høyere aktivitet for α -glukosidase enn ufortynnet prøver, vist i figur 25. Ingen signifikante forskjeller ved ANOVA ble funnet mellom behandlingene.



Figur 25: **Prosentvis inhibering av α -glukosidase.** Målinger av α -glukosidase i vannløselig fase fra in vitro fordøyelse. Ufortynnet og fortynnet (1:10) prøver vist i henholdsvis mørkeblått og lyseblått for de tre ulike behandlingene fra tre storfe individer ($n=3$). Den negative kontrollen bestod av buffer og utgjør grunnlinja til inhibering, da den beregnes til 0 % inhibering. Positiv kontroll består av acarbose og det forventes en høy verdi om forsøket ble vellykket.

6. Diskusjon

I denne masteroppgaven har aktinidin og Exocut-RM blitt undersøkt for mørningseffekt i *Semitenidinosus* fra ungt storfe. Videre ble en *in vitro* fordøyelsesmodell brukt for å studere proteinnedbrytning etter magesekken og tynntarmen, og fordøyd materiale screenet med enzym assay for deteksjon av potensielle bioaktive peptider. Masteroppgaven inngår i det større forskningsprogrammet «Sunn Mat» som har til hensikt å bidra til høyere råvare kvalitet og forekomst av helsegunstige komponenter fra den norske råvareproduksjonen.

6.1 Valg av stykningsdel

Stykningsdelen lårtunge brukes til ulikt produksjonskjøtt avhengig av fettprosent, men det er ønskelig at muskelen benyttes i ren form som stek eller finere grytekjøtt. For å undersøke om mørhet kan forbedres tilstrekkelig har enzymer blitt brukt i denne masteroppgaven. Lårtunge er kjent for å ha relativt uniforme skjærekraft verdier i hele muskelen grunnet konstante parallelle muskeltråder og lite dyr-til-dyr variasjon. Dette gjør muskelen egnet i studier for å demonstrere mørhet som resultat av behandling (Totland et al. 1988).

6.2 Marinering

Ulike områder av stykningsdelen ble behandlet med marinade bestående av enzymer fra *Actinidia deliciosa*, *Rhizomucor miehei* eller vann for kontroll. Industrielt benyttes multikanalinjeksjon, men metoden egner seg bedre til store stykningsdeler da problemet med utførselskanaler og tap av marinade fra kjøttet er mindre for store kjøttstykker enn hvis samme injeksjonsmetode blir brukt på små kjøttstykker. Derimot innsprøyting med enkel kanal pipette var en tidkrevende prosess, men marinaden forble i kjøttstykket og systematisk innsprøyting resulterte i jevnere fordeling. Valide resultater krever innsprøyting hvor marinaden forblir på innsiden av kjøttstrukturen og er jevnt fordelt.

Mengden marinade benyttet til innsprøyting var 10 % av vekten til kjøttstykket, etter anbefalinger fra dose-respons studier (Han et al. 2009; Wheeler et al. 1993).

Etter innsprøyting, varmebehandling og kverning viste kjøttbitene behandlet med aktinidin og Exocut-RM ulike konsistenser. Aktinidin synes ikke å påvirke konsistensen til kjøttet, i samsvar med andre studier (Christensen et al. 2009), og sensoriske egenskaper som saftighet og smak synes upåvirket. Aktiviteten til ulike aktinidin proteaser fra kiwifrukt

varierer, men optimal aktivitet til enzymet brukt i denne masteroppgaven er ved pH 3,4-4,5. Marinadeløsningen benyttet hadde pH 8,4, men pH nærmere surt miljø ville trolig gitt bedre aktivitet til enzymet. Kjøttbitene ble målt til pH 5,7 som gir kjøttet redusert vannbindingsevne og en surere marinadeløsning ville resultert i tørrere kjøtt. Derimot er marinadeløsning med nøytrale til moderat basiske vist god konsistens i kjøttet etter injisering av enzymer (Christensen et al. 2009). Likevel, kun 45 % av maksimal aktivitet til aktinidin ved pH 8,8 er vist (McDowall 1970) og enzymer kan ha denaturert i løsningen før de ble injisert i kjøttet. Enzymet inneholder også stabiliserende forbindelse maltodextrin som er løselig i vann og dekker over usmak (Parikh et al. 2014), men ukjent om stoffet kan interferere med bindingssete for å forstyrre nedbrytningen av muskelstruktur eller gi intensitet ved western blott analyse.

Marinering ble utført i romtemperatur og vakuumpakket før oppbevaring ved 4 °C i syv dager. Dette aktinidin enzymet har vist aktivitet ved 2 °C og fordi enzymet denaturerer ved 38 °C vil eventuell proteolyseeffekt tilkomme under lagring ved normale kjøleskaps temperatur 4 °C.

Lårtungene behandlet med Exocut-RM hadde en sleip overflate etter lagringsperioden på syv dager og gav grøtete konsistens etter kverning. Dette skyldes trolig at enzymet gir effektiv nedbrytning av muskelstrukturen og dermed over-mørner kjøttet. Konsistensen vil antagelig bli ansett som uappetittlig fra forbruker. Den optimale pH for dette enzymet er antatt å være 5,5, men enzymet er stabilt i pH-området 5,0-8,0 og beholder 80 % av aktiviteten ved disse pH verdiene (Sun et al. 2018). Dette kan det tyde på gode betingelser for enzymet i benyttet marinadeløsning som hadde pH 8,4. Enzymet antas å ha optimal aktivitet ved temperatur 55 °C, og effekten tilkommer derfor etter varmebehandling over denne temperaturen. Siden enzymet mister 80 % av aktiviteten over 70 °C (Bekhit et al. 2014), ble varmebehandlingen stoppet ved denne kjernetemperaturen.

Da resultatene fra denne masteroppgaven er tiltenkt anvendt forskning var det fordelaktig å gjennomføre varmebehandling til 70 °C, som tilnærmer en reel spisesituasjon.

6.3 Mørhet målt ved skjærekrefter

Mørhet er en sammensatt egenskap som er vanskelig å prediktere (Anderson et al. 2012), men måling av skjærekrefter gir en god indikasjon på seighet fra myofibrill- og bindevevsproteinene. Andre faktorer som post mortem lagring og muskelfibertype, samt måling av sarkomer lengde og andel bindevev ville gitt et mer helhetlig inntrykk av mørhet i stykningsdelen. Forbrukere oppfatter kjøtt med skjærekrefter målt til under 50 N/cm² som mørt (Rødbotten et al. 2011). Post mortem lagring av kjøttet pågikk i femten dager, de siste syv dagene med tilsatt enzymløsninger. I denne masteroppgaven viste samtlige behandlinger skjærekrefter under 50 N/cm², inkludert kontroll som tyder på forsterket påvirkning fra endogene enzymer grunnet lang lagringsperiode. Derfor burde effekten av marinerings blitt sjekket ved tidligere tidspunkt etter slakt.

Tidligere studier har gitt tvetydige svar om mørhet varierer innen stykningsdelen, til tross for enighet om relativt uniforme skjærekrefter. Det er dokumentert at skjærekreftene varierer fra den proksimale til den distale enden, men ikke nok til å dele stykningsdelen i mørhetskategorier til ulike formål (Shackelford et al. 1997). Derimot er Reuter et al. (2002) uenig denne påstanden, og foreslår at den midtre delen benyttes som helt kjøttstykke til eksempelvis grytekjøtt. Gjennom mine observasjoner er fokuset å demonstrere mørhet som resultat av behandling, og ved å randomisere hvilken muskeldel som ble brukt til de tre ulike behandlingene vil eventuell effekt være uavhengig av lokalisasjon.

Enzym behandling med aktinidin viste signifikant effekt ($p < 0,05$) fra kontroll kjøttet, dette tyder på at denne enzymbehandling kan gi mørere kjøtt enn ubehandlet. Dette er i samsvar med andre studier (Calkins & Sullivan 2007; Christensen et al. 2009). Derimot viser kjøtt behandlet med Exocut-RM tilsvarende resultater med kontrollen og kjøttet synes ikke å bli mørere med denne enzym behandling.

Selv om kurveforløpet fra Warner Bratzler reflekterer den maksimale skjærekraften fra bindevevet, er det lite diskutert om minsket skjærekraft skyldes nedbrytning av myofibrill- eller bindevevsproteiner. Sugiyama et al. (2005) mener reduksjonen skyldes endringer i bindevevet, men mer inngående analyser som western blott kan trolig støtte teorien. I denne oppgaven ble derfor nedbrytning av både myofibrill og bindevevsproteiner studert videre.

6.4 Protein nedbrytning

Eksogene enzymer har blitt tilsatt for å forlenge mørningsperioden utover naturlig proteolyse og potensielt utløse andre nedbrytningsfragmenter. Proteinekstraksjon fra muskelprøvene i denne masteroppgaven anses som vellykket da 1D-SDS-PAGE viste en sammensatt proteinprofil med samtlige tydelige bånd. Proteinnedbrytning ble målt etter post mortem proteolyse og tilførsel av enzymer har effekt etter lagringsperiode ved 4 °C i 15 dager og varmebehandling ved 70 °C.

Ut ifra mørhetsmålingene ved skjærekraft var det forventet signifikante forskjeller i proteinnedbrytning etter kiwi behandling. Likevel viste kun kjøtt behandlet med Exocut-RM tydelig nedbrytning av flere proteiner sammenlignet med kontroll og aktinidin. Dette antyder forskjellig nedbrytningsmønster fra aktinidin og Exocut-RM som viser at nedbrytning ved eksogene enzymer kan påvirke mørheten ulikt. Den økte nedbrytningen ved Exocut-RM behandling kan muligens ha ført til grøtet konsistens i kjøttet. Proteinnedbrytningen kan også variere fra muskel til muskel grunnet innhold av protein isoformer, proteolysegrad og kontraksjonstilstand ved slakt (Melody et al. 2004), men fordi samme muskel er benyttet i denne masteroppgaven er effekter av disse lite sannsynlig.

Western blott analyse er ansett pålitelig, men har noen fallgruver det er verdt å peke ut. Utilstrekkelig rapportering av ulike eksperimentelle betingelser og antistoffer (>50 %) med dårlig kvalitet påvirker linearitet og sensitivitet til analysen, samt mulighet til å oppnå pålitelig sammenligning av resultater fra flere studier (Gilda et al. 2015). Derfor burde test blott blitt gjennomført med ulike buffere, proteinmengder og antistoff konsentrasjoner for best kvalitet på signal intensiteten, da anbefalinger fra leverandør ikke nødvendigvis er pålitelig for antistoffene til alle anvendelser. Mengden protein påsatt gel er også av betydning for resultatene og er optimal mengde kan variere mellom antistoff, men blir kun oppdaget gjennom eksperimentelle data for ett spesifikt antistoff. Derfor burde en serie fortykning av ulike proteinmengder for hvert antistoff blitt sjekket, etterfulgt av standard kurve med kvantifisert full lengde protein blitt gjennomført for å avgjøre den optimale mengden protein for mer pålitelige resultater av proteinnedbrytningen (Taylor et al. 2013). Kvantifiseringsmetoden med valgte betingelser og programvare er også av betydning for pålitelige resultater. I analysen ble ImageQuant benyttet til kvantifisering og mulig feilkilde er relatert til størrelsen på radiusen i rullende ball metoden (Gassmann et al. 2009).

Intensitet varierer mellom bilder og hvis radiusen på ballen er betydelig mindre enn hulrommene kan for mye bakgrunnsstøy i bildet bli fjernet og gi en mulig feilkilde til resultatene.

I denne masteroppgaven er nedbrytningen av noen utvalgte myofibrill- og bindevevsproteiner undersøkt med hensyn til effekt av enzymbehandling på *Semitendinosus*.

6.4.1 Nedbrytning av myofibrillproteiner

Muskelcellene blir i stand til å kontrahere grunnet proteinene i myofibrill. I denne masteroppgaven har nedbrytning av noen av disse proteinene blitt studert ved hjelp av western blott analyse. Gjennom naturlig proteolyse utført av kalpainer og katepsiner forblir myosin og aktin vanligvis intakt (Lametsch et al. 2003). Derfor var det interessant å undersøke om tilførsel av eksogene enzymer fra kiwifrukt og RM kan bryte ned myosin, og dermed svekke myofibrill for å påvirke mørhet i kjøttet. I denne masteroppgaven har tilførsel av aktinidin vist manglende nedbrytning av myosin tung og lett kjede, i motsetning til andre studier (Lewis & Luh 1988; Liu et al. 2011; Wada et al. 2002). Enzymet benyttet i dette studiet har trolig lavere virkning på nedbrytning av myosin enn vist i andre studier. Det kan også skyldes, at studiene har benyttet ulike betingelser for sine forsøk når det gjelder f.eks. konsentrasjon av enzymet, hvor enzymet kommer fra, sammensetningen av marinaden og analysemetoder for å studere nedbrytning. Studiene fra Liu et al. (2011) brukte fryse-tine sykluser av kjøttet for å undersøke effekt av kiwifrukt juice og fant signifikant nedbrytning av myosin ved SDS-PAGE, mens Wada et al. (2002) marinerte kjøttet og benyttet trykk behandling for å undersøke effekt av aktinidin ved hjelp av elektronmikroskop. Selv om studiene viser klar nedbrytning av myosin er det i denne studien benyttet western blot, som er mer detaljert enn SDS-PAGE og elektronmikroskop for å undersøke nedbrytning.

Analysen med kjøtt behandlet med Exocut-RM viste mer framtrædende nedbrytningsmønster og gav signifikant forskjell i nedbrytningsfragment. Årsaken til dette må undersøkes nærmere da litteraturen mangler studier om nedbrytningen av myofibrillproteiner i kjøtt behandlet med Exocut-RM.

Myosin lett kjede hadde ingen signifikante forskjeller med enzymbehandling og ingen nedbrytningsfragmenter ble detektert. I analysen ble MOPS-SDS runningbuffer benyttet som

har separasjonsområde 260-15 kDa (Thermofisher u.å.-c). Siden full lengde proteiner kvantifisert til 24 kDa, har mulig fragmenter mindre enn 15 kDa beveget seg ut av gelen. Dersom MES-SDS Runningbuffer i stedet hadde blitt brukt kunne fragmenter med størrelse helt ned til 3,5 kDa blitt detektert (Thermofisher u.å.-b), og mer sannsynlig vist nedbrytningsfragmenter.

Videre ble nedbrytningsmønsteret til ett regulerende protein undersøkt. Troponin T bidrar i regulering av myosin og aktin filamentet under kontraksjonen samt bundet regelmessig til aktin. Siden nedbrytningen av fragment ved 30 kDa er vanlig markør for naturlig post mortem proteolyse og har god sammenheng med mørhet (Anderson et al. 2012), ble nedbrytningen til proteinet naturlig å undersøke. Nedbrytningsfragmentene ved 30 kDa og 25 kDa var henholdsvis signifikant lavere og høyere for Exocut-RM enn kontroll og aktinidin. Det var en tendens til at Exocut-RM hadde lavere full lengde TnT enn kontroll (p -verdi = 0,096). Ingen kvantifiserte bånd er signifikant forskjell for kjøttet behandlet med aktinidin sammenlignet med kontroll. Fragmentet ved 30 kDa er både framtrødende og med relativt høyere båndintensitet sammenlignet med fragmentet for kontroll og Exocut-RM. Større standardavvik i dataene fra aktinidin gir likevel ikke-signifikant resultat. Sammenlagt antyder funnene at nedbrytningsmønsteret fra aktinidin og Exocut-RM er ulikt, og dette kan bekreftes ved sekvensering av peptidfragmentene.

6.4.2 Nedbrytning av bindevevsproteiner

Intramuskulært bindevev danner nettverk av kollagen fibre og blir omringet av proteoglykaner. I denne masteroppgaven har nedbrytningsmønstre til kollagen type I, dekorin og biglykan blitt undersøkt.

Flere studier har vist klar nedbrytning av kollagen type I ved tilførsel av aktinidin (Ha et al. 2012; Ha et al. 2013a; Sugiyama et al. 2005). Derimot i denne masteroppgaven, ingen kvantifiserte nedbrytningsfragmenter var signifikant forskjellig fra kontroll. Betingelsene i tidligere studier varierte fra dette og er trolig årsak til ulikt resultat. Da det ble brukt myofibrill og kollagen proteinekstrakter fra seige sener tilført aktinidin (Ha et al. 2012; Ha et al. 2013a) og knoke er tilført juice fra kiwifrukt (Sugiyama et al. 2005). Aktinidin viser god nedbrytning i ekstraktene og innholdet av kollagen er betydelig større enn muskelen benyttet i dette studiet. Manglende signifikante forskjeller kan også skyldes at aktinidin har

mindre virking på kollagen type I enn først antatt, og nedbrytningsfragmentene er trolig dannet av endogene kollagenaser.

En feilkilde til mangel på signifikante forskjeller kan også skyldes valg av konsentrasjoner tilhørende primære antistoffer. Ved første gel kjøring var antistoff konsentrasjonen 1:5000 basert på veiledning. Da blottet hadde for svak intensitet og utydelige bånd, ble konsentrasjonen endret til 1:1500 for å garantere sterk intensitet og tydeligere bånd. Denne konsentrasjonen resulterte i tydelige bånd på blottet, men kan ha påvirket intensiteten i bildet. Usikkerhet er knyttet til det øverste båndet kvantifisert til 74 kDa. Kollagen type I skal vise full lengde proteinet som dublett ved 115 og 130 kDa, i tillegg en dublett ved 215 og 235 kDa grunnet ulike α -kjeder (Miller & Kent Rhodes 1982). Det øverste båndet kvantifisert til 74 kDa er dermed ikke full lengde proteinet av kollagen type I, men ett nedbrytningsfragment av proteinet grunnet målt molekylvekt og sterkt signal tyder på spesifisitet mot kollagen type I. Tilsvarende viser fragmentene kvantifisert til 52, 45 og 24 kDa spesifisitet mot kollagen type I grunnet sterkt signal. Likevel krever det sekvensering av peptidfragmentene for å kunne konkludere om disse er nedbrytningsprodukter.

Angående det andre enzymet, fra *Rhizomucor miehei* ble nedbrytningsmønster detektert ved immunoblotting, men viste ingen signifikante forskjeller. Tidligere studier med enzymet viste ingen aktivitet mot kollagen (Sun et al. 2018), og tilsvarende for enzymer fra *Aspergillus oryzae* klassifisert i samme subfamilie (Ashie et al. 2002; Pietrasik & Shand 2011). Nedbrytningsmønsteret detektert i dette studiet for Exocut-RM behandlet kjøtt skyldes trolig nedbrytningen fra endogene enzymer frigjort fra lysosomene etter slakt.

Nedbrytningen av dekorin og biglykan i dette studiet viste en sammensatt proteinnedbrytningsprofil tilsvarende for begge proteinene. Litteraturen mangler informasjon om nedbrytning av biglykan og dekorin i kjøtt behandlet med aktinidin eller Exocut-RM. Nishimura (2010) viste at mengden proteoglykaner fra perimysium i *Semitenidinosus* muskel sank betraktelig etter post mortem modning uten eksogen enzym behandling. Derfor var det interessant å undersøke om enzymene hadde ytterligere effekt på proteinene. Proteinkjernen til dekorin er tidligere kvantifisert til 45-52 kDa (Rafii et al. 2006), men molekylvekten øker når proteinkjernen er glykosylert med GAG eller N-glykaner. For dekorin ble kun full lengde proteinet kvantifisert til 45 kDa detektert. Da intensiteten i bildet trolig var for lav til at kvantifiseringsprogrammet detekterte andre fragmenter synlige i

kontrastjustert bilde i resultatseksjonen. Ingen signifikante forskjeller ble funnet for dekorin full lengde proteinet mellom behandlingene, men membranen viser flere nedbrytningsfragmenter med potensielle forskjeller. Grunnet svak intensitet i bildet kan synlige fragmenter også være uspesifikk binding av antistoffet til membranen. Western blott analysene for biglykan viste flere synlige fragmenter med god intensitet. Fragmentet kvantifisert til 105 kDa er mest sannsynlig en N-glykosylert versjon av full lengde proteinet med GAG-kjeder, og viste tendens til signifikante forskjeller ($P=0,053$) for kjøtt behandlet med Exocut-RM fra kontrollen. Nedbrytning av proteoglykaner er kompleks, både fordi nedbrytningen av proteinene og spalting av GAG kjeder forekommer. I dette tilfelle er 90 kDa fragmentet som er signifikant forskjellig fra Exocut-RM behandling fra kontrollen sannsynligvis en nedbrytning av glykosylert biglykan. Videre studier med enzymbehandling av GAG eller N-glykankjeder vil være nødvendig for å bekrefte dette.

6.5 *In vitro* fordøyelse

Fordøyelsessystemet skal sørge for at kroppen får optimalt opptak av næringsstoffer og energitilførsel. Gjennom nedbrytning i magesekken og tynntarmen blir proteiner brutt ned til oligopeptider og videre til di- tripeptider og frie aminosyrer. For å undersøke nedbrytning fra oral, gastrisk og duodenal fase ble *in vitro* fordøyelse gjennomført. Modellen utarbeidet av Minekus et al. (2014) skal etterligne de fysiologiske betingelsene hos et friskt voksent menneske. Derimot får ikke modellen vist kompleksiteten i interaksjonene mellom maten og systemene *in vivo*. Dette skyldes for eksempel at modellen ekskluderer gastrisk lipase, tarmbakterier og brush boarder enzymer som finnes i hele fordøyelseskanalen. For å undersøke diett relaterte spørsmål som for eksempel overmetthet etter måltid regnes ernæringsstudier som den beste metoden, men *in vitro* modellen gir mulighet til å kontrollere betingelsene, er reproducerbar og har ingen etiske restriksjoner. En annen fordel er konstant ratio av enzym til måltid. Dette er nyttig for å studere fordøyelse til enkelt substrater eller enkle måltider under valgte betingelser som i denne studien.

Ved hjelp av størrelseseksklusjonskromatografi ble fordøyde prøver undersøkt etter gastrisk fase og duodenal fase. Gjennomsnittlig molekylvekt fra uttak etter gastrisk og duodenal fase var som forventet signifikant forskjellig ($p<0,005$), grunnet normal virkning til fordøyelseenzymene i mage-tarm kanalen. Derimot var det ingen signifikante forskjeller i

gjennomsnittlig molekylvekt på tvers av behandlingene innad i gastrisk eller duodenal fase. Dette skyldes sannsynligvis den intensive proteinnedbrytning i modellsystemet. Tidligere *in vitro* studier har vist økt gastrisk proteinfordøyelse ved tilførsel av aktinidin (Kaur et al. 2010a), men studiet gir et grovere estimat, ved bruk av SDS-PAGE analyse med deteksjon av proteiner i størrelse 250-10 kDa sammenlignet med deteksjon av peptider ned til 200 Da i dette studiet. Det er ingen litteratur om behandling av kjøtt med enzymer fra *Rhizomucor miehei* har påvirkning på fordøyelse.

Metoden gir et grovt estimat av andel peptider med ulike molekylvekter. Derfor kan det være stor variasjon av spesifikke peptider med ulike funksjoner detektert innenfor samme størrelseområde. Disse forskjellene kan variere for kjøtt behandlet med aktinidin eller Exocut-RM, og dermed potensielt peptider med ulik bioaktivitet.

Igjen grovt estimert, gir størrelseseksklusionskromatografi en klar indikasjon på at andelen mindre peptider er betydelig større etter duodenal fasen enn etter gastrisk fase. Dette bekreftes av signifikant lavere gjennomsnittlig molekylvekt, likevel må spesifikk størrelse og frekvensen av bestemte peptider undersøkes nærmere. Manglende forskjeller mellom behandlingene kan skyldes at proteolyse graden var tilsvarende i behandlingene eller muligens er proteinnedbrytningen i *in vitro* modellsystemet så intensiv at variasjonen i proteolysen av råvarene forsvinner. Ved bruk av mer detaljerte analyser som proteomikk vil mulige forskjeller i aminosyresammensetningen mellom behandlingene kunne bli avdekket og vise om de eksogene enzymene kan danne ulike peptider.

6.6 Potensiale for bioaktive peptider

Størrelseseksklusionskromatografi gav grov fordeling av peptidene. Dersom det er bioaktive peptider i den vannløselige fasen etter *in vitro* fordøyelse, burde disse peptidene finnes i retensjonstid fra 9,6 til 13 minutter sammenlignet med molekylvektstørrelsene til standardene (Vedlegg 9.1). I følge estimerte molekylvekter ble peptider med størrelse 1 kDa og 400 Da detektert mellom henholdvis 9,6 og 11,6 minutter. I review fra Korhonen og Pihlanto (2006) blir peptider med bioaktivitet for antihypertensjon og antioksidant egenskaper presentert og finnes i dette størrelse området. Ved 12,5 minutter viser kalibreringskurven den frie aminosyren tryptofan, men frie aminosyrer kan ikke utøve

bioaktivitet alene. Tryptofan har høy molekylvekt (204 Da), derfor representerer toppene sannsynligvis også aminosyrer med lavere molekylvekt kombinert til mindre peptider. Disse peptidene har potensielt gunstig bioaktivitet for blodtrykkregulering, blodsukkerregulering eller egenskaper som er antimikrobielle eller antioksidanter. Peptidmengden fra gastrisk fase er beskjeden mellom 10 og 12,5 minutter sammenlignet med uttaket fra duodenal fase der peptidmengden er betydelig større. Dette indikerer at potensialet for bioaktive peptider er størst etter den duodenale fasen.

Litteraturen mangler informasjon om bioaktive peptider i kjøtt behandlet med enzymer fra *Rhizomucor miehei*. Heller ikke effekten av α -glukosidase i kjøtt behandlet med aktinidin er omtalt i litteraturen. Kiwifrukt alene har vist høy inhibitor aktivitet (74 %) mot α -glukosidase (Wojdyło et al. 2017). I denne masteroppgaven ble vannløselig fase etter *in vitro* fordøyelse av enzym behandlet kjøttprøver testet for α -glukosidase bioaktivitet, som påvirker blodsukkerregulering. Samtlige brønner i mikroplaten ble tilsatt α -glukosidase for å påvise eventuell aktivitet. Ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom behandlingene, sannsynligvis grunnet massiv proteinnedbrytning i løpet av *in vitro* fordøyelsen.

Likevel viste fortyntet (1:10) prøver høyere fremmede aktivitet for α -glukosidase enn ufortynnede prøver. Det ble gjennomført bekreftende forsøk fordi dette var uforventet, men begge forsøkene gav samme resultat. Den positive kontrollen (acarbose) ble 93 % inhibert og resultatene anses dermed som valide. Negative verdier for prøvematerialet tyder på økende α -glukosidaseaktivitet og potensiale for gunstig effekt på blodsukkeret til diabetikere, tilsvarende er funnet i et annet studiet med proteinhydrolysater fra kylling (Rønning et al. 2016). Uforventet viser lavere konsentrasjoner av prøvematerialet høyere aktivitet, trolig påvirket av ett eller flere komponenter fra fordøyelsesmodellen. En årsak til uforventet resultat kan skyldes at assayet ikke er forenelig eller optimalisert med henhold til salter, pH, buffere eller andre kjemikaler fra modellsystemet og må undersøkes nærmere. I denne masteroppgaven har ett assay for bioaktivitet blitt testet, men det finnes andre assay for blodsukkerregulering, som for eksempel DPP-IV. Det burde også kjøres assay for andre egenskaper som blodtrykkregulering, antioksidant eller antimikrobille egenskaper for å undersøke om nedbrytning av kjøttet med disse enzymene har generert bioaktive peptider. Proteomikk analyser kan bekrefte peptidsekvensene med eventuell bioaktivitet.

7. Videre arbeid

I denne masteroppgaven er nedbrytning av noen få proteiner målt og gir dermed ikke et helhetlig bilde av nedbrytningen. Undersøkelse av andre proteiner som bygger opp myofibrill som desmin, titin, aktinin og tropomyosin ville kartlagt nedbrytningen nøyere, etterfulgt av mer detaljerte analyser. Mer inngående undersøkelser som for eksempel proteomikk vil være nødvendig for å avdekke faktiske forskjeller i proteolysegrad mellom enzym behandlingene. Muligens vil slike analyser gi informasjon om proteasenes spesifisitet og nedbrytning av ulike proteiner i kjøttet. Videre kan analysene muligens forklare forskjellene som ble funnet ved mørhetsmålinger og observasjonen av varierende konsistens mellom behandlingene.

Vannløselig fase av *in vitro* fordøyde prøver viste som forventet klar nedbrytning av peptider fra gastrisk til duodenal fase, derimot ble ingen forskjell mellom behandlingene påvist. Likevel kan prøver fra forskjellige behandlinger inneholde funksjonelt ulike peptider i samme størrelse området. Aminosyresammensetningen i kjøttet må undersøkes mer detaljert ved for eksempel proteomikk og kan vise om de eksogene enzymene kan danne ulike peptider.

Peptider fra proteinfordøyelse kan ha ulik bioaktivitet, men om bioaktive peptider fra råvarer har en reel biologisk aktivitet krever sammensatte metoder før eventuell implementering som funksjonell ingrediens. Et assay for bioaktivitet mot blodsukkerregulering er testet i denne masteroppgaven, men mange andre assay er tilgjengelig for å undersøke om enzymene har generert bioaktive peptider med andre helsegunstige egenskaper. Etter *in vitro* assay gir cellemodell forståelse om dose-respons som framkaller mulig bioaktivitet og i hvilket vev biologisk respons kan forventes. Peptidsekvensen med avdekket bioaktivitet må bekreftes ytterligere med proteomikk analyser. Videre kan uttesting foregå i dyremodeller med rotter, mus eller gris. Ved gunstig bioaktivitet må helseeffektene dokumenteres av humane intervensjonsstudier før eventuelt ingrediensen kan implementeres i råverene som funksjonell ingrediens.

8. Referanser

- Agarkova, I. & Perriard, J.-C. (2005). The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends in Cell Biology*, 15 (9): 477-485.
- Agilent Technologies. (2015). *Agilent "How to" guide for Size Exclusion Chromatography for biomolecule analysis*. Tilgjengelig fra: https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3651EN_LR.pdf (lest 02.02.2018).
- Agilent Technologies. (2015). *An Introduction to Gel Permeation Chromatography and Size Exclusion Chromatography*. Tilgjengelig fra: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-6969EN%20GPC%20SEC%20Chrom%20Guide.pdf> (lest 07.02.2018).
- Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Malva, A. d. & Marino, R. (2017). Bioactive Peptides in Animal Food Products. *Foods*, 6 (5): 35.
- Alvarado, C. & McKee, S. (2007). Marination to Improve Functional Properties and Safety of Poultry Meat. *The Journal of Applied Poultry Research*, 16 (1): 113-120.
- Anderson, M. J., Lonergan, S. M., Fedler, C. A., Prusa, K. J., Binning, J. M. & Huff-Lonergan, E. (2012). Profile of biochemical traits influencing tenderness of muscles from the beef round. *Meat Science*, 91 (3): 247-254.
- Andreeva, N. S. & Rumsh, L. D. (2001). Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 10 (12): 2439-2450.
- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. & Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci*, 57 (3): 319-24.
- Ashie, I. N. A., Sorensen, T. L. & Nielsen, P. M. (2002). Effects of Papain and a Microbial Enzyme on Meat Proteins and Beef Tenderness. *Journal of Food Science*, 67 (6): 2138-2142.
- Avery, N. C. & Bailey, A. J. (1995). An efficient method for the isolation of intramuscular collagen. *Meat Science*, 41 (1): 97-100.
- Bailey, A. & Light, N. (1989). *Connective tissue in meat and meat products* Elsevier Applied Science.
- Bailey, A. J. & Sims, T. J. (1977). Meat tenderness: Distribution of molecular species of collagen in bovine muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28 (6): 565-570.
- Bekhit, A. A., Hopkins, D. L., Geesink, G., Bekhit, A. A. & Franks, P. (2014). Exogenous Proteases for Meat Tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54 (8): 1012-1031.
- Belew, J. B., Brooks, J. C., McKenna, D. R. & Savell, J. W. (2003). Warner–Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. *Meat Science*, 64 (4): 507-512.
- Beltrán, J. A., Jaime, I., Santolaria, P., Sañudo, C., Albertí, P. & Roncalés, P. (1997). Effect of stress-induced high post-mortem pH on protease activity and tenderness of beef. *Meat Science*, 45 (2): 201-207.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., Le Cunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. & Hocquette, J. F. (2007). New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J Agric Food Chem*, 55 (13): 5229-37.
- Bhat, Z. F., Kumar, S. & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (9): 5377-5392.
- Bio-techno. (2018). *Mouse Decorin Antibody*. Tilgjengelig fra: https://www.rndsystems.com/products/mouse-decorin-antibody_af1060.
- Blumenthal, D. K. & Stull, J. T. (1980). Activation of Skeletal Muscle Myosin Light Chain Kinase by Calcium(2+) and Calmodulin. *Biochemistry*, 19.
- Boehm, M. L., Kendall, T. L., Thompson, V. F. & Goll, D. E. (1998). Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *Journal of animal science*, 76 (9): 2415-34.

- Boel, E., Bech, A. M., Randrup, K., Draeger, B., Fiil Neils, P. & Foltmann, B. (1986). Primary structure of a precursor to the aspartic proteinase from *Rhizomucor miehei* shows that the enzyme is synthesized as a zymogen. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1 (4): 363-369.
- Boland, M. (2013). Chapter Four - Kiwifruit Proteins and Enzymes: Actinidin and Other Significant Proteins. I: Boland, M. & Moughan, P. J. (red.) b. 68 *Advances in Food and Nutrition Research*, s. 59-80: Academic Press.
- Boleman, S. J., Boleman, S. L., Miller, R. K., Taylor, J. F., Cross, H. R., Wheeler, T. L., Koochmaraie, M., Shackelford, S. D., Miller, M. F., West, R. L., et al. (1997). Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *Journal of Animal Science*, 75 (6): 1521-1524.
- Bowker, B. C., Fahrenholz, T. M., Sarnoski, P. J. & Solomon, M. B. (2012). Alterations in the Sarcoplasmic Protein Fraction of Beef Muscle with Postmortem Aging and Hydrodynamic Pressure Processing. *Journal of Food Science*, 77 (6): C594-C602.
- Bradford, M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, b. 72. 248-54 s.
- BRENDA. (2018). Information on EC 3.4.22.14 - actinidain. Tilgjengelig fra: <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.22.14#SYNONYMS> (lest 07.08.18).
- Brooks, C. (2007). *Marinating of Beef for Enhancement*. Tilgjengelig fra: https://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/PE_Fact_Sheets/Marinating_of_Beef_for_Enhancement.pdf (lest 21.02.2018).
- Calkins, C. R. & Sullivan, G. (2007). Adding Enzymes to Improve Beef Tenderness: National Cattlemen's Beef Association
- CellSignaling. (2010a). *T14 Antibody*: Cell Signaling Technology, Inc. Tilgjengelig fra: <https://media.cellsignal.com/pdf/2458.pdf> (lest 30.07.2018).
- CellSignaling. (2010b). *Troponin T Antibody*: Cell Signaling Technology. Tilgjengelig fra: <https://media.cellsignal.com/pdf/5593.pdf> (lest 30.07.2018).
- Chen, S. & Birk, D. E. (2013). The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *FEBS Journal*, 280 (10): 2120-2137.
- Christensen, M., Tørngren, M. A., Gunvig, A., Rozlosnik, N., Lametsch, R., Karlsson, A. H. & Ertbjerg, P. (2009). Injection of marinade with actinidin increases tenderness of porcine M. biceps femoris and affects myofibrils and connective tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (9): 1607-1614.
- Damodaran, S., Parkin, K. & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry*, b. 4.: Taylor and Francis group.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M. & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124 (4): 1296-1307.
- Di Bernardini, R., Mullen, A. M., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E. & Hayes, M. (2012). Assessment of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and characterisation of associated bioactive peptidic fractions. *Meat Science*, 90 (1): 226-235.
- Donaldson, B., Rush, E., Young, O. & Winger, R. (2014). Variation in Gastric pH May Determine Kiwifruit's Effect on Functional GI Disorder: An in Vitro Study. *Nutrients*, 6 (4): 1488-1500.
- Dransfield, E. (1994). Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Science*, 36 (1): 105-121.
- Ertbjerg, P. & Puolanne, E. (2017). Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review. *Meat Science*, 132: 139-152.
- FAO/WHO. (1991). Protein quality evaluation
- Fasting, S. (2016). *Muskelvev*. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/muskelvev>. (lest 22.05.2018).
- FDA. (1999). *Food Additive Status List*. Tilgjengelig fra: <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm#ftnB> (lest 12.06.2018).

- FDA. (2018). *Food Additive Status List*. Tilgjengelig fra: <https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm#ftnB> (lest 04.01.2018).
- Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B. & Vogel, J. (2009). Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *ELECTROPHORESIS*, 30 (11): 1845-1855.
- Geesink, G. H., Taylor, R. G. & Koohmaraie, M. (2005). Calpain 3/p94 is not involved in postmortem proteolysis1,2. *Journal of Animal Science*, 83 (7): 1646-1652.
- Gil, M., Ramirez, J. A., Pla, M., Arino, B., Hernandez, P., Pascual, M., Blasco, A., Guerrero, L., Hajos, G., Szerdahelyi, E. N., et al. (2006). Effect of selection for growth rate on the ageing of myofibrils, meat texture properties and the muscle proteolytic potential of m. longissimus in rabbits. *Meat Sci*, 72 (1): 121-9.
- Gilda, J. E., Ghosh, R., Cheah, J. X., West, T. M., Bodine, S. C. & Gomes, A. V. (2015). Western blotting inaccuracies with unverified antibodies: need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PLoS One*, 10 (8): e0135392.
- Gomes, A., Potter, J. & Danuta, S.-C. (2002). The Role of Troponins in Muscle Contraction. *IUBMB Life*, 54 (6): 323-333.
- Gu, R.-Z., Liu, W.-Y., Lin, F., Jin, Z.-T., Chen, L., Yi, W.-X., Lu, J. & Cai, M.-Y. (2012). Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of oligopeptides derived from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle. *Food Research International*, 49 (1): 326-333.
- Ha, M., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A. & Hopkins, D. L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*, 134 (1): 95-105.
- Ha, M., Bekhit, A. E.-D., Carne, A. & Hopkins, D. L. (2013a). Characterisation of kiwifruit and asparagus enzyme extracts, and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*, 136 (2): 989-998.
- Ha, M., Bekhit, A. E.-D., Carne, A. & Hopkins, D. L. (2013b). Comparison of the Proteolytic Activities of New Commercially Available Bacterial and Fungal Proteases toward Meat Proteins. *Journal of Food Science*, 78 (2): C170-C177.
- Han, J., Morton, J. D., Bekhit, A. E. D. & Sedcole, J. R. (2009). Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness. *Meat Science*, 82 (3): 324-330.
- Healthcare, G. (2011). *ImageQuant™ TL User manual*. Tilgjengelig fra: https://nba.uth.tmc.edu/Assets/pdf/other/typhoon_supporting_files/IQTL_GettingStarted.pdf (lest 26.02.2018).
- Helsedirektoratet. (2017). Utviklingen i norsk kosthold 30-38 s.
- Helseinformatikk, N. (2016). *Diabetes type 2*. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/sykdommer/hormoner-og-naring/diabetes-type-2/type-2-diabetes-oversikt/> (lest 09.04.2018).
- Herod, T. W., Chambers, N. C. & Veres, S. P. (2016). Collagen fibrils in functionally distinct tendons have differing structural responses to tendon rupture and fatigue loading. *Acta Biomaterialia*, 42: 296-307.
- Herring, H. K., Cassens, R. G. & Briskey, E. J. (1965). Sarcomere length of free and restrained bovine muscles at low temperature as related to tenderness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 16 (7): 379-384.
- Hildebrand, A., Romarís, M., Rasmussen, L. M., Heinegård, D., Twardzik, D. R., Border, W. A. & Ruoslahti, E. (1994). Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochemical Journal*, 302 (Pt 2): 527-534.
- Hildrum, K. I., Rødbotten, R., Høy, M., Berg, J., Narum, B. & Wold, J. P. (2009). Classification of different bovine muscles according to sensory characteristics and Warner Bratzler shear force. *Meat Science*, 83 (2): 302-307.
- Hopkins, D. L. & Geesink, G. H. (2009). *Protein degradation postmortem and tenderization*
- Huff Lonergan, E., Zhang, W. & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86 (1): 184-195.

- Huxley, H. E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science*, 164 (3886): 1356-1365.
- Ichishima, E. (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes*, b. 1.
- Instron. (2005). *Food Texture Fixtures*. Tilgjengelig fra: <http://www.instron.fr/-/media/literature-library/products/2005/10/food-texture-warner-bratzler.pdf?la=en> (lest 17.02.2018).
- Kamphuis, I. G., Drenth, J. & Baker, E. N. (1985). Thiol proteases: Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *Journal of Molecular Biology*, 182 (2): 317-329.
- Kaur, L., Rutherford, S. M., Moughan, P. J., Drummond, L. & Boland, M. J. (2010a). Actinidin Enhances Gastric Protein Digestion As Assessed Using an in Vitro Gastric Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (8): 5068-5073.
- Kaur, L., Rutherford, S. M., Moughan, P. J., Drummond, L. & Boland, M. J. (2010b). Actinidin Enhances Protein Digestion in the Small Intestine As Assessed Using an in Vitro Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (8): 5074-5080.
- Kaur, L. & Boland, M. (2013). Influence of kiwifruit on protein digestion *Advances i food and nutrition research* 68: 149-167.
- Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J. & Parr, T. (2010). Tenderness – An enzymatic view. *Meat Science*, 84 (2): 248-256.
- Kim, H.-K., Lee, S.-H. & Ryu, Y.-C. (2015). Tenderization of Bovine Longissimus Dorsi Muscle using Aqueous Extract from *Sarcodon aspratus*. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35 (4): 533-540.
- Knappeis, G. G. & Carlsen, F. (1968). THE ULTRASTRUCTURE OF THE M LINE IN SKELETAL MUSCLE. *The Journal of Cell Biology*, 38 (1): 202-211.
- Koohmaraie, M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science*, 43 (Supplement 1): 193-201.
- Koohmaraie, M. & Geesink, G. H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*, 74 (1): 34-43.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16 (9): 945-960.
- Lafarga, T. & Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, 98 (2): 227-239.
- Lafarga, T., Aluko, R. E., Rai, D. K., O'Connor, P. & Hayes, M. (2016). Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 81: 91-99.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P. & Bendixen, E. (2003). Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (24): 6992-6997.
- Lana, A. & Zolla, L. (2016). Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. *Journal of Proteomics*, 147 (Supplement C): 85-97.
- Lee, K.-A., Jung, S.-H. & Park, I. (2010). *Applications of Proteolytic Enzymes from Kiwifruit on Quality Improvements of Meat Foods in Foodservice*, b. 30.
- Lehman, W., Hatch, V., Korman, V., Rosol, M., Thomas, L., Maytum, R., Geeves, M. A., Van Eyk, J. E., Tobacman, L. S. & Craig, R. (2000). Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments¹¹Edited by W. Baumeister. *Journal of Molecular Biology*, 302 (3): 593-606.
- Lepetit, J. (2008). Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, 80 (4): 960-967.
- Lewis, D. & Luh, B. S. (1988). APPLICATION OF ACTINIDIN FROM KIWIFRUIT TO MEAT TENDERIZATION AND CHARACTERIZATION OF BEEF MUSCLE PROTEIN HYDROLYSIS. *Journal of Food Biochemistry*, 12 (3): 147-158.

- Lewis, D. & S. Luh, B. (2007). *Application of actinidin from kiwifruit to meat tenderization and characterization of beef muscle protein hydrolysis*, b. 12. 147-158 s.
- Lian, T., Wang, L. & Liu, Y. (2013). A New Insight into the Role of Calpains in Post-mortem Meat Tenderization in Domestic Animals: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26 (3): 443-454.
- LifeTechnologies. (2015). *NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 12-well*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/NP0322BOX> (lest 28.07.2018).
- Listrat, A., Leuret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Picard, B. & Bugeon, J. (2016). How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *The Scientific World Journal*, 2016: 3182746.
- Liu, C., Xiong, Y. L. & Rentfrow, G. K. (2011). Kiwifruit protease extract injection reduces toughness of pork loin muscle induced by freeze-thaw abuse. *LWT - Food Science and Technology*, 44 (10): 2026-2031.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193 (1): 265-275.
- Mahmood, T. & Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4 (9): 429-434.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R. & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Nutrition Society*, 62: 337-347.
- Marques, A., Maróstica, M. R. & Pastore, G. M. (2010). Some Nutritional, Technological and Environmental Advances in the Use of Enzymes in Meat Products. *Enzyme Research*, 2010: 480923.
- Marsh, B. B. (1977). The Basis of Quality in Muscle Foods THE BASIS OF TENDERNESS IN MUSCLE FOODS. *Journal of Food Science*, 42 (2): 295-297.
- Martonosi, A. N. (2000). Animal electricity, Ca²⁺ and muscle contraction. A brief history of muscle research. *Acta Biochim Pol*, 47 (3): 493-516.
- MatPrat. (2018). *Oppdelingsguiden Storfe*. Tilgjengelig fra: <https://www.matprat.no/matnyttig/oppdelingsguiden/storfe/> (lest 03.08.2018).
- Matsui, T., Oki, T. & Osajima, Y. (1999). *Isolation and Identification of Peptidic α -Glucosidase Inhibitors Derived from Sardine Muscle Hydrolyzate*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 54, 3-4. 259 s.
- Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C. & Yada, R. Y. (2017). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 1-17.
- MBInfo. (2018). Tilgjengelig fra: <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-are-contractile-fibers/how-does-actomyosin-facilitate-contraction-in-muscle-and-non-muscle-cells/> (lest 15.05.18).
- McDowall, M. A. (1970). Anionic proteinase from *Actinidia chinensis*. Preparation and properties of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem*, 14 (2): 214-21.
- Melody, J. L., Lonergan, S. M., Rowe, L. J., Huiatt, T. W., Mayes, M. S. & Huff-Lonergan, E. (2004). Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *Journal of animal science*, 82: 1195–1205.
- Miller, E. J. & Kent Rhodes, R. (1982). Preparation and characterization of the different types of collagen. I: b. 82 *Methods in Enzymology*, s. 33-64: Academic Press.
- Minekus, Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M. & Dupont, D. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5 (6): 1113-1124.
- Minekus, M., Marie, A., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., et al. (2014). *A standardised static in-vitro digestion method suitable for food – an international consensus*.
- Miroshnichenko, N. S., Balanuk, I. V. & Nozdrenko, D. N. (2000). PACKING OF MYOSIN MOLECULES IN MUSCLE THICK FILAMENTS. *Cell Biology International*, 24 (6): 327-333.

- Montoya, C. A., Rutherford, S. M., Olson, T. D., Purba, A. S., Drummond, L. N., Boland, M. J. & Moughan, P. J. (2014). Actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) increases the digestion and rate of gastric emptying of meat proteins in the growing pig. *British Journal of Nutrition*, 111 (6): 957-967.
- Mostafaie, A., Bidmeshkipour, A., Shirvani, Z., Mansouri, K. & Chalabi, M. (2008). Kiwifruit Actinidin: A Proper New Collagenase for Isolation of Cells from Different Tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144 (2): 123-131.
- Nishimura, T., Hattori, A. & Takahashi, K. (1996). Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during post-mortem ageing of beef. *Meat Science*, 42 (3): 251-260.
- Nishimura, T. (2010). The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Animal Science Journal*, 81 (1): 21-27.
- Nishimura, T. (2015). Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. *Meat Science*, 109: 48-55.
- Ohyama, H., Enomoto, T. & Mitsunaga, S. (1997). Variety of kiwi fruit proteases and their collagenolytic activity. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science (Japan)*.
- Paredi, G., Raboni, S., Bendixen, E., Almeida, A. M. & Mozzarelli, A. (2012). "Muscle to meat" molecular events and technological transformations: the proteomics insight. *J Proteomics*, 75 (14): 4275-89.
- Parikh, A., Agarwal, S. & Raut, K. (2014). A REVIEW ON APPLICATIONS OF MALTODEXTRIN IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IJPBS)* 4(4): 67-74.
- Pastorello, E. A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R., Ispano, M., Incorvaia, C., Giuffrida, M. G. & Ortolani, C. (1998). Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101 (4): 531-537.
- Pedersen, M. E., Kulseth, M. A., Kolset, S. O., Velleman, S. & Eggen, K. H. (2001). DECORIN AND FIBROMODULIN EXPRESSION IN TWO BOVINE MUSCLES (M. SEMITENDINOSUS AND M. PSOAS MAJOR) DIFFERING IN TEXTURE. *Journal of Muscle Foods*, 12 (1): 1-17.
- Pereira, P. & Vicente, A. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93 (3): 586-592.
- Pette, D. & Staron, R. S. (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. I: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 116*, s. 1-76. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Phenomenex. (2018). *BioSep-SEC-S HPLC Information*. Tilgjengelig fra: <https://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/BioSep-SEC-S/> (lest 02.02.2018).
- Pietrasik, Z. & Shand, P. J. (2011). Effects of moisture enhancement, enzyme treatment, and blade tenderization on the processing characteristics and tenderness of beef semimembranosus steaks. *Meat Science*, 88 (1): 8-13.
- Preetha, S. & Boopathy, R. (1997). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13 (5): 573-578.
- Purslow, P. P. (2005). Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science*, 70 (3): 435-447.
- Purslow, P. P., Archile-Contreras, A. C. & Cha, M. C. (2012). MEAT SCIENCE AND MUSCLE BIOLOGY SYMPOSIUM: Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue^{1,2}. *Journal of Animal Science*, 90 (3): 950-959.
- Purslow, P. P. (2014). New Developments on the Role of Intramuscular Connective Tissue in Meat Toughness. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5 (1): 133-153.
- R&D-Systems. (2018). *Myosin Heavy Chain Antibody*. Tilgjengelig fra: https://www.rndsystems.com/products/myosin-heavy-chain-antibody-mf20_mab4470?gclid=CjwKCAjw7vraBRBbEiwA4WBOn3t8W0jzSA5EplcAdTQ34n1h4Nj6_w0sLZNz5PzpDuXe-zbqJoEoHhoCWqkQAvD_BwE (lest 30.07.2018).

- Rafii, M. S., Hagiwara, H., Lynn, M. M., S, S. N., Tianshun, X., Tracey, D., T, O. R., Magnus, H., David, M., F, Y. M., et al. (2006). Biglycan binds to α - and γ -sarcoglycan and regulates their expression during development. *Journal of Cellular Physiology*, 209 (2): 439-447.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A. & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*, 46.
- Resources, I. (2009). *Product specifications Kiwi Fruit Powder Extract* Ingredient Resources. Upublisert manuskript.
- Reuter, B. J., Wulf, D. M. & Maddock, R. J. (2002). Mapping intramuscular tenderness variation in four major muscles of the beef round1. *Journal of Animal Science*, 80 (10): 2594-2599.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3 (1): a004978.
- Roughley, P. J. (2006). THE STRUCTURE AND FUNCTION OF CARTILAGE PROTEOGLYCANS. *European Cells and Materials*, 12: 92-101.
- Rutherford, S. M., Montoya, C. A., Zou, M. L., Moughan, P. J., Drummond, L. N. & Boland, M. J. (2011). Effect of actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on the digestion of food proteins determined in the growing rat. *Food Chemistry*, 129 (4): 1681-1689.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F. & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3 (9): 765-91.
- Ryder, K., Ha, M., Bekhit, A. E.-D. & Carne, A. (2015). Characterisation of novel fungal and bacterial protease preparations and evaluation of their ability to hydrolyse meat myofibrillar and connective tissue proteins. *Food Chemistry*, 172: 197-206.
- Rødbotten, R., Enersen, G., Veiseth-Kent, E. & Berg, J. (2011). Mer mørt kjøtt fra "nye" storfemusklar. Rønning, S., E.Pedersen, M., Kirkhus, B., Rødbotten, R. & Lindberg, D. (2016). *Bioaktivitet av peptidfraksjoner fra restråstoff –fremstilling, funksjon og markedsmuligheter*. Tilgjengelig fra: <http://docplayer.me/43641638-Bioaktivitet-av-peptidfraksjoner-fra-restrastoff-fremstilling-funksjon-og-markedsmuligheter.html> (lest 27.02.2018).
- Saiga, A., Tanabe, S. & Nishimura, T. (2003). Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (12): 3661-3667.
- Saladin, K. S. (2010). *Anatomy and physiology: The Unity of Form and Function*. 5 utg.: McGraw-Hill
- Sand, O., Sjaastad, Ø. V., Haug, E. & Bjålie, J. G. (2006). *Menneskekroppen- fysiologi og anatomi* 2utg.: Gyldendal Norsk Forlag AS 540-588 s.
- Santarelli, R. L., Pierre, F. & Corpet, D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*, 60 (2): 131-144.
- Saper, C. (2011). The Antibody Registry. *Journal of Comparative Neurology*.
- Savell, J. W. & Shackelford, S. D. (1992). Significance of Tenderness to the Meat Industry *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, 45.
- Schmidt, J. S., Lauridsen, M. B., Dragsted, L. O., Nielsen, J. & Staerk, D. (2012). Development of a bioassay-coupled HPLC-SPE-ttNMR platform for identification of α -glucosidase inhibitors in apple peel (*Malus x domestica* Borkh.). *Food Chemistry*, 135 (3): 1692-1699.
- Schönherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J. & Kresse, H. (1995). Interaction of Biglycan with Type I Collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 2776-2783.
- Sentandreu, M. A., Coulis, G. & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (12): 400-421.
- Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. & Koohmaraie, M. (1997). Repeatability of tenderness measurements in beef round muscles1. *Journal of Animal Science*, 75 (9): 2411-2416.
- Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., Ijiri, Y. & Yamamoto, J. (2009). Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research*, 123 (5): 753-757.

- Solaro, R. J. & Leinwand, L. A. (2012). Chapter 13 - Role of Sarcomeres in Cellular Tension, Shortening, and Signaling in Cardiac Muscle A2 - Hill, Joseph A. I: Olson, E. N. (red.) *Muscle*, s. 161-172. Boston/Waltham: Academic Press.
- Sugiyama, S., Ohtsuki, K., Sato, K. & Kawabata, M. (1996). Purification and Characterization of Six Kiwifruit Proteases Isolated with Two Ion-exchange Resins, Toyopearl-SuperQ and Bakerbond WP-PEI. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60 (12): 1994-2000.
- Sugiyama, S., Hirota, A., Okada, C., Yorita, T., Sato, K. & Ohtsuki, K. (2005). Effect of Kiwifruit Juice on Beef Collagen. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 51 (1): 27-33.
- Sullivan, G. A. & Calkins, C. R. (2010). Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*, 85 (4): 730-734.
- Sun, Q., Chen, F., Geng, F., Luo, Y., Gong, S. & Jiang, Z. (2018). A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food Chemistry*, 245: 570-577.
- Sun, Y., Pan, D., Guo, Y. & Li, J. (2012). Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (10): 3397-3404.
- Taylor, S. C., Berkelman, T., Yadav, G. & Hammond, M. (2013). A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Molecular Biotechnology*, 55 (3): 217-226.
- ThermoFisher. (2009). *Western Blotting Using the iBlot® 7-Minute Blotting System*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/western-blot-protocol/western-blotting-using-dry-blotting-system.html> (lest 26.02.2018).
- ThermoFisher. (2015). *Protein transfer technical handbook* Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/protein-transfer-technical-handbook.pdf> (lest 23.02.2018).
- ThermoFisher. (u.å.-a). *NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 12-well*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/NP0322BOX>.
- ThermoFisher. (u.å.-b). *NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X)*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/NP000202?SID=srch-srp-NP000202> (lest 05.08.2018).
- ThermoFisher. (u.å.-c). *NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X)*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/NP0001> (lest 05.08.2018).
- Toohy, E. S., Kerr, M. J., van de Ven, R. & Hopkins, D. L. (2011). The effect of a kiwi fruit based solution on meat traits in beef m. semimembranosus (topside). *Meat Science*, 88 (3): 468-471.
- Tornberg, E. (1996). Biophysical aspects of meat tenderness. *Meat Science*, 43: 175-191.
- Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Giménez, B., Roncalés, P. & Beltrán, J. A. (2003). Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science*, 64 (1): 85-91.
- Totland, G. K., Kryvi, H. & Slinde, E. (1988). Composition of muscle fibre types and connective tissue in bovine M. semitendinosus and its relation to tenderness. *Meat Science*, 23 (4): 303-315.
- Udenigwe, C. C. & Howard, A. (2013). Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Research International*, 54 (1): 1021-1032.
- Veiseth-Kent, E., Pedersen, M. E., Ronning, S. B. & Rodbotten, R. (2018). Can postmortem proteolysis explain tenderness differences in various bovine muscles? *Meat Science*, 137: 114-122.
- Verma, S., Dixit, R. & Pandey, K. C. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in Pharmacology*, 7: 107.
- Verollet, R. (2008). A Major Step Towards Efficient Sample Preparation with Bead-Beating. *BioTechniques*, 44 (6): 832-833.
- Vesentini, S., Redaelli, A. & Montevecchi, F. M. (2005). Estimation of the binding force of the collagen molecule-decorin core protein complex in collagen fibril. *Journal of Biomechanics*, 38 (3): 433-443.

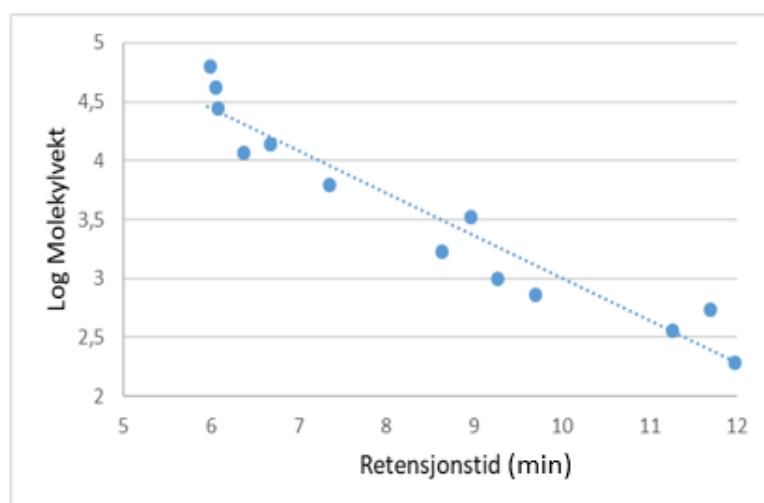
- Wada, M., Suzuki, T., Yaguti, Y. & Hasegawa, T. (2002). The effects of pressure treatments with kiwi fruit protease on adult cattle semitendinosus muscle. *Food Chemistry*, 78 (2): 167-171.
- Wada, M., Hosaka, M., Nakazawa, R., Kobayashi, Y. & Hasegawa, T. (2004). The Solubilization of Unheated Cattle Achilles Tendon with Actinidin under Neutral and Acidic Conditions. *Food Science and Technology Research*, 10 (1): 35-37.
- Wang, K., McClure, J. & Tu, A. (1979). Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (8): 3698-3702.
- Watanabe, J., Kawabata, J., Kurihara, H. & Niki, R. (1997). Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61 (1): 177-178.
- Wen, S., Zhou, G., Song, S., Xu, X., Voglmeir, J., Liu, L., Zhao, F., Li, M., Li, L., Yu, X., et al. (2015). Discrimination of in vitro and in vivo digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish. *Proteomics*, 15 (21): 3688-98.
- Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Lansdell, J. L., Siragusa, G. R. & Miller, M. F. (1993). Effects of postmortem injection time, injection level, and concentration of calcium chloride on beef quality traits. *Journal of Animal Science*, 71 (11): 2965-2974.
- Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64 (s4): S113-S119.
- Witt, C. C., Burkart, C., Labeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H. & Labeit, S. (2006). Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure *in vivo*. *The EMBO Journal*, 25 (16): 3843-3855.
- Wojdyło, A., Nowicka, P., Oszmiański, J. & Golis, T. (2017). Phytochemical compounds and biological effects of Actinidia fruits. *Journal of Functional Foods*, 30: 194-202.
- Xargayó, M., Lagares, J., Fernández, E., Ruiz, D. & Borrell, D. (2001). Marination of fresh meats by means of spray effect: influence of spray injection on the quality of marinated products.
- Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I. & Kiso, H. (1982). Proteolytic Enzymes in Green Asparagus, Kiwi Fruit and Miut: Occurrence and Partial Characterization. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46 (8): 1983-1986.
- Yang, J., Teplyakov, A. & Quail, J. W. (1997). Crystal structure of the aspartic proteinase from *Rhizomucor miehei* at 2.15 Å resolution¹¹Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 268 (2): 449-459.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., Liu, J. & Chen, F. (2011). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry*, 129 (4): 1376-1382.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J. & Chen, F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. *Food Chemistry*, 135 (3): 2078-2085.
- Zambrowicz, A., Pokora, M., Setner, B., Dąbrowska, A., Szołtysik, M., Babij, K., Szewczuk, Z., Trziszka, T., Lubec, G. & Chrzanowska, J. (2015). Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization. *Amino Acids*, 47 (2): 369-380.
- Zhang, B., Sun, Q., Liu, H.-J., Li, S.-Z. & Jiang, Z.-Q. (2017). Characterization of actinidin from Chinese kiwifruit cultivars and its applications in meat tenderization and production of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *LWT - Food Science and Technology*, 78 (Supplement C): 1-7.

9. Vedlegg

Vedlegg 9.1: Forbindelsene med kjent molekylvekt (g/mol) med tilhørende retensjonstid (RT) som ble kjørt sammen med prøvene fra vannløselig fase for å lage kalibreringskurven tilhørende SEC analysen.

Navn på forbindelse	g/mol	RT
Bovine albumin	66000	5,96
Albumin fra kylling eggehvite	44287	6,031
Carbonic anhydrase	29000	6,058
Lysosyme	14300	6,652
Cytochrome c fra storfe hjerte	12327	6,35
Aprotinin fra storfe lunge	6511	7,331
Insulin Chain B oksidert fra storfe pankreas	3496	8,936
Renin Substrat Tetradecapeptid gris	1759	8,61
Angiotensin II human	1046	9,25
Bradykinin Fragment 1-7	757	9,676
Val-Tyr-Val	379	11,246
[D-Ala ²]-Leucine enkephalin	570	11,674
Trp	204	11,956

Vedlegg 9.2: Kalibreringskurve for SEC analysen laget fra forbindelsene med kjente molekylvekter og logaritmisk skala er benyttet for å få lineært forhold på grafen.





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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway