

Endringer i biokjemi og
kvalitetsparametre ved lagring og
varmebehandling av atlantisk makrell
(*Scomber scombrus*)

Magnhild Seim Grøvlen

Industriell kjemi og bioteknologi
Innlevert: juni 2017
Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Forord

Denne mesteroppgaven er en del sivilingeniørstudiet Industriell kjemi og bioteknologi (MTKJ) ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), og er utført ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap. Oppgaven er tilknyttet prosjektet ProHealth, et samarbeidsprosjekt mellom NTNU, SINTEF Oceans, Teagasc Food Research Centre (Irland), National Marine Fisheries Research Institute (Polen) og Nutrition and clinical biochemistry lab (Italia).

Først vil jeg takke min hovedveileder ved NTNU, professor Turid Rustad for utrolig god veiledning og mange gode råd underveis i prosessen. Jeg er takknemlig for at du har tatt deg tid til å diskutere, svare på spørsmål og korrekturlese oppgaven. Din interesse for fagfeltet smitter over på oss studenter.

En stor takk går til Trude Johansen og ingeniør Siri Stavrum ved NTNU som har vært til stor hjelp under laboratoriearbeidet. Dere har gitt råd og tips til analysemetoder og funnet frem bortgjemte kjemikalier og utstyr og utført HPLC-analyse. Jeg vil takke postdoktor Janna Cropotova for resultater til denne oppgaven og samarbeid på laboratoriet. En takk går også til Emilia og Line for lipid- og vanninnholdresultater. En stor takk til alle medlaboranter som bidrar til et godt sosial miljø på laboratoriet, og takk til Marit som har holdt meg med selskap helt til siste innsjutt av mesteroppgaven.

En varm takk rettes til familien min for god støtte og motivasjon underveis i studiet. Takk for at dere alltid har tro på meg! Takk pappa Øystein, for korrekturlesing av oppgaven, og takk mamma Grethe for at du stiller opp når jeg trenger deg. En stor takk rettes også til alle venner som lyser opp hverdagen. Uten dere ville ikke studietiden vært den samme!

Til slutt vil jeg takke de omtrent 140 makrellene som har gjort denne oppgaven mulig!

Trondheim, juni 2017

Magnhild Seim Grøvlen

Sammendrag

Atlantisk makrell er en pelagisk fisk som finnes i norske farvann. Makrell er rik på viktige næringsstoffer som lipider og proteiner, og er en god matressurs i et sunt kosthold. Under prosessering og lagring kan verdifulle komponenter i fiskekjøttet ødelegges eller gå tapt. For å utvikle produkter med god kvalitet og holdbarhet, er det derfor behov for å optimalisere prosessering og lagring av pelagiske råmaterialer.

Dette arbeidet hadde to hovedmål. Et mål var å optimalisere kjølelagring av makrellfileter, og endringer i kvalitet og biokjemiske egenskaper ble studert gjennom kjøling på is (4°C, 7 dager) og superkjøling (-2°C, 19 dager). Fryselagring (-20°C, 1 måned) ble brukt som referanse. Et annet mål med dette arbeidet var å studere effekten av ulik varmebehandling og påfølgende lagring på endringer i ulike kvalitetsparametre. Vakuumpakkede makrellfileter ble varmebehandlet i vannbad ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter og lagret kjøling på is (4°C) i 1, 3 og 7 dager.

Makrell hadde akseptabelt antall bakterier til og med dag 5 ved kjølelagring, og gjennom hele lagringsperioden ved superkjøling. Det er ønskelig å redusere drypp-tap under prosessering, ettersom drypp er et godt vekstmedium for bakterier og et resultat av ødelagte membraner. Drypptapet økte signifikant gjennom lagringsperioden, og kjølte fileter hadde høyere drypptap enn superkjølte. Mengde cellevevsvæske (CTF) er et mål på ødeleggelse av membraner og økte signifikant under superkjølt lagring.

Superkjøling resulterte i lysere fileter enn kjølt lagring. Kjølte makrellfileter ble lysere og mykere under lagring, mens superkjølte fileter ble hardere og hadde liten variasjon i lyshet. Fryste fileter hadde størst lyshet og var mykere enn de superkjølte. Endring i tekstur kan skyldes endring i proteinløselighet som følge av denaturering eller ødeleggelser ved frysing/tining. Mengde vannløselige proteiner ble signifikant redusert ved superkjøling, mens en ikke-signifikant reduksjon ble funnet for kjølte fileter. Denaturering av myofibrillproteiner førte til en reduksjon på 85 % i mengde saltløselige proteiner under superkjølt lagring, og på dag 19 var mengden saltløselige proteiner under 2 % av våtvekt.

Proteinoksidasjon ble studert gjennom kvantifisering av karbonylgrupper. Saltløselige proteiner hadde større karbonylinnhold enn vannløselige proteiner, så myofibrillproteiner i løsning var mer oksiderte enn de løste sarkoplasmaproteinene. Karbonylinnholdet (nmol/mg protein) i saltløselige proteiner økte signifikant under superkjølt lagring.

Proteolytiske enzymer bryter ned muskelproteiner, og i dette studiet ble proteolytisk aktivitet bestemt ved å studere aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer. Den totale aktiviteten økte ved kjølelagring. Aktiviteten økte fra dag 1 til dag 9 i superkjølte fileter før den gikk ned. Økt total aktivitet skyldes trolig nedbrytning av inhibitorer. Katepsin B+L-lignende aktivitet i cellevevsvæske var stabil for kjølte makrellfiler, men økte signifikant ved superkjølt lagring. Forholdet mellom aktivitet i cellevevsvæske og total aktivitet er et mål på grad av lysosomal ødeleggelse, og superkjølt lagring førte til økt ødeleggelse av lysosomer. Proteolytisk aktivitet resulterte i signifikant økning i mengde frie aminosyrer ved både superkjølt og kjølt lagring, og fritt histidin dominerte for alle makrellfiletene.

Varmebehandling har lenge vært en vanlig prosesseringsmetode for å sikre trygg og holdbar mat, og siden fisk er sensitiv mot termisk behandling, er det ønskelig å forkorte tiden og senke temperaturen. Tid og temperatur under varmebehandlingen påvirket ikke vanninnholdet til makrellfiletene, og alle prøvene hadde god mikrobiell holdbarhet gjennom lagringsperioden. Væsketapet økte med økende temperatur og tid i vannbad, men gikk ned gjennom lagringsperioden ettersom noe av væsken ble gjenabsorbent av muskelen. Høyere prosesseringstemperatur førte til lysere fileter, og lysheten økte ytterligere ved kjølelagring.

Termisk denaturering av proteiner førte til lav mengde vann- og saltløselige proteiner. Mest løselige proteiner ble funnet ved 60°C. Mengde vannløselige proteiner var 1,45 % av våtvekt eller lavere, og størst mengde saltløselige proteiner var 0,63 % av våtvekt. Ved lagring gikk mengde vannløselige proteiner ytterligere ned, mens mindre variasjon ble funnet for mengde saltløselige proteiner. Både vann- og saltløselige proteiner hadde en signifikant økning i karbonylinnhold og var derfor mer oksidert etter varmebehandling. Varmebehandling ved 60°C resulterte i makrellfileter med høyere kvalitet enn prosessering ved høyere temperaturer, med tanke på denaturering av muskelproteiner, oksidasjon av proteiner og væsketap.

Abstract

Atlantic mackerel is a pelagic fish found in Norwegian waters. Mackerel is a good source of nutrients such as lipids and proteins, and is a valuable food resource in a healthy diet. Processing and storage may lead to loss or destruction of the valuable healthy components, and optimal processing technologies and optimal storage conditions are required to produce safe products of good quality with a long shelf life. This work had two main goals. The first was to optimize storage of mackerel fillets, and biochemical and quality changes were studied through chilling on ice (4°C, 7 days) and superchilling (-2°C, 19 days). Frozen storage (-20°C, 1 month) was used as reference. The second goal was to study which effect different heat treatments followed by chilled storage had on changes in different quality parameters. Vacuum packed mackerel fillets were heat treated in water bath at 60, 75 and 90°C in 10, 15 and 20 minutes, and stored chilled on ice (4°C) in 1, 3 and 7 days.

Mackerel had acceptable numbers of bacteria up to 5 days of chilled storage, and throughout the entire superchilled storage period. It is desirable to reduce drip loss during processing since drip is a result of degraded membranes and a good growth medium for bacteria. The drip loss increased significantly under storage, and chilled fillets had higher drip loss than superchilled. Amount of cell tissue fluid (CTF) can be used to measure degradation of membranes and increased significantly during superchilled storage.

The superchilled fillets were lighter than the chilled. Chilled mackerel fillets increased in lightness and became softer during storage, while superchilled fillets became harder and showed little variation in lightness. Frozen fillets had the highest lightness and were softer than those that were superchilled. Changes in texture can be due to changes in protein solubility as a result of denaturation during freezing/thawing. The amount of water soluble proteins was significantly reduced during superchilling, while no significant reduction was found for chilled fillets. Denaturation of myofibrillar proteins led to 85 % less salt soluble proteins during superchilled storage, and at day 19, the amount of salt soluble proteins was less than 2 % of wet weight.

Protein oxidation was studied through quantification of carbonyl groups. Salt soluble proteins contained more carbonyl groups than water soluble proteins, and the myofibrillar proteins in solution were more oxidized than the solvated sarco-plasma proteins. The carbonyl content (nmol/mg protein) in salt soluble proteins increased significantly during superchilled storage.

Proteolytic enzymes break down muscle proteins, and in this study, the proteolytic activity was determined by measuring the activity of cathepsin B+L like enzymes. The total activity increased during chilled storage, and increased between day 1 and 9 in superchilled fillets, before the activity decreased. Increase in total activity may be due to inactivated inhibitors. The activity of cathepsin B+L like enzymes in CTF was stable in chilled fillets, but increased significantly during superchilling. The ratio between the activity in CTF and total activity is a measure of lysosomal degradation, and superchilled storage led to increased degradation of lysosomes. Proteolytic activity resulted in significant increase in total amount of free amino acids in both superchilled and chilled fillets, and free histidine was dominant in all mackerel fillets.

Heat treatment is a common processing method to obtain safe food with extended shelf life. Since fish is sensitive to thermal treatment, it is desirable to reduce both temperature and time. Time and temperature during heat treatment did not affect the water content in the fillets, and all samples showed a acceptable microbial shelf life during storage. The liquid loss increased with increasing temperature and time in water bath, but decreased during storage since some of the liquid was absorbed in the muscle. Higher temperature during heat treatment led to lighter fillets, and the lightness increased further during storage.

Thermal denaturation of proteins resulted in a low amount of water and salt soluble proteins. The highest amount of soluble proteins were found at 60°C. The amount of water soluble proteins was 1,45 % of wet weight or lower, and the highest amount of salt soluble proteins was 0,63 % of wet weight. During storage, the amount of water soluble proteins decreased even further, while less variation was found in the amount of salt soluble proteins. The carbonyl content per mg protein increased significantly with increased processing temperature for both water and salt soluble proteins, and the proteins in solution were more oxidized after heat treatment. Heat treatment at 60°C resulted in mackerel fillets with higher quality than processing at higher temperatures, considering denaturation of muscle proteins, oxidation of proteins and liquid loss.

Symboler og forkortelser

AMC	4-methylcoumaryl-7-amid, fluorescerende forbindelse frigjort fra substrat ved proteolytisk enzymaktivitet
BGG	Bovin gamma globulin: Brukt som proteinstandard i proteinløselighetsanalyser
BSA	Bovin serum albumin: Brukt som proteinstandard i proteinoksidasjonsanalyser
CFU	Kolonidannende enheter
CSW	Sjøvann avkjølt ved hjelp av is (Chilled Sea Water)
CTF	Cellevevsvæske (Cell tissue fluid). Væske i ekstracellulær matriks som kan separeres ut ved hjelp av sentrifugering
DNP	2,4-dinitrofenylhydrazon
DNPH	Dinitrophenylhydrazin, benyttet til derivivering av karbonylgrupper for bestemmelse av proteinoksidasjon
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraacetat (Ethylene Diamine-Tetra-acetic Acid)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAA	Frie aminosyrer
HPLC	Høypresisjonsvæskekromatografi (High pressure liquid chromatography)
ROS	Reaktive oksygenforbindelser (reactive oxygen species)
RSW	Mekanisk nedkjølt sjøvann (Refrigerated sea water)
SD	Empirisk standardavvik (Standard Deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulphate)
SEM	Standardfeil (Standard Error of Mean)
SSP	Saltløselige proteiner, myofibrillproteiner (salt soluble prot.)
WSP	Vannløselige proteiner, sarkoplasmproteiner (water soluble prot.)

Innhold

1	Introduksjon	1
1.1	Bakgrunn	1
1.1.1	ProHealth-prosjekt	1
1.2	Atlantisk makrell (<i>Scomber scombrus</i>)	2
1.3	Kjemisk sammensetning av fiskemuskel	3
1.3.1	Lipider i muskel	4
1.4	Fiskemuskel	4
1.4.1	Mørk og lys muskel	5
1.4.2	Muskelproteiner	6
1.4.3	Vann i muskel	10
1.4.4	Fra muskel til kjøtt - postmortale prosesser	11
1.5	Proteolytiske enzymer	12
1.5.1	Katepsiner	13
1.5.2	Aktivitet til katepsin B+L i CTF	14
1.6	Proteinoksidasjon	14
1.6.1	Reaktive oksygenforbindelser (ROS)	15
1.6.2	Karbonylgrupper	17
1.6.3	Påvirkning på kjøttkvalitet	17
1.6.4	Bestemmelse av karbonylgrupper	18
1.6.5	ELISA-analyse for kvantifisering av karbonylgrupper	18
1.7	Lagringsmetoder	20
1.7.1	Kjøling av fisk	20
1.7.2	Superkjøling	21
1.7.3	Fryselagring	23
1.8	Varmebehandling	25
1.8.1	Effekt av varmebehandling på proteiner	26
1.8.2	Sous vide	27
1.9	Målet med dette arbeidet	29
2	Materialer og metoder	30
2.1	Kjemikalier	30
2.2	Eksperimentoppsett til lagringsforsøk	30
2.2.1	Lagring av makrell	32
2.2.2	Oversikt over analyser	33
2.3	Tillaging av CTF og homogenat	35
2.3.1	CTF	35
2.3.2	Homogenat av vann- og saltløselige proteiner	35
2.4	Kjemiske analyser	36
2.4.1	Proteininnhold	36

2.4.2	Mikrobiologi	37
2.4.3	Drypptap	37
2.4.4	Fargemåling	37
2.4.5	Tekstur	37
2.4.6	Vanninnhold	38
2.4.7	Lipidinnhold	39
2.4.8	Proteinoksidasjon	39
2.4.9	Aktivitet av katepsin B+L-lignende enzymer	41
2.4.10	Frie aminosyrer	42
2.5	Varmebehandling av makrell - Sous vide	43
2.5.1	Tillaging av homogenat	45
2.5.2	Proteininnhold	46
2.5.3	Proteinoksidasjon	46
2.5.4	Vanninnhold	47
2.6	Statistisk analyse	47
3	Resultater og diskusjon	48
3.1	Forsøk med lagring av makrell	48
3.1.1	Drypptap	49
3.1.2	Mengde cellevevsvæske (CTF)	50
3.1.3	Mikrobiell status	52
3.1.4	Farge og utseende	55
3.1.5	Tekstur	59
3.1.6	Proteinløselighet	62
3.1.7	Aktivitet av katepsin B+L	69
3.1.8	Proteinoksidasjon	76
3.1.9	Frie aminosyrer	81
3.2	Varmebehandling av makrell - Sous vide	86
3.2.1	Vanninnhold	86
3.2.2	Væsketap	88
3.2.3	Mikrobiell vekst	91
3.2.4	Farge og utseende	93
3.2.5	Tekstur	97
3.2.6	Proteinløselighet	101
3.2.7	Proteinoksidasjon	105
3.3	Videre arbeid	108
4	Konklusjon	109
	Bibliografi	111

A LABOLYTIC dyrkningsslide	i
B Drypptap	ii
B.1 Drypptap lagringsforsøk	ii
B.2 Væsketap sous vide	ii
C Mengde CTF	iv
D Mikrobiell status	vi
D.1 Mikrobiell status lagringsforsøk	vi
D.2 Mikrobiell status sous vide	vi
E Fargeparametre sous vide	viii
F Proteinløselighet	ix
F.1 Proteinløselighet lagringsforsøk	ix
F.2 Proteinløselighet sous vide	xv
G Katepsin B+L-lignende aktivitet	xxii
G.1 Enzymaktivitet i homogenat	xxii
G.2 Enzymaktivitet i CTF	xxiv
H Proteinkarbonylgrupper	xxv
H.1 Proteinkarbonyl lagringsforsøk	xxv
H.2 Proteinkarbonyl sous vide	xxviii
I Bestemmelse av frie aminosyrer	xxix
J Vanninnhold Sous vide	xxx
K Korrelasjon	xxxii
L Excelark	xxxv

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Makrell er en pelagisk fisk som fiskes i norske farvann. Mye eksporteres, men en del prosesseres i Norge. Pelagisk fisk er rik på omega-3-lipider, lettfordøyelige proteiner og E- og D- vitaminer, og er en god matressurs til et sunt kosthold. Prosessering og lagring av pelagisk fisk kan føre til tap eller ødeleggelse av verdifulle komponenter i fiskekjøttet, ved for eksempel oksidasjon av proteiner eller lipider. Videre kan mikrobiell forurensing under lagring av rå fisk føre til uønsket dannelse av histamin. Det er derfor et behov for å optimalisere prosesseteknologier for å kunne prosessere råmaterialer fra pelagisk fisk til sunne og sikre matprodukter, med økt holdbarhet og høyere kvalitet. I dag brukes mye frosset råstoff av makrell, men det er ønskelig å undersøke om andre lagringsmetoder før prosessering egner seg bedre for å ivareta kvaliteten. Superkjøling har tidligere vist seg å forlenge holdbarheten til fisk, og kan være et godt alternativ til fryselagring. Tidligere forsøk har vist at etter kjølelagring i 9 dager var makrellen ikke egnet for videre prosessering.

Arbeidet med denne oppgaven er delt inn i to hovedforsøk. Først ble lagringsmetodene kjøling, superkjøling og frysing benyttet for lagring av atlantisk makrell. Kvaliteten og holdbarheten til makrell ved de ulike lagringsmetodene ble vurdert gjennom endring i løselighet til proteiner, mikrobiell status, drypptap, tekstur, farge, oksidasjon av proteiner, aktivitet av proteolytiske enzymer og mengde frie aminosyrer.

På grunn av økt oppmerksomhet rundt hvordan mat påvirker generell helse, har interessen for produkter med positive helseeffekter og gode sensoriske egenskaper økt blant forbrukerne. I utviklingen av makrellprodukter med høy kvalitet og gode sensoriske egenskaper er prosessering etter lagring viktig. Del to av denne oppgaven innebærer varmebehandling av vakuumpakket makrell med påfølgende lagring. Varmebehandlingen ble utført ved ulike temperaturer og behandlingstid. For å vurdere effekten av varmebehandling ble løselighetsegenskapene til proteiner, vanninnhold, tekstur, farge, mikrobiell status og oksidasjon av proteiner studert.

1.1.1 ProHealth-prosjekt

Denne oppgaven er en del av et større prosjekt, kalt ProHealth. Prosjektet ProHealth har som mål å utvikle nyskapende prosesseringsmetoder for å kunne bevare positive helseeffekter i pelagiske fiskeprodukter. Dette er et samarbeidsprosjekt mellom Institutt for bioteknologi og matvitenskap ved Norges teknisk-naturviten-

skapelige universitet (NTNU), SINTEF Oceans (Trondheim, Norge), Teagasc Food Research Centre (Dublin, Irland), Department of Fisheries Economics ved National Marine Fisheries Research Institute (Gdynia, Polen) og Nutrition and clinical biochemistry lab, department of Pharmaceutical Sciences University of Perugia (Perugia, Italia).

Det overordnede målet med prosjektet er å utvikle metoder for å optimalisere eksisterende eller nye teknologier for prosessering av fiskeprodukter fra pelagiske fiskearter. Fiskeproduktene skal være sunne, ha høy kvalitet, være trygge og bærekraftige.

1.2 Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*)

Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*) er en fet fisk og kategoriseres som pelagisk og hurtigsvømmende. Denne fiskearten er utbredt i Nordøst-Atlanteren, fra nordvestkysten av Afrika til Barentshavet og vestover i Norskehavet forbi Island og Jan Mayen (Fisheries 2012). Betegnelsen pelagiske arter brukes om arter som er knyttet til frie vannmasser hele livet. Pelagisk fisk er fritt svømmende fiskearter, i motsetning til demersale fisk (bunnlevende) (Hjermann & Sælen 2015). Atlantisk makrell mangler svømmeblære, og svømmer hele livet på utkikk etter mat og for å holde seg flytende. Makrell lever av dyreplankton, men spiser også bløtdyr og småfisk som sild. På grunn av en tydelig blågrønn farge på ryggen, er det lett å gjenkjenne makrell på utseendet. I tillegg har makrell 23-33 mørke, bølgeformede bånd på tvers av ryggen ned mot midtlinjen (Keay 2001). Figur 1.1 viser en atlantisk makrell. Makrellen gyter tidlig på sommeren langs kysten og ute i Skagerrak, Nordsjøen og Norskehavet. Om sommeren og utover høsten svømmer makrellen i stimer i disse områdene (NIFES 2015).



Figur 1.1: Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*). (Godfisk 2017)

Historisk sett er det EU, Færøyene, Russland og Norge som er de største makrell-fiskenasjonene. I Norge foregår fangsten med ringnotfartøy eller trålere. Det norske fisket foregår hovedsaklig i perioden fra september til november, og det meste fiskes i Nordsjøen. Det er estimert at fangsten i denne perioden ligger på 360 000 til 930 000 tonn (Fisheries 2012). Ifølge det internasjonale havforskningsrådet (ICES) og SjømatNorge er det for 2017 satt en fiskekvote på 944 302 tonn makrell, mens kvoten for 2016 var satt til 773 842 tonn (Dale 2016). Store deler av makrellen som fiskes i Norge blir eksportert til andre land, og de største mottakslandene har vært Kina, Japan, Nigeria og Nederland. Mye av makrellen som eksporteres til Kina, bearbeides der før den sendes videre til konsum i Japan (Norges sjømatråd 2016). I løpet av 2016 ble det ifølge Norges sjømatråd (2016) eksportert rundt 367 000 tonn fryst hel makrell.

Makrell er en næringsrik fiskeart, og er en av de artene som inneholder mest omega-3 (NIFES 2015). Fettinnholdet i makrell varierer med årstidene. Det er lavest om våren og høyest om høsten (Keay 2001). Makrell omsettes som fersk og frossen filet og som hel fisk, og inngår i mange ulike produkter. Eksempler på produkter er varm-/kaldrøkt og hermetisert makrell, samt pålegg som makrell i tomat (Keay 2001, NIFES 2015).

1.3 Kjemisk sammensetning av fiskemuskel

Fisk består hovedsakelig av vann, proteiner og lipider, mens kun 1-2 % av fisken er karbohydrater. Videre er fisk en god kilde til vitaminer (hovedsaklig vitamin A, D og E) og mineraler, og ved å spise fisk får mennesker og dyr i seg alle nødvendige vitaminer i større eller mindre grad (Murray & Burt 2001). Den kjemiske sammensetningen i fisk varierer mellom arter, men også innad i en art kan det være store variasjoner. Hvor fisken lever, hva den spiser, tilgangen på mat, hvor mye den beveger seg, kjønn, alder og årstid er faktorer som påvirker den kjemiske sammensetningen innad i en art. Ofte slutter fisk å spise før gyting, og må bruke av fett- og proteinreserver, noe som også påvirker sammensetningen i fisken (Murray & Burt 2001). Videre kan endringer i kjemisk sammensetning i fiskemuskel og egenskapene til proteinene påvirke kvaliteten til fersk fisk. Kvaliteten avhenger av lipid-, vann- og proteininnhold, bindevev, tekstur, farge og stabilitet til råmaterialer (Sigurgisla-dottir et al. 1997). Det er også funnet at sulting før slakting har signifikante effekter på fiskens kjemiske sammensetning (Gómez-Guillén et al. 2000).

Vann utgjør mesteparten av fiskekjøttet. I fet fisk utgjør vann omtrent 70 % av vekten til fiskekjøttet, mens for hvit fisk kan vanninnholdet komme opp mot 80 %. Lipidinnholdet varierer som nevnt mye mellom arter, men summen av vann og fett i fet fisk er omtrent konstant rundt 80 %, så et lavt vanninnhold svarer til høyt

lipidinnhold og motsatt. Videre ligger mengde proteiner i fiskekjøtt på 15-18 % (Murray & Burt 2001). I avsnitt 1.4.2 står det mer om ulike muskelproteiner, mens vanninnhold i muskel er beskrevet i Avsnitt 1.4.3. Lipider i muskel er beskrevet under. Den kjemiske sammensetningen i atlantisk makrell er gitt i Tabell 1.1.

Tabell 1.1: Vann-, fett- og proteininnhold i atlantisk makrell (*Scomber scombrus*) (Murray & Burt 2001).

Atlantisk makrell	Innhold i filet
Vann	60-74 %
Lipid	1,0-23,5 %
Protein	16-20 %

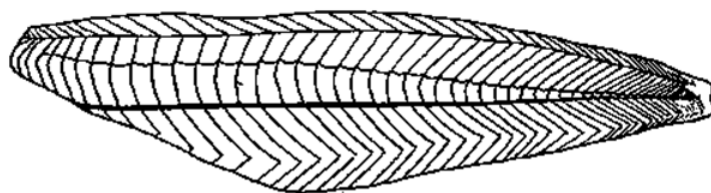
1.3.1 Lipider i muskel

Lipider er viktig for matkvaliteten til fisk siden det påvirker smak, lukt, farge og tekstur, og det er viktig for ernæringsmessig kvalitet til fiskeprodukter (Sigurgisla-dottir et al. 1997). Lipider finnes i membraner og i fettvev, og lipidene i muskelceller består av fosfolipider, triacylglyseroler og kolesterol (Belitz et al. 2009a). Som allerede nevnt, varierer lipidinnholdet mellom fiskearter og innad i hver fiskeart. Lipidene er også ujevnt fordelt i fiskekjøttet til én fisk. Det er for eksempel funnet at kjøtt fra muskler nært hodet til laks inneholder nesten dobbelt så mye fett som muskulaturen rundt halen (Murray & Burt 2001). Ohshima et al. (1993) fant høyest lipidinnhold like under skinnen til makrell, etterfulgt av mørk muskel, innvoller og hvit muskel. En studie utført av Leu et al. (1981) viser at lipidinnholdet i makrell også varierer med årstidene. Lavest lipidinnhold ble funnet i månedene mars og april etter gyting, før lipidinnholdet økte utover året og til høyest nivå i september, oktober og november. Det laveste lipidinnholdet var 4 %, mot et maksimumsinnhold på 24 % (Leu et al. 1981).

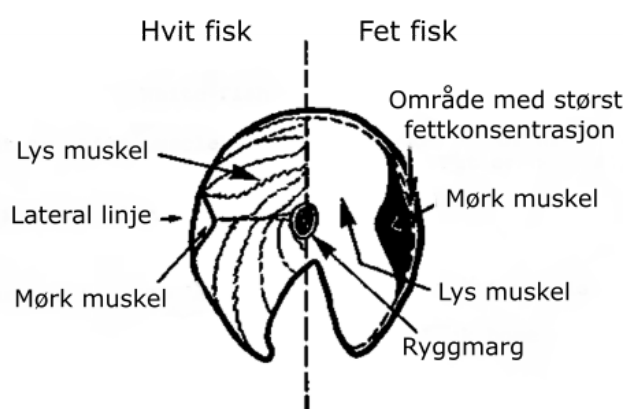
1.4 Fiskemuskel

For å forstå ulike prosesser som skjer i fiskekjøtt, er det viktig å vite hvordan strukturen til kjøttet er bygd opp. En skisse av fiskemuskel er gitt i Figur 1.2. Fiskemuskel er i to fileter på hver siden av ryggbeinet, og strekker seg fra hale til hode. De to filetene er delt av et langsgående septum, mellom en øvre og en nedre muskelbunt (Rustad 2005). Muskelblokkene som vises i Figur 1.2 er adskilt av bindevev som strekker seg fra ryggraden til skinnen. I fersk fisk er disse muskelblokkene godt festet til bindevevet. Det er også små blodkar som går gjennom

muskelen (Murray & Burt 2001). Et tverrsnitt av fiskemuskel er gitt i Figur 1.3.



Figur 1.2: Skisse av fiskemuskel. (Murray & Burt 2001)



Figur 1.3: Tverrsnitt av fiskemuskel som viser fordeling av mørk og lys muskel i hvit fisk og fet fisk. (Murray & Burt 2001)

1.4.1 Mørk og lys muskel

Det er vanlig å skille mellom lys og mørk muskel. En lys muskel utføre raske muskelkontraksjoner, men kun over kortere tidsperioder. I mørk muskulatur er kontraksjonene tregere, men muskelen er mer utholdende (Belitz et al. 2009a). Utholdende muskulatur er avgjørende ved vedvarende svømming, og ettersom pelagiske fiskearter som makrell er aktive svømmere, er en stor del av fiskemuskulaturen til makrell mørk muskel. Lys muskel inneholder en større andel myofibrillproteiner, men lite sarkoplasmaproteiner, i motsetning til mørk muskel som er rik på sarkoplasma og inneholder lite myofibriller (Mathieu-Costello 1993). Hvit fisk som torsk og hyse inneholder lite mørk muskel (Murray & Burt 2001). Mørk muskel inneholder mer blod enn lys muskel, noe som skyldes større kapillærtetthet i mørk muskulatur (Mathieu-Costello 1993). På grunn av høyere myoglobininnhold i mørk muskel sammenlignet med i lys muskel, har mørk muskel en mørkere farge, og fiskearter

med høyt myoglobininnhold vil ha mørkere fiskekjøtt (Belitz et al. 2009b). Mørk muskel inneholder mer lipider, mitokondrier, nukleinsyrer og B-vitaminer enn lys muskel (Belitz et al. 2009b, Rustad 2005). Mørk muskel får energi fra oksidasjon av fett (Rustad 2005). Lys muskel får energi ved nedbryting av glykogen, gjennom glykolyse, og har større ATPase-aktivitet enn mørk muskel (Rustad 2005, Belitz et al. 2009b).

Mørk muskel ligger rett under skinnen til fisk, på begge sider av fiskekroppen og langs den laterale linjen. (Murray & Burt 2001). Figur 1.3 viser en skisse av fordelingen av lys og mørk muskel i hvit og fet fisk. I en studie presentert av Leu et al. (1981), ble det funnet at mer enn 50 % av kroppsvekta til makrell er muskel, 43,3 % lys muskel og 10,2 % mørk muskel. Disse tallene er gjennomsnittstall for hele året, og mengden lys og mørk muskel kan variere med årstider og sesonger (Leu et al. 1981).

1.4.2 Muskelproteiner

Fiskekjøtt er en ernæringsmessig god proteinkilde på grunn av god sammensetning av aminosyrer (Murray & Burt 2001). Fiskemuskel er bygd opp av en rekke proteiner og andre komponenter. Muskelproteiner og egenskaper til disse endres under prosessering og lagring. Proteinene i fiskemuskel kan deles inn i tre kategorier, etter løselighet:

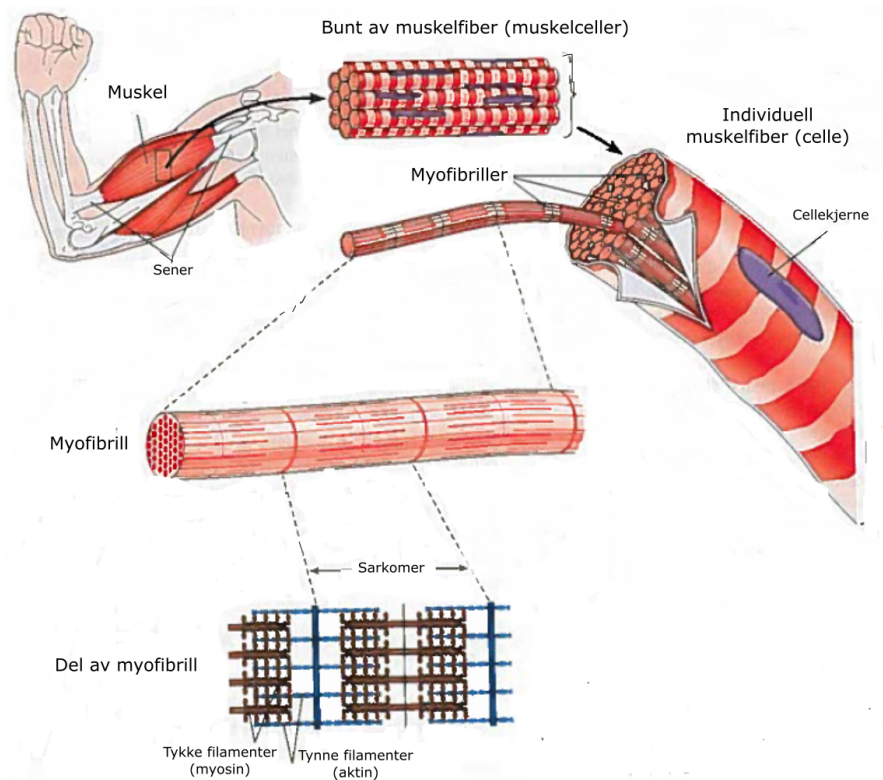
1. Myofibrillproteiner (strukturelle proteiner)
2. Sarkoplasmaproteiner
3. Bindevev (stromaproteiner)

Myofibrillproteiner er saltløselige proteiner og kan ekstraheres med konsentrerte saltløsninger. Videre kan sarkoplasmaproteiner løses i vannfraksjoner og i for-tynnede saltløsninger, og disse kalles derfor vannløselige proteiner. Den siste kate-gorien med proteiner, de som inngår i bindevev og membraner, er i hovedsak uløselige (Belitz et al. 2009a). Hver av disse proteinkategoriene er beskrevet ytter-ligere nedenfor.

Myofibrillproteiner

Myofibrillproteiner utgjør opp til 65-75 % av proteinene i muskelvevet til fisk. Disse proteinene utgjør strukturen til en muskel og er viktige under en muskel-kontraksjon. Disse proteinene er ustabile og kan lett denatureres ved prosess-ering, for eksempel ved frysing (Rustad 2005). Oppbyggingen og strukturen

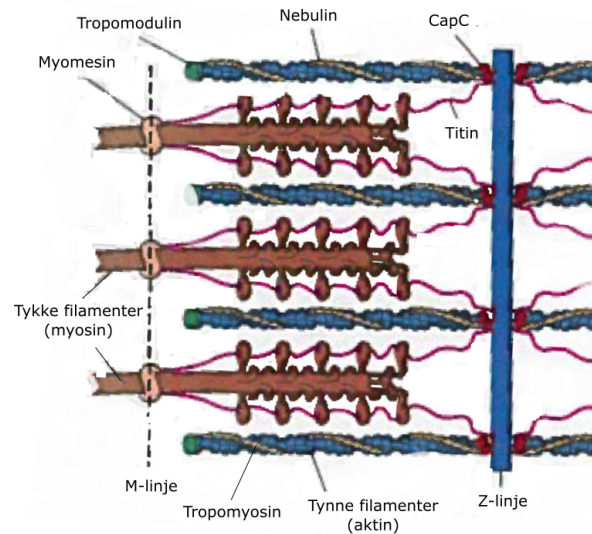
av skjellettmuskulatur er vist i Figur 1.4. En muskel består av bunter med parallelle muskelfibre, og hver muskelfiber er en lang, tynn celle som er spesialisert for muskelkontraksjon (Hardin et al. 2012a). Muskelfibrene i fisk er kortere enn i rødt kjøtt, og dette resulterer i at fisk er lettere å fordøye (Njinkoué et al. 2002). Hver muskelcelle består igjen av myofibriller som strekker seg langs hele cellelengden, og videre er myofibrillene delt inn i repeterende enheter kalt sarkomerer. Sarkomerene er fundamentale for muskelkontraksjon, og hver sarkomer består av bunter av tykke og tynne filamenter (Hardin et al. 2012a).



Figur 1.4: Oppbygging av muskel. Muskel består av muskelbunder med muskelfiber som består av mange myofibriller. Myofibrillene består av tykke og tynne filamenter organisert i sarkomerer. (Hardin et al. 2012a)

De dominerende myofibrillproteinene i fiskemuskel er myosin, aktin, titin, tropomyosin og troponin (Belitz et al. 2009b). I Figur 1.5 er de ulike strukturelle proteinene i sarkomerer illustrert. Myosin utgjør omtrent 45 % av de strukturelle proteinene i en muskel, og er hovedkomponenten i de tykke filamentene (Foegeding & Lanier 1996). Proteinet myosin har en lang hale med to fleksible, pæreformede

hoder i enden (Offer et al. 1989). Proteinet aktin utgjør 15-20 % av myofibrillproteinene i fiskemuskel, og er hovedkomponenten i de tynne filamentene. Aktin er mindre løselig enn myosin (Belitz et al. 2009a,b). Under en muskelkontraksjon bindes hvert aktimolekyl seg til et myosinhode (Offer et al. 1989). Når aktin bindes til myosin, dannes komplekset aktomyosin. I levende muskel dissosierer komplekset ved tilførsel av ATP, men i *post mortem*-muskel er aktomyosin den vanligste formen for aktin og myosin siden all ATP i cellene er oppbrukt gjennom prosesser *post mortem* (Foegeding & Lanier 1996). *Post mortem* betyr «etter døden».



Figur 1.5: Strukturelle myofibrillproteiner i sarkomerer. De tykke og tynne filamentene krever strukturell støtte av andre myofibrillproteiner for å kunne opprettholde riktig organisering i sarkomerene. (Hardin et al. 2012a).

Tropomyosin og troponin som også er en del av de tynne filamentene, og utgjør begge 4-6 % av myofibrillproteinene i fiskemuskel (Belitz et al. 2009b). Disse proteinene danner et kompleks som regulerer interaksjonene mellom myosin og de tynne filamentene. Ulike typer troponin har ulike funksjoner. Troponin C binder kalsium og regulerer kalsium under kontraksjonsprosessen, troponin I inhiberer ATPaseaktivitet til aktomyosin, og troponin T binder troponin til tropomyosin (Foegeding & Lanier 1996).

Endring i funksjonelle egenskaper som vannbindingsevne, frigjøring av fett og mekaniske egenskaper antas å avhenge av tilstanden til myofibrillproteiner, hovedsaklig myosin (Montero et al. 2003). Mye av vannet holdes av myofibrillproteinene (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Vanninnhold i muskel er beskrevet ytterligere

i Avsnitt 1.4.3.

Sarkoplasmaproteiner

Cytoplasma i en muskelcelle kalles sarkoplasma, og proteinene som finnes i sarkoplasma, kalles sarkoplasmaproteiner (Fennema et al. 1973). Sarkoplasmaproteiner utgjør omtrent 20-30 % av proteininnholdet i muskelvev, og består hovedsaklig av enzymer og myoglobin (Belitz et al. 2009a). Sarkoplasmaproteinene er relativt stabile og påvirkes lite av for eksempel fryselagring (Rustad 2005). Enzymene er hovedsaklig glykolyseenzymer, men inkluderer også andre enzymer lokalisert i sarkoplasma (Foegeding & Lanier 1996). Myoglobin er et lite protein som binder oksygen i muskelceller. Det kan både lagre oksygen og legge til rette for oksygendiffusjon i muskelvev som krever raske kontraksjoner. Myoglobin har en hemgruppe, akkurat som hemoglobin. Hemgruppen fungerer som et pigment og gir en dyp rødbrun farge til myoglobin og hemoglobin, og til mørk muskel (Nelson & Cox 2013a).

Bindevev (stromaproteiner)

Bindevevet støtter muskelstrukturen og binder muskelceller sammen (Foegeding & Lanier 1996). Rundt hver muskel er det en ytre bindevevshinne, *epimysium*, som dekker hele muskeloverflaten (Fennema et al. 1973). Muskelbuntene er omgitt av en type bindevev kalt *perimysium*, mens individuelle muskelfibre er separert fra hverandre av bindevevsnettverket *endomysium* (Offer et al. 1989). I tillegg regnes sener som en del av bindevevet (Foegeding & Lanier 1996).

Innholdet av bindevevsproteiner utgjør omtrent 1,3 % av en fiskemuskel. Eksempler på bindevevsproteiner er kollagen og elastin. Proteinet kollagen kan utgjøre opp mot 90 % av bindevevsproteinene, og med en lengde på omtrent 280 nm og en diameter på 1,4-1,5 nm, er kollagen et av de lengste proteinene (Belitz et al. 2009a,b). Videre utgjør kollagen omtrent 3 % av total mengde muskelprotein (Ofstad et al. 1993). Kollagen danner sterke fibre som styrker ekstracellulær matriks, og er rik på aminosyrene glysin (35 % (Nelson & Cox 2013a)), hydroxylysin og hydroksyprolin. Hvert kollagenfiber er bygd opp av mange kollagenmolekyler, og hvert kollagenmolekyl består en trippelheliks av tre kjeder, og denne strukturen er avgjørende for styrken til kollagen (Hardin et al. 2012b). Kollagenfiber krymper ved oppvarming, og fiskekollagen vil begynne å krympe rundt 45°C. Ved høyere temperaturer vil den trippeltrådede heliksstrukturen til kollagen ødelegges slik at strukturen endres, og den nye strukturen tilsvarer gelatin som er vannløselig. Ved nedkjøling vil det dannes organiserte strukturer igjen (Belitz et al. 2009a,b).

Dette kan observeres som geldannelse. En annen komponent i bindevevet er proteinet elastin. Elastin er et svært stabilt protein som danner elastiske fibre, og elastin kan strekkes ut og gjenoppta den opprinnelige lengden eller formen (Belitz et al. 2009a).

1.4.3 Vann i muskel

Det meste av vannet i en muskel holdes i muskelstrukturen og inne i muskelceller (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Siden omtrent 80 % av volumet i muskelfibre er myofibriller, befinner det meste av vannet seg i rommene mellom de tykke og tynne filamentene i myofibrillene (Offer et al. 1989). Det er estimert at 85 % av vannet i en muskelcelle befinner seg i myofibrillproteinene, såkalt intramyofibrillært vann (Huff-Lonergan & Lonergan 2005), mens det resterende vannet er utenfor myofibrillnettverket (ekstramyofibrillært) (Pearce et al. 2011). Vannet i en muskel kan deles inn i tre kategorier, etter hvordan det holdes i muskelen: 1) Bundet vann, 2) Immobilisert vann og 3) Fritt vann.

Vannmolekylet er en dipol, og vil tiltrekkes til ladde molekyler som for eksempel proteiner, og kan binde seg tett til muskelproteinene. En definisjon på bundet vann, er at det er vann som bindes til molekyler (som proteiner) og har redusert mobilitet som en følge av dette (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Bundet vann forblir bundet til proteiner under påvirkning av mekanisk eller fysisk kraft som ved varmebehandling eller frysing (Pearce et al. 2011). Bundet vann utgjør kun en liten del av det totale vanninnholdet i muskelceller (Huff-Lonergan & Lonergan 2005).

Immobilisert vann er vann som holdes i muskelnettverket av steriske krefter eller gjennom hydrogenbindinger til muskelproteiner eller andre makromolekyler (Fennema 1985, Pearce et al. 2011). Rett etter døden, vil ikke dette vannet kunne bevege seg fritt fra muskelvevet, men immobilisert vann kan fjernes ved tørking og blir til is ved frysing (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Immobilisert vann er det vannet som påvirkes mest i prosessen fra muskel til kjøtt, beskrevet i Avsnitt 1.4.4. Fritt vann er vann som beveger seg uhindret i muskelvevet, og det holdes i sarkoplasma og i muskelstrukturen hovedsaklig av svake overflatekrefter/ kapillærkrefter, eller ved intermolekylære krefter mellom væsken og den omkringliggende matriksen (Huff-Lonergan & Lonergan 2005, Pearce et al. 2011).

I tillegg til at evnen muskelen har til å holde på vannet kan endres *post mortem*, kan vanninnholdet i muskelcellene endres under lagring. Under prosessering som lengre kjøle- eller fryselagringsprosesser, mister muskelproteinene evnen til å holde på vannet, og noe tapes fra muskelen som drypp (Murray & Burt 2001).

Drypptap og redusert vannbindingsevne er indikatorer på endringer i strukturen til myofibrillproteiner (Honikel 1989). I muskelstrukturen kan dryppet blant annet oppstå i rommene mellom myofibrillproteiner, i intra- og ekstracellulære rom og mellom muskelbunter (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Dryppvannet er et godt vekstmedium for bakterier, og vannløselige næringsstoffer som salter, vitaminer, smakskomponenter og proteiner kan tapes fra muskelen sammen med dryppvannet, noe som resulterer i redusert næringsverdi og dårligere muskelkvalitet (Honikel 1989, Duun & Rustad 2007). Videre vil drypptapet øke i kjølt, lagret og tint muskel, og det er derfor av stor interesse å redusere drypptapet under prosessering og lagring av fisk (Duun & Rustad 2008, 2007).

1.4.4 Fra muskel til kjøtt - postmortale prosesser

Omdanningsprosessen fra muskel til kjøtt skjer gjennom flere postmortale prosesser. Postmortale prosesser innebærer biokjemiske og fysiske endringer i muskelstrukturen etter døden. Etter fangst går fisken gjennom tre faser: prerigor, rigor og postrigor (Ouali et al. 2006). Rett etter døden er muskelen avslappet og teksturen er myk og elastisk. Denne tilstanden kalles prerigor. Deretter vil muskelen i rigorfasen gradvis bli stiv og uelastisk som følge av at muskelen trekker seg sammen som i en muskelkontraksjon. Rigor mortis oppnås når muskelen er såkalt dødsstiv. I postrigor tilstand blir muskelen gradvis mørere og mer avslappet, men den blir ikke like elastisk som under prerigorfasen (Huss 1995). Varigheten av rigorfasene er avgjørende for kvaliteten til kjøtt, og kvalitetsparametre som tekstur, smak og lukt, mørhet, enzymaktivitet og vannbindingsevne avhenger av denne prosessen (Chéret et al. 2007).

Gjennom rigorfasene skjer det flere biokjemiske endringer i muskelen. Etter døden fortsetter ATP-hydrolysen, og for å opprettholde en viss ATP-konsentrasjon etter at oksygentilførselen i muskelen har stoppet opp, foregår det en aktiv glykolyse i muskelen der glykogen omdannes til melkesyre. Dannelse av melkesyre resulterer i lavere pH (Offer et al. 1989, Rustad 2005). Etter hvert vil ATP-innholdet i muskelen avta, og mindre ATP resulterer i at muskelen trekkes ukontrollert sammen og låses i sammentrukket stilling. Muskelen blir stiv og går inn i rigor. I fisk kan pH synke fra 7,0 til omtrent 6,2 (Belitz et al. 2009a). Hastighet og grad av pH-fallet varierer mellom arter, og avhenger av faktorer som temperatur, størrelse, slaktebetingelser og fysiske forhold til fisken eller dyret (Huss 1995).

Hvor lang tid det tar før muskelen går inn i rigor, varierer mellom dyreslag og arter. Rustad (2005) gjengir at rigor inntreer vanligvis 3-6 timer etter døden i fjørfe og andre små dyr, men først etter 24-36 timer i storfe. Til sammenligning er fiske-muskel i rigor etter 1-7 timer. Dersom fisken er sultet eller stresset under fangst,

kan muskelen gå inn i rigor rett etter døden (Huss 1995). Etter døden opphører hormonregulering av enzymprosesser, og samtidig kan den lave pH-verdien føre til at proteolytiske enzymer frigjøres fra lysosomer. Disse enzymene begynner å bryte ned myofibrillstrukturen i muskelen, noe som resulterer i endret muskelstruktur, og muskelen blir etterhvert mykere (Gómez-Guillén et al. 2000, Rustad 2005, Pearce et al. 2011). Dette skjer i postrigorfasen, og denne enzymaktiviteten er beskrevet ytterligere i Avsnitt 1.5. En annen konsekvens av post mortale prosesser er at immunsystemet kollapser. Dette fører til at bakterier på overflaten av muskelen begynner å invadere muskelstrukturen, noe som også kan resultere i degradering av muskelvevet (Stormo et al. 2017).

1.5 Proteolytiske enzymer

Endogene og bakterielle enzymer kan føre til raske endringer i egenskaper og kvalitet til fisk og fiskekjøtt, noe som påvirker blant annet smak, lukt og tekstur (Thorkelsson et al. 2009). Enzymer som bryter ned proteiner til peptider og aminosyrer, ved spaltning av peptidbindinger, kalles proteolytiske enzymer eller proteaser (Hauge 2009). Etter døden degraderes fiskemuskelen slik at muskelen blir mykere. Dette er et resultat av proteolytisk aktivitet, og myofibrillproteiner og ekstracellulær matriks brytes ned av ulike proteolytiske enzymer (Thorkelsson et al. 2009). De endogene enzymene kalpain, ulike katepsiner og proteosom er proteolytiske enzymer som degraderer myofibrillstrukturen og gjør den mykere (Sentandreu et al. 2002, Koohmaraie et al. 2002). Videre kan komponenter i ekstracellulær matriks som for eksempel kollagen brytes ned av kollagenaser (Belitz et al. 2009a, Thorkelsson et al. 2009). Den proteolytiske aktiviteten i muskelvev avhenger blant annet av livssyklusen til fisken, temperatur og pH (Hultmann 2003).

Ved proteolytisk aktivitet brytes først myofibriller ned til mindre filamenter, før videre nedbrytning til peptider og til slutt frie aminosyrer (Koohmaraie et al. 2002, Goll et al. 1992). En økning i frie aminosyrer under lagring kan dermed være en indikasjon på enzymatisk nedbrytning av proteiner (Gallart-Jornet et al. 2007). De viktigste proteasene i muskel er kalpainer, katepsiner og kollagenaser. I den første tiden etter døden er kalpainer de mest aktive proteolytiske enzymene, og de begynner degraderingen av myofibrillproteinene. Kalpainer er aktive ved nøytral pH (6,9-7,5), og har høyest aktivitet ved en temperatur på 30°C (Kolodziejska & Sirorski 1996). Kalpain er et ikke-lysosomalt enzym og en intracellulær cysteinprotease (Chéret et al. 2007), og i litteraturen er det flere eksempler på at kalpainenzymer er viktige endogene proteaser som protolyserer myofibrillproteiner (Koohmaraie 1996, Ouali & Talmant 1990, Herrera-Mendez et al. 2006, Goll et al. 1992). Etter rigor er katepsiner blant de viktigste proteolytiske enzymene, og disse fortsetter

degraderingen til peptider og frie aminosyrer (Goll et al. 1998). Katepsiner er lysosomale enzymer som er aktive ved lavere pH enn kalpainer, og katepsiner aktiveres av fall i pH i *post mortem* muskel. I dette studiet er aktiviteten til katepsiner studert, ettersom disse finnes i lysosomer og frigis etter døden. Videre kan forholdet mellom aktiviteten av katepsiner i cellevevsvæske (CTF) og homogenat brukes som et mål på membranødeleggelse ved superkjøling, kjølelagring og frysing. Informasjon om katepsiner generelt og katepsin B+L spesielt er gitt i Avsnitt 1.5.1. Aktivitet av katepsin i CTF er forklart i Avsnitt 1.5.2.

1.5.1 Katepsiner

Katepsiner er sure proteaser som finnes i lysosomer i cellene (Chéret et al. 2007). Muskelceller kan inneholde opp til 7 ulike typer katepsiner (Goll et al. 1983). De viktigste katepsintypene som er involvert i mørning av kjøtt gjennom post mortale prosesser er katepsinene B, L, H og D (Chéret et al. 2007). Optimal aktivitet til katepsiner er funnet å være rundt temperaturer på 40-50°C, og aktiviteten avtar ved synkende temperaturer. Generelt er aktiviteten høyest rundt pH 3-4, men noen katepsiner har høy aktivitet også ved pH 6,0-6,5 (Hultmann 2003). Lysosomale enzymer kan lekke ut av lysosomene dersom lysosommembranen forstyrres for eksempel ved frysing og tining, noe som vil øke den proteolytiske aktiviteten i muskelcellene (Yamashita & Konagaya 1990, Gallart-Jornet et al. 2007). I arbeidet med denne oppgaven ble aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer bestemt i atlantisk makrell lagret kjølt, superkjølt og fryst.

I fiskemuskel er det observert stor proteolytisk aktivitet av katepsin B+L-lignende enzymer. Det er nesten 30 ganger mer katepsin B og nesten 5 ganger mer katepsin B+L i fiskemuskel enn i kjøtt (Chéret et al. 2007). Videre rapporterer Chéret et al. (2007) at både katepsin B og L kan bidra til *post mortem*-nedbrytning av fiskemuskel på grunn av høy proteolytisk aktivitet, mens kun katepsin L bidrar til mørning av storfekjøtt. Både katepsin B og L aktiveres av tioler som er reduserende forbindelser (Hultmann 2003). Duun & Rustad (2008) fant at aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer holdt seg relativt stabil gjennom en lagringsperiode for superkjølt laks. Det ble funnet at enzymene ikke ble deaktivert under lagringsprosessen, og bidrar derfor til mykning av laksemuskel. Til sammenligning økte aktiviteten av katepsin B+L i stillehavsmakrell utover i lagringsperioden (0°C), samtidig som det ble funnet en reduksjon i lysosomal enzymaktivitet (Aoki & Ueno 1997). Redusert aktivitet i lysosomfraksjon skyldes degradering av muskel under lagring og innebærer frigjøring av katepsiner fra lysosomene.

En studie utført av Yamashita & Konagaya (1990), der myofibrillfragmenter ble inkubert med katepsin B eller L fra stillehavslaks (*Oncorhynchus keta*), indikerer at

katapsin L sannsynligvis er ansvarlig for omfattende autolyse av fiskemuskel. Videre har katapsin B fra gytende stillehavslaks vist seg å hydrolysere myofibrillproteiner fra karpe (Yamashita & Konagaya 1991).

1.5.2 Aktivitet til katapsin B+L i CTF

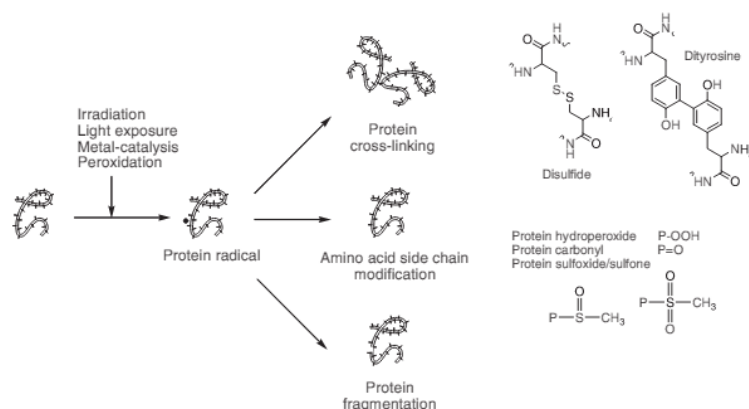
I *post mortem* muskel vil membranstrukturer degraderes, og deler av vannet i muskelen vil lekke fra intracellulære rom ut i ekstracellulære rom (Honikel 1989). Muskelen mister evnen til å holde på vannet, og ved sentrifugering i høy hastighet kan den ekstracellulære væsken fjernes fra muskelvevet. Denne væsken kalles cellevevsvæske eller CTF (cell tissue fluid). Volum CTF som lekker ut av cellene er i seg selv et mål på cellulær ødeleggelse. CTF vil øke ved frysing og tining, som følge av dannelse av iskrystaller som ødelegger muskelstrukturen (Nilsson & Ekstrand 1994). Vannløselige proteiner og andre løselige forbindelser kan lekke ut sammen med vannet. Enzymaktiviteten til lysosomale enzymer i CTF er en spesifikk indikator på lysosomal lekkasje, forholdet mellom aktivitet i CTF og homogenat av vannløselige proteiner er et mål på grad av ødeleggelse av lysosomer (Nilsson & Ekstrand 1993). I dette studiet er aktiviteten til katapsin B+L-lignende enzymer i CTF og homogenat bestemt for atlantisk makrell lagret kjølt, superkjølt og fryst. Forholdet mellom aktivitet i CTF og homogenat ble studert som et mål på hvor mye katapsin B+L som hadde lekket ut av lysosomene på grunn av membranødeleggelse.

1.6 Proteinoksidasjon

Et oksidasjonsmiddel er en forbindelse som kan oksidere andre stoffer (Pedersen 2016a). Oksidasjon av kjemiske forbindelser kan forårsakes av frie radikaler. Disse frie radikalene inneholder ett eller flere frie elektroner, er paramagnetiske og svært reaktive (Pedersen 2016b). De mest reaktive oksidantene, inkludert mange radikaler, reagerer med ulike biologiske molekyler inkludert proteiner og lipider (Davies 2005). Oksidasjon av proteiner og lipider har vist seg å være et problem ved lagring av fisk, og kan påvirke kvaliteten til fiskemuskel. I dette studiet er oksidasjon av proteiner studert. Tidligere studier har vist at oksidasjon av proteiner kan føre til endring i blant annet proteins konformasjon, hydrofobisitet og løselighet. Det kan også endre hvor mottakelig proteolytiske enzymer er for proteinsubstrater (Wolff & Dean 1986, Davies et al. 1987). Oksidasjon kan føre til fysiske endringer i proteinstrukturen, og det er kjent at radikaler i kontakt med proteiner og peptider i nærvær av oksygen kan resultere i fragmentering av proteinkjeden eller endring i aminosyresidekjeder (Lund et al. 2011, Davies 2005).

Oksidasjon av proteiner kan skje gjennom ulike mekanismer eller ved ulike oksidanter. Eksempler på mekanismer er kjedereaksjon med frie radikaler og oksidasjon som følge av reaktive oksygenforbindelser (ROS) (Lund et al. 2011).

Det er mange endogene systemer som kan føre til at det dannes reaktive oksygenforbindelser, både radikaler og ikke-radikaler. Enzymer i elektrontransportkjeden er et eksempel. Metallioner fungerer som oksidant, og prooksidative hemproteiner som myoglobin har også vist seg å initiere proteinoksidasjon (Davies 2005, Lund et al. 2011). De mest målbare endringene som skjer under proteinoksidasjon i muskel er dannelse av proteinkarbonyler, tap av sulfhydrylgrupper og dannelse av proteinkryssbindinger Lund et al. (2011). De vanligste konsekvensene ved proteinoksidasjon er vist i Figur 1.6. I dette studiet er innholdet av karbonylforbindelser bestemt som mål på proteinoksidasjon i kjølt, superkjølt og fryst makrell, samt for varmebehandlet makrell.

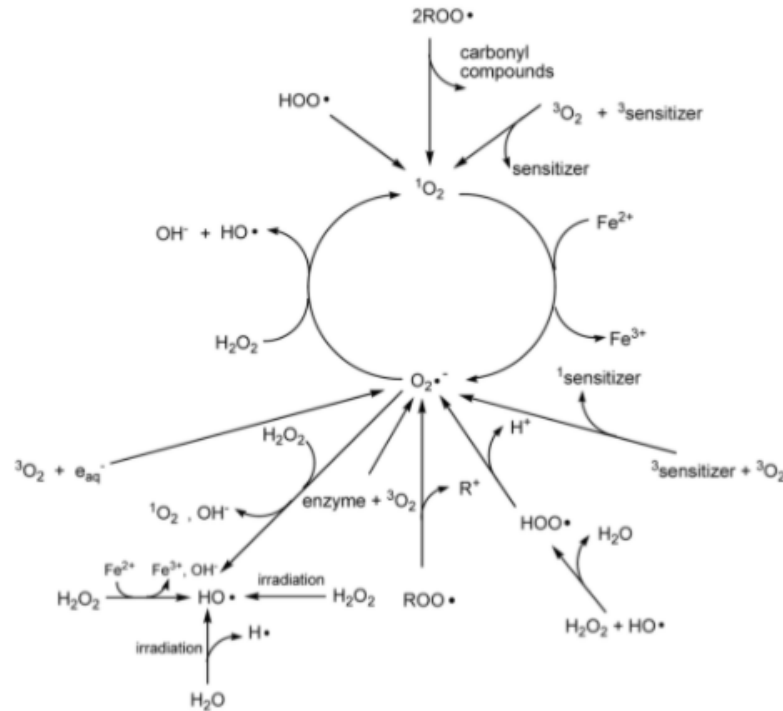


Figur 1.6: De vanligste konsekvensene av proteinoksidasjon er fragmentering av proteiner, modifikasjon av aminosyrekjede og proteinkryssbinding. Dannelse av proteinradikaler kan forårsake alle disse konsekvensene, og de kan resultere i dannelse av karbonyler eller tap av sulfhydrylgrupper. (Lund et al. 2011)

1.6.1 Reaktive oksygenforbindelser (ROS)

Betegnelsen reaktive oksygenforbindelser (ROS) inkluderer oksygenradikaler og flere derivater av oksygen. Oksidasjon av matvarer kan initieres av ROS. ROS reagerer med lipider, karbohydrater, proteiner og vitaminer, og kan ødelegge essensielle aminosyrer, fettsyrer og vitaminer. Oksidasjon av ROS kan redusere ernæringsmessige, kjemiske og fysiske egenskaper til matvarer under lagring og prosessering

(Choe & Min 2005). Dannelse av ROS i matvarer under lagring og prosessering avhenger ofte av andre ROS-forbindelser (Choe & Min 2005), og en oversikt over sammenhenger i dannelse av ulike ROS er gitt i Figur 1.7.



Figur 1.7: Ulike reaktive oksygenforbindelser (ROS) i matvarer kan påvirke hverandre og føre til dannelse av nye ROS-forbindelser. (Choe & Min 2005)

Proteiner og aminosyrer oksideres hovedsaklig av hydroksyradikaler ($\text{HO}\bullet$) og singlet oksygen (${}^1\text{O}_2$). Hydrogenperoksid ($\text{ROO}\bullet$) og superoksid anion ($\text{O}_2\bullet^-$) er viktige for dannelsen av disse to (Choe & Min 2005). Singlet oksygen reagerer med proteiner som inneholder en elektrondonerende dobbelbinding som aktiveres av amino- eller alkoksygrupper for å danne dioksetan. Dioksetaner er ustabile ved romtemperatur og kan enkelt dekomponeres ved spaltning av en karbon-karbonbinding til karbonylforbindelser (Bartlett & Schaap 1970, Mazur & Foote 1970, Choe & Min 2005). Lipidoksidasjon skjer gjennom en kjedereaksjon av frie radikaler, og oksidasjon av proteiner følger trolig en lignende mekanisme og kan resultere i ulike oksidasjonsprodukter.

1.6.2 Karbonylgrupper

Karbonylering er en irreversibel og ikke-enzymatisk modifisering av proteiner som fører til at det dannes karbonylforbindelser (Berlett & Stadtman 1997). Under intense oksidasjonsbetingelser, som for eksempel ved metallkatalysert oksidasjon av proteiner, genereres store mengder proteinkarbonyler (Estévez 2011). Karbonyler (aldehyder og ketoner) kan dannes i proteiner gjennom følgende fire veier: 1) direkte oksidasjon av sidekjedene til aminosyrene lysin, treonin, arginin og prolin, 2) ikke-enzymatisk glykering i nærvær av reduserende sukker, 3) oksidativ spaltning av peptidkjeden via α -amidering eller gjennom oksidering av glutamylsidekjeder, 4) kovalent binding til ikke-proteinkarbonylforbindelser slik som 4-hydrokxy-2-noneal (HNE) eller malondialdehyd (MDA) (Estévez 2011). Direkte oksidasjon av aminosyresidekjeder blir fremstilt som den vanligste årsaken til proteinkarbonylering. I tillegg til overgangsmetaller har andre forbindelser som finnes naturlig i muskel, som myoglobin, vist seg å fremme proteinoksidasjon og karbonylering (Estévez 2011).

1.6.3 Påvirkning på kjøttkvalitet

Hvilken betydning proteinoksidasjon har for kvaliteten til proteiner, er fortsatt lite dokumentert (Lund et al. 2011). Det er imidlertid kjent at modifikasjoner i muskelproteiner forårsaket av ROS kan føre til dårligere funksjonalitet, og dermed kvalitetstap i muskelmat som kjøtt og fisk (Xiong 2000, Lund et al. 2007). Endringer i kvalitetsparametre som farge, aroma, smak og lukt kan skyldes ROS (Estévez 2011). Også tap av essensielle aminosyrer, redusert proteolytisk følsomhet og redusert fordøyelighet har vist seg å være konsekvenser av oksidative proteinmodifikasjoner (Morzel et al. 2006, Santé-Lhoutellier et al. 2008). Dette påvirker den ernæringsmessige kvaliteten til muskel (Lund et al. 2011). Proteinoksidasjon i muskelmat kan også føre til endringer i egenskaper som løselighet, geldannelse, emulgeringsegenskaper, viskositet, tekstur og vannbindingsevne (Xiong 2000, Baron et al. 2007, Lund et al. 2011). Proteinoksidasjon er en viktig parameter som kan forklare kvalitetsendringer under prosessering og lagring (Ooizumi & Xiong 2004, Bertram et al. 2007, Lund et al. 2007b, Rowe et al. 2004, Santé-Lhoutellier et al. 2008). Det er blant annet funnet økning i karbonylforbindelser under fryselagring (Passi et al. 2005, Baron et al. 2007). Karbonylinnholdet i fryselagret (-20°C) regnbueørret økte signifikant etter 8 måneder (Baron et al. 2007). Baron et al. (2007) fant store variasjoner i karbonylinnhold for ulike regnbueørreter, noe som tyder på store biologiske variasjoner mellom individer.

En studie utført av Harris et al. (2001) viste økt oksidasjon i *post mortem* muskel. Martinaud et al. (1997) rapporterer om en økning i oksidasjon av myofibrill-proteiner i storfekjøtt. Myosin har vist seg å være det mest sensitive myofibrill-proteinet med tanke på oksidasjon, etterfulgt av troponin (Martinaud et al. 1997). Det er også funnet at proteinoksidasjon avhenger av pH-fall, kroppstemperatur, aldring og andre *post mortem*-faktorer (Toldrá & Reig 2006).

1.6.4 Bestemmelse av karbonylgrupper

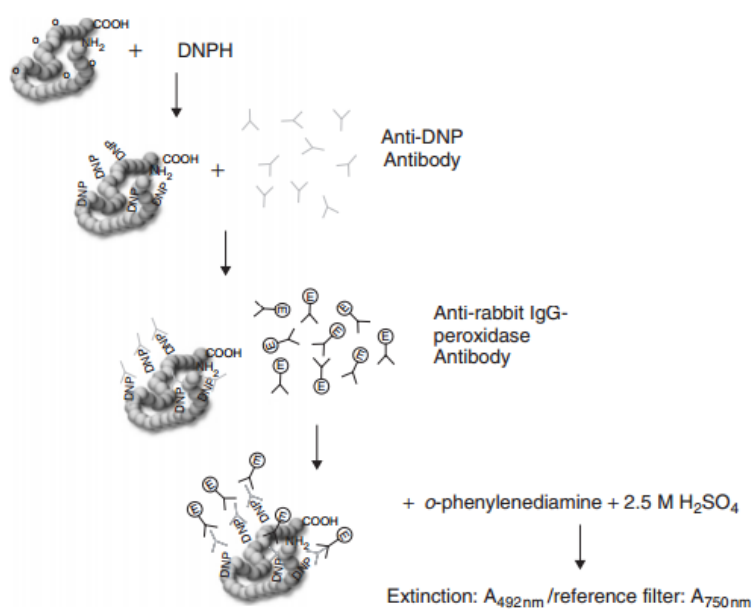
Mengde karbonylgrupper kan bestemmes ved ulike metoder, dette inkluderer spektrofotometrisk bestemmelse, endimensjonal eller todimensjonal elektroforese etterfulgt av immunoblotting, høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC) og enzymbundet immunosorbentanalyse (ELISA) (Catalgol et al. 2011). En mye brukt spektrofotometrisk metode for kvantifisering av karbonylforbindelser i muskelprodukter og matvarer, er DNPH-metoden, som er forklart nedenfor. I dette studiet ble mengde karbonylgrupper bestemt ved ELISA-metoden som er forklart i Avsnitt 1.6.5.

DNPH-metoden er basert på en reaksjon mellom 2,4-dinitrophenylhydrazin (DNPH) og proteinkarbonylforbindelser, der det dannes et 2,4-dinitrofenylhydrazonprodukt (DNP) som gir maksimal absorbansverdi rundt 370 nm (Estévez 2011). Metoden ble først utviklet av Oliver et al. (1987) og senere revidert av Levine et al. (1994). DNPH-metoden er brukt i flere studier til å bestemme karbonylinnhold i blant annet fiskemuskel og fiskeprodukter (Srinivasan et al. 1996, Tokur & Polat 2010, Baron et al. 2007, Alinasabhematabadi 2015), og i rent kjøtt og kjøttprodukter (Lund et al. 2007, Rowe et al. 2004, Vuorela et al. 2005). DNPH-metoden er enkel, rask å gjennomføre og krever ikke avansert utstyr, men det er også flere ulemper med denne metoden. Den krever store proteinkonsentrasjoner, og den er ikke egnet til å kvantifisere karbonylgrupper i proteiner som har absorpsjonstopp i samme område som protein-DNP (Catalgol et al. 2011).

1.6.5 ELISA-analyse for kvantifisering av karbonylgrupper

En annen metode for kvantifisering av karbonylgrupper er en enzymbundet immunosorbentanalyse (ELISA), først utviklet av Buss et al. (1997) og senere modifisert av Alamdari et al. (2005) for å øke sensitiviteten slik at også prøver med lav proteinkonsentrasjon kan analyseres. Buss-metoden krever 60 μg protein, mens den modifiserte metoden kun krever 5 μg (Alamdari et al. 2005). Proteiner adsorberes til brønneveggene på en ELISA-plate og reagerer deretter med tilsatt DNPH. DNPH reagerer med frie karbonylgrupper på proteinene, noe som fører til at DNP bin-

des til karbonylgruppene. Deretter reagerer protein-DNP videre med et primært antistoff mot DNP og et sekundært antistoff (anti-kanin IgG-peroksidase - POD). Peroksidase i sekundære antistoffer reagerer med substratene *o*-fenylendiamin og 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin dihydroklorid sammen med hydrogenperoksid. Til slutt måles absorpsjonen ved en bølgelengde på 450 nm, og karbonylinnholdet kan bestemmes til nmol/mg protein (Catalgol et al. 2011). De ulike stegene i ELISA-karbonylprosedyren er illustrert i Figur 1.8, og flere detaljer rundt prosedyren er beskrevet i Avsnitt 2.4.8. Før kvantifisering av karbonylinnhold, må protein-konsentrasjonen i prøvene bestemmes, for eksempel ved bruk av Bradford-reagens (Bradford 1976) gjennom BioRad-metoden (Avsnitt 2.4.1). Videre skal alle standarder og prøver ha lik proteinkonsentrasjon før bestemmelse av karbonylinnholdet (Catalgol et al. 2011).



Figur 1.8: Kvantifisering av karbonylgrupper ved hjelp av enzymbundet immunosorbent-analyse (ELISA). DNPH binder seg til proteinet, før videre interaksjon med primært og sekundært antistoff som igjen kan reagere med substratet *o*-fenylendiamin. Videre bestemmelse av karbonylinnhold utføres ved absorpsjonsmålinger ved 450 nm. (Catalgol et al. 2011)

Sammenlignet med DNP-metoden, krever ELISA-metoden kun mikrogram med protein for å kvantifisere karbonylgrupper. Videre er denne metoden sensitiv og reproducerbar, og siden fritt DNPH og det som ikke er proteiner lett vaskes bort

gjennom ELISA-prosedyren, er det minimal forstyrrelse av andre forbindelser (Catalgol et al. 2011). Likevel er det noen ulemper med ELISA-metoden; noe av proteinet kan gå tapt under vasking, antistoffene som benyttes er kostbare, og analysen er tidkrevende (går over to dager) (Catalgol et al. 2011).

1.7 Lagringsmetoder

Ferskheter er en viktig kvalitetsparameter i fisk, enten fisken benyttes direkte til konsum eller som råmateriale i ulike fiskeprodukter (Gallart-Jornet et al. 2007). Ferske fiskeprodukter er mer utsatt for kvalitetsendringer enn mange andre matvarer på grunn av høyt vanninnhold, høyt innhold av lett tilgjengelige næringsstoffer og gode vekstbetingelser for mikroorganismer (Shen et al. 2015). Holdbarhet til fisk blir ofte bestemt sensorisk eller ved å analysere mikrobiell vekst. Fiskens kvalitet reduseres på grunn av mikrobiell ødeleggelse og av biokjemiske reaksjoner *post mortem*, noe som resulterer i redusert sensorisk og ernæringsmessig kvalitet til fisken (Shen et al. 2015). Når det gjelder mikrobiell vekst, er det satt en kvalitetsgrense for fersk fisk og kjøtt mellom 10^6 og 10^7 CFU/g (ICMSF 1986), og holdbarheten defineres ut i fra denne grenseverdien (Claussen 2011).

For å øke holdbarheten og opprettholde kvalitet, er lagringsprosessen viktig. En viktig faktor for holdbarheten til fisk og fiskeprodukter, er temperaturen under lagring, fra fangst til konsum (Shen et al. 2015, Duun & Rustad 2007). I og med at fisk lettere bederves enn kjøtt, er lagringstemperaturen enda viktigere (Duun & Rustad 2007). Saeed & Howell (2002) fant at redusert lagringstemperatur hadde en positiv påvirkning på proteinkvaliteten i makrell under lagring. Holdbarheten til fersk fisk er lavere enn for frossen fisk, og det er dermed et stort behov for å utvikle metoder for å opprettholde god kvalitet til fersk fisk (Duun & Rustad 2008). De mest brukte lagringsmetodene til fisk er kjølelagring på is ($0-4^{\circ}\text{C}$), superkjølt lagring ($-1- -4^{\circ}\text{C}$) og fryselagring ($-18- -40^{\circ}\text{C}$) (Gallart-Jornet et al. 2007). Disse lagringsmetodene er beskrevet ytterligere i henholdsvis Avsnitt 1.7.1, 1.7.2 og 1.7.3.

1.7.1 Kjøling av fisk

Bedervelse er en naturlig prosess i fisk etter døden, men ved riktig kjølelagring kan prosessen forsinkes slik at holdbarheten forlenges. Målet med kjøling er å forlenge holdbarheten til fisk ved å forsinke bakterievekst og enzymprosesser, samt å hindre kjemiske og fysiske endringer som kan påvirke kvaliteten (Power et al. 1969). Fisk som holder seg 2 dager ved 15°C , vil holde seg 6 dager ved 5°C og rundt 15 dager ved 0°C (Graham et al. 1992). Det finnes ulike kjølemetoder, der den

vanligste er kjølelagring på is etter sløyning og vasking (Power et al. 1969). Is har stor kjølekapasitet for en gitt vekt eller volum, er ikke giftig og koster lite. Når fisk avkjøles på is, oppnås varmeoverføring ved direkte kontakt mellom is og fisk eller ved at varme overføres fra fisken til smeltevannet (Graham et al. 1992). Dersom fisken behandles varsomt og kjøles ned skikkelig, vil den raskt holde samme temperatur som den smeltende isen (Power et al. 1969). Andre kjølelagringsmetoder brukt på fisk er kjøling i kaldt vann og kjølig luft. Også sjøvann kan benyttes til kjøling av fisk, enten sjøvann avkjølt mekanisk, såkalt nedkjølt sjøvann (RSW, Refrigerated Sea Water), eller sjøvann tilsatt is, kjølt sjøvann (CSW, Chilled Sea Water)(Graham et al. 1992). RSW brukes ofte ved transport av pelagisk fisk, ettersom det er lett tilgjengelig ombord i båter like etter fangst. Makrellen benyttet i dette studiet, ble kjølt ved RSW under transport.

Ulike typer fisk har ulik holdbarhet ved kjølelagring, avhengig av blant annet kjemisk sammensetning og spesielt fettinnhold. Makrell lagret på is eller i nedkjølt sjøvann rett etter fangst, vil bevare god kvalitet i 4-5 dager (Keay 2001). I en studie av Rezaei & Hosseini (2008) ble mikrobiell vekst under kjølelagring av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) analysert, og mikrobiell vekst ble bestemt til $10^{7,04}$ CFU/g etter 20 dager, sammenlignet med den initielle verdien på $10^{4,0}$ CFU/g. Det ble konkludert med at regnbueørreten ikke lenger var egnet til konsum etter 12 dager. En annen kvalitetsparameter som kan endres under kjølelagring på is, er tekstur. Mykere muskelvev er observert under kjølelagring på is for laks (Hultmann 2003).

1.7.2 Superkjøling

Superkjøling, også kalt partiell frysing, brukes ofte om en prosess der mat lagres 1-2°C under det initielle frysepunktet til produktet. Det dannes da et tynt lag av is i de ytterste lag av produktet, såkalt skallfrysing (Claussen 2011). Superkjøling er ikke et nytt konsept, og prosessen ble først beskrevet av Le Denois (1920) i 1920. De største fordelene med superkjøling sammenlignet med kjølelagring, er at holdbarheten økes, produktet beholder høyere kvalitet, utbyttet er større, og det er potensial for å redusere miljøpåvirkninger (Claussen 2011). I tillegg er det lavere energiforbruk, mindre problemer som følge av tining, mindre strukturelle skader og mindre denaturering av proteiner ved superkjølt lagring sammenlignet med frysing (Shen et al. 2015). I kjøttindustrien brukes superkjøling for å øke holdbarheten til produkter, forenkle produksjons- og lagringsprosessen og for å forlenge salgsperioden til ferskt kjøtt. I fiskeindustrien benyttes superkjøling av fisk eller fiskefileter for å øke produktutbytte og kvalitet, slik at mer av råmaterialene kan selges som fersk fisk i stedet for fryst (Claussen 2011).

Frysepunktet til de fleste matvarer ligger mellom $-0,5^{\circ}\text{C}$ og $-2,8^{\circ}\text{C}$ (Fennema et al. 1973). Ifølge Rahman & Driscoll (1994) ligger frysepunktet til reker, laks og makrell rundt $-2,2^{\circ}\text{C}$, mens frysepunktet til karpe ligger rundt $-1,0^{\circ}\text{C}$. Frysepunktet til matvarer vil ofte avhenge av vanninnholdet til produktet, og vanninnholdet er en viktig parameter for å kunne bestemme den termiske ledeevnen i frossen tilstand. Videre vil forskjeller i struktur og kjemisk sammensetning til matvarer kunne påvirke mobiliteten til vann ved frysing (Chang & Tao 1981). Det finnes flere måter å utføre superkjølingsprosessen på, og de mest brukte er avkjølt sjøvann - RSW (refrigerated sea water), luftkjøling i frysetuneller og kontaktkjøling (Claussen 2011). Hvor mye is som dannes i de ytre millimeterene av matvaren, avhenger av hvilken superkjølingsmetode som benyttes (Duun & Rustad 2008).

Under superkjøling settes temperaturen lavere enn det initielle frysepunktet til matproduktet, slik at det ytterste laget fryser, noe som innebærer at deler av vannet fryses ut. Denne skallfrysingen gjør at produktet kan opprettholde lav temperatur under lagring (Duun & Rustad 2007). Isen som dannes vil kunne holde produktet kaldt, noe som minker behovet for å lagre eller transportere produktet på is, og redusere den totale transportvekten og dermed transportkostnadene (Claussen 2011, Bahuaud et al. 2008). Under superkjølt lagring vil isen fordele seg i produktet, og produktet oppnår en jevn temperatur (Claussen 2011). Som følge av at noe av vannet fryses ut under superkjøling, vil konsentrasjonen av løste stoffer øke i det resterende vannet som ikke er fryst (Shen et al. 2015). Dette kan føre til endringer i membranstruktur, denaturering av muskelproteiner og økt enzymaktivitet, noe som igjen kan resultere i økt drypptap, dårligere vannbindingsevne og teksturendringer (Duun & Rustad 2008). Dersom temperaturen senkes 1°C innenfor det aktuelle temperaturområdet rundt frysepunktet, vil mengde vann som fryses ut kunne dobles (Duun & Rustad 2007). Innenfor superkjølingstemperaturområdet vil selv små temperaturvariasjoner kunne føre til store variasjoner i mengde vann som fryses ut samt i kvaliteten til produktet. Det er derfor viktig å holde jevn lagringstemperatur slik at mengde is som dannes kan holdes på et optimalt og konstant nivå (Duun & Rustad 2008). I Avsnitt 1.7.3 er dannelse av is og iskrystaller i muskelvev, samt hva som kan skje med myofibrillproteiner som følge av isdannelse, beskrevet ytterligere.

Effekt av superkjøling på kvalitet

Superkjøling er vist å være en egnet metode for lagring av ferskt kjøtt eller fisk. Redusert kvalitet som følge av biokjemisk nedbrytning, går saktere ved superkjøling enn ved kjøling på is. Sammenlignet med kjølelagring, har superkjøling vist seg å øke holdbarheten til en rekke fiskearter, blant annet karpe (*Cyprinus*

carpio) (Lu et al. 2014), torsk (*Gadus morhua*) (Nowlan et al. 1975, Duun & Rustad 2007), laks (*Salmo salar*) (Sivertsvik et al. 2003, Duun & Rustad 2008, Gallart-Jornet et al. 2007) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Shen et al. 2015). Lu et al. (2014) fant at superkjølt karpe hadde en holdbarhet på 21 dager, sammenlignet med 9 dager for kjølelagret karpe. Det er rapportert om en dobling i holdbarhetstiden til vakuumpakkede laksefileter ved superkjølt lagring, sammenlignet med kjølelagring på is (Duun & Rustad 2008). I og med at drypptapsvæsken er et godt egnet vekstmedium for bakterier, er det ønskelig å redusere drypptapet. Duun & Rustad (2007) rapporterer om større drypptap fra torsk lagret på is, sammenlignet med fra superkjølte torskefileter, noe som også kan være en indikator på at superkjøling forlenger holdbarheten. Holdbarheten ved superkjøling er kortere enn ved frysing. Siden mindre mengder vann fryses ut ved superkjøling sammenlignet med frysing, vil superkjøling trolig resultere i mindre strukturødeleggelse, mindre frysedenaturering av blant annet proteiner og mindre drypptap enn for fryste produkter (Duun & Rustad 2008).

Endringer i proteiner under lagring og prosessering kan gjenspeiles i endringer i løseligheten til proteiner. Myofibrillproteiner i fisk denatureres lett under prosessering og lagring, og løseligheten vil ofte reduseres gjennom en superkjølingsprosess (Gallart-Jornet et al. 2007). (Gallart-Jornet et al. 2007) fant at mengde saltløselige proteiner avtok med lagringstiden ved både kjølelagring på is, superkjøling og frysing for laksefileter. Også tekstur er en kvalitetsparameter som kan påvirkes av hvilken lagringsmetode som benyttes. Teksturen til fisk påvirkes av muskelsammentrekning *post mortem* (rigor mortis), pH-endringen *post mortem* og omfanget av proteolyse og nedbrytning av myofibrillproteiner (Haard 1992). Duun & Rustad (2008) fant høyere hardhetsverdier for superkjølte laksefileter, sammenlignet med fileter lagret på is eller fryst, noe som bekrefter at superkjøling kan påvirke tekstur.

1.7.3 Frysing

Makrellprodukter prosesseres i dag ofte av frosset råstoff, ettersom frysing øker holdbarheten sammenlignet med kjøling på is og superkjølt lagring, på grunn av betydelig mindre mikrobiell vekst. Fryst makrell lagret ved -30°C vil holde seg godt i minst 6 måneder, og ved riktig pakking og oppbevaring, kan makrell holde god kvalitet i opptil ett år (Keay 2001). Til tross for økt holdbarhet, kan frysing påvirke kvaliteten til muskelmat som følge av isdannelse.

Ved frysing fryses mer av vannet i fisken enn ved superkjøling. Ifølge Honikel (1989) har rundt 80 % av vannet som kan fryses dannet iskrystaller ved -5°C . Videre har 90 % av vannet i muskelen dannet iskrystaller ved en temperatur

på -22°C . Det er kjent at hvor raskt produkter fryses ned, samt sluttemperaturer i prosessen, avgjør størrelsen til iskrystallene og hvor iskrystallene oppstår under fryseprosessen (Bahuaud et al. 2008). Iskrystaller dannes først i ekstracellulær væske, noe som fører til økt konsentrasjonen av løste stoffer som saltioner. Økt konsentrasjon av ioner fører til osmose, og intracellulært vann trekkes ut av cellene (Honikel 1989). Molina-García et al. (2004) fant forstyrrelse og separasjon av muskelfiberbunter i svinekjøtt som følge av dannelse av ekstra- og intracellulære iskrystaller. Når det gjelder størrelsen til iskrystaller, vil sakte nedfrysing av muskelvev resultere i store krystaller, hovedsaklig i ekstracellulære områder, mens det vil dannes mange små iskrystaller både intra- og ekstracellulært ved hurtig nedfrysing (Honikel 1989). Dannelse av ekstracellulære iskrystaller kan redusere kvaliteten gjennom omfattende mekanisk ødeleggelse, økt enzymaktivitet og økt oksidasjon i muskelvevet (Bahuaud et al. 2008). Intracellulære iskrystaller kan påvirke den indre muskelstrukturen og forstyrre biologiske funksjoner (Molina-García et al. 2004), og de kan også føre til denaturering av proteiner (Martino & Zaritzky 1988). Bello et al. (1982) fant at iskrystaller kan påvirke teksturen til muskelprodukter. Videre kan det nevnes at iskrystallene som dannes i muskelvev ved frysing større enn de krystallene som oppstår under superkjøling, og dannelse av is i muskelvev kan forårsake irreversibel ødeleggelse av vevet (Bahuaud et al. 2008). Blant annet kan store iskrystaller trenge gjennom cellemembraner og forstyrre cellestrukturen (Honikel 1989).

Fryselagring påvirker muskelproteiner, og spesielt myofibrillproteiner er utsatt for denaturering eller aggregering som følge av fryselagring (Careche et al. 2002). Aggregererte proteiner er blant annet funnet i fryst lysing (*Merluccius merluccius*) (Careche et al. 2002) og torsk (*Gadus morhua*) (Tejada et al. 1996). Redusert kvalitet i fryst fisk kan også skyldes redusert ekstraherbarhet av myofibrillproteinene eller endring i enzymaktivitet (Sikorski 1978). Hvor lett myofibrillproteiner lar seg ekstrahere, er avgjørende for flere funksjonelle egenskaper til muskelen, og blir sett på som en indikator for proteinkvalitet under fryselagring. Muskelproteiner blir gradvis vanskeligere å ekstrahere gjennom en fryselagringsprosess (Careche et al. 2002). Det vil si at analyser av mengde saltløselige proteiner kan avta utover i en lagringsperiode. Dette kan også til en viss grad være tilfelle ved superkjøling.

Fryselagring kan føre til tap av egenskaper slik som evne til å danne gel (Sikorski 1978). Samtidig har frysing med påfølgende tining vist seg å øke drypptap og redusere vannbindingsevnen (Honikel 1989). Dersom muskelen ikke når rigor mortis før frysing, kan rigor inntre under tining, og økt drypptap og hardere tekstur kan observeres i fiskekjøttet som en konsekvens av dette (Nilsson & Ekstrand 1994). Einen et al. (2002) rapporterer om større drypptap for fryste og tinte laksefileter sammenlignet med kjølte fileter i løpet av en lagringsperiode på 15 dager. I samme

studie ble det observert mykere tekstur til laksefileter gjennom lagringsperioden, så endring av tekstur kan også være en konsekvens av fryselagring (Einen et al. 2002). En annen konsekvens av fryselagring kan være oksidasjon av proteiner. Blant annet har tidligere studier av proteinoksidasjon i fiskemuskel vist en økning i karbonylgrupper under fryselagring (Passi et al. 2005, Baron et al. 2007).

1.8 Varmebehandling

ProHealth-prosjektet har som mål å utvikle pelagiske fiskeprodukter med høy kvalitet, og som en første del av produktutviklingen ble atlantisk makrell prosessert ved varmebehandling med påfølgende lagring. Varmebehandling av kjøtt og fisk har lenge vært en av de vanligste prosesseringsmetodene for å sikre trygg mat og samtidig øke holdbarheten. I tillegg til å redusere uønsket mikrobiell vekst, er varmebehandling ofte nødvendig for å oppnå ønskede organoleptiske egenskaper som smak, lukt farge og mørhet (Van der Plancken et al. 2006, Wang et al. 2013). Fisk er veldig sensitiv mot termisk behandling, og selv om varmebehandling resulterer i mindre mikrobiell vekst, vil prosessering ved høye temperaturer kunne redusere andre kvalitetsparametre som tekstur, vannbindingsevne, farge og væsketap (Skipnes et al. 2011). Utvikling av teknologier som kan sikre forlenget holdbarhet og økt matsikkerhet og samtidig opprettholde optimale sensoriske egenskaper, er derfor av stor interesse for matindustrien (Stormo et al. 2017). Det er utfordrende å designe en optimal varmebehandlingsmetode for fisk, for den temperaturen som kreves for å inaktivere mikroorganismer kan føre til uønskede biokjemiske endringer i lipider og proteiner slik at produktkvaliteten reduseres (Rosnes et al. 2011). Videre er oksidasjon av lipider og proteiner ofte en konsekvens av varmebehandling (Rosnes et al. 2011), og oppvarming av muskel fører til interaksjoner mellom proteiner, enzymhydrolyse og endring av bindevev (Deng 1981). I Avsnitt 1.8.1 er det gitt en grundigere beskrivelse av hva som skjer med proteiner under varmebehandling.

For å kunne bevare sensorisk og ernæringsmessig kvalitet, er det ønskelig å kunne gjennomføre varmebehandling ved lavere temperaturer og over kortere tid, men dette er utfordrende med tanke på holdbarheten til matproduktene (Rosnes et al. 2011). For eksempel vil ikke milde varmeprosesser hindre uønsket mikrobiell aktivitet, spesielt dersom produktet er utsatt for mikrobiell forurensing (Stormo et al. 2017). Listeriabakterier er en av de mest varmeresistente ikkesporulerende patogenene, og siden listeria er utbredt i muskelmat, er det ofte en avgjørende faktor for mattryggheten (Rosnes et al. 2011). Mild varmebehandling av torsk viste en merkbar effekt på inaktivering av bakterier på overflaten til torskemuskel, men slike prosesser vil ikke kunne forlenge holdbarheten betraktelig Stormo et al. (2017). Dette som følge av at mild termisk behandling har begrenset effekt på in-

aktivering av mikrobielle organismer, eller fordi mikrobiell forurensing i postrigor fisk kan være så stor at den milde varmebehandlingen ikke har noen signifikant effekt (Stormo et al. 2017). Mild varmebehandling på muskelmat kan også utføres «sous-vide» som beskrevet i Avsnitt 1.8.2.

Som nevnt kan tekstur endres ved varmebehandling, og ved kraftig termisk behandling vil fiskekjøttet bli hardere, tørrere og vil lett dele seg i flak, noe som reduserer den sensoriske kvaliteten (Skipnes et al. 2008, 2011, Rosnes et al. 2011). Skipnes et al. (2011) rapporterer om hardere torskemuskel ved høy temperatur (80°C) sammenlignet med ved lavere temperaturer (40 og 50°C). Fiskemuskel blir hardere som følge av proteindenaturering. En saktere eller mer gradvis varme-prosess er observert å gi mykere tekstur, noe som kan forklares med høy alkalisk proteaseaktivitet (Deng 1981). Videre kan det forventes en korrelasjon mellom vannbindingsevne og tekstur, siden tekstur tidligere har vist seg å være relatert til vanninnhold (Skipnes et al. 2011).

1.8.1 Effekt av varmebehandling på proteiner

Endringer i fiskekjøtt som oppstår under varmebehandling, som hardere muskelvev og væsketap, skyldes strukturelle endringer i myofibrillproteiner og membranstrukturer. Proteindenaturering reduserer dimensjonen til myofibrillproteiner og til bindevevsproteinet kollagen, og resulterer i kortere muskelfiberdiametre og kortere sarkomerlengder (Palka & Daun 1999). Når muskelen krymper, vil noe av vannet presses ut som følge av at intermyofibrillære og ekstracellulære rom utvides, slik at mindre av vannet er immobilisert muskelstrukturen (Ofstad et al. 1996, Honikel 1989). Dette resulterer i større væsketap (Honikel 1989). Det totale væsketapet, som består av både drypptap fra lagringsprosess og koketap fra varmebehandling, kan resultere i tap av verdifulle vannløselige næringstoffer og redusere vekten til produktet (Stormo et al. 2017). Høyere temperaturer har tidligere resultert i økt koketap for atlantisk torsk (*Gadus morhua*) (Skipnes et al. 2011), og for laks (*Oncorhynchus gorbuscha*) (Kong et al. 2007). En studie utført av Ofstad et al. (1993) viste at væsketapet økte raskt som funksjon av temperatur i både laks og torsk. Maksimalt væsketap ble observert ved 45-50°C. Ved høyere temperaturer så væsketapet ut til å reduseres.

Denaturering av myosin begynner rundt 40°C, og denatureringen fortsetter opp til 60°C. Deretter denatureres sarkoplasmproteiner og kollagen, og rundt 75-80°C denatureres myofibrillproteinene aktin og aktomyosin (Honikel 1989). Kollagen trekker seg sammen rundt 63°C, noe som resulterer i hardere tekstur. Dersom temperaturen økes ytterligere, vil kollagen omdannes til gelatin (Deng 1981). Tropomyosin og troponin er de mest varmeresistente myofibrillproteinene, og disse de-

natureres først rundt 80°C (Foegeding & Lanier 1996). Ifølge Rosnes et al. (2011) vil det i de fleste tilfeller være slik at det vil ta lengre tid før varmen sprer seg fra produktoverflaten til kjernen enn det tar å denaturere proteiner, selv ved lave temperaturer.

Poulter et al. (1985) konkluderte med at sammenlignet med fisk fra kaldere habitater, er kollagen- og myosinproteiner mer stabile i fisk som lever på områder med høyere omgivelsestemperatur. Denaturering av proteiner ved termisk behandling kan dermed variere mellom arter, noe som kan være en viktig faktor for å kunne optimalisere prosesserings- og lagringsmetoder for ulike fisketyper (Davies et al. 1988). Myosin fra fisk generelt lavere stabilitet enn myosin fra pattedyr (Connell 1961). Denaturering av kollagen begynner ved temperaturer mellom 30 og 40°C i torske- og laksemuskel (Ofstad et al. 1993, Howgate & Ahmed 1972), og resulterer i endring i muskelstrukturen, samt flakdannelse i fiskekjøttet (Rosnes et al. 2011). Flakdannelse skyldes at kollagen omdannes til gelatin (Baldwin 2012).

Varmeinduserte strukturelle endringer og proteindenaturering har vist seg å være irreversible (Ofstad et al. 1993, Skipnes et al. 2008). Ved nedkjøling etter termisk behandling, vil fiskekjøttet ha samme struktur som under oppvarmingen, og kun en liten del av væsketapet kan gjenabsorberes (Skipnes et al. 2011). Endringer i proteinkonformasjon som følge av denaturering eller aggregering ved høye temperaturer kan også føre til redusert proteinløselighet. Redusert mengde ekstraherte myofibrill- og sarkoplasmaproteiner er også funnet i torsk og hilsa (*Tenualosa ilisha*) (Howgate & Ahmed 1972). Vannløselige sarkoplasmaproteiner kan følge med væsken som tapes fra muskelen under varmebehandling, og proteinene kan koagulere på muskeloverflaten (Skipnes et al. 2011).

1.8.2 Sous vide

Sous vide er fransk for «under vakuum» og sous vide-matlaging defineres som «råmaterialer eller råmaterialer med mellommatprodukter som er tilberedt i varme-stabile poser med vakuum under kontrollerte betingelser for temperatur og tid» (Baldwin 2012, Schellekens 1996). Tanken bak sous vide er å kunne tilberede mat ved lavere temperaturer (vanligvis under 100°C) og over lengre tid enn tradisjonell varmebehandling. Sous vide-tilberedning av fisk og kjøtt foregår ofte ved temperaturer under 70°C, mens grønnsaker tilberedes rundt 95°C (Schellekens 1996). González-Fandos et al. (2004) konkluderte med at en kjernetemperatur til regnbueørret på 90°C i 3,3 minutter er det mest effektive for å oppnå mikrobiell trygghet og samtidig bevare sensorisk kvalitet.

Sous vide-matlagning skiller seg hovedsaklig fra tradisjonelle matlagingsmetoder på to punkter: Ved at ferske ingredienser vakkumpakkes i varmestabile plastikkposer, og at maten tilberedes ved bruk av presis og kontrollert oppvarming. Selve oppvarmingen foregår gjerne ved hjelp av vannbad eller en konveksjonsdampovn (Baldwin 2012). Ifølge Creed (1995) resulterer sous vide-metoden i mat med bedre smak, tekstur, farge og at næringsstoffer bevares bedre. Samtidig vil presis temperaturkontroll under sous vide-tilberedning gi mulighet for å få bedre kontroll på sluttresultatet, god reproduserbarhet, reduksjon i patogener til et akseptabelt og trygt nivå, og det åpner opp for å kunne velge ønsket tekstur. Enkelte kokker har benyttet sous vide helt siden 1970-tallet, men det var først ut på 2000-tallet at sous vide-konseptet ble allment kjent (Baldwin 2012). I løpet av det siste tiåret, har det vært en stor økning av sous vide-matlagning og -produkter, og i dag benyttes sous vide blant annet på restauranter, i hjemmet, av kommersielle og industrielle cateringselskaper, i skolekantiner og til flymat (Baldwin 2012, Creed 1995).

Det er hovedsaklig to konsepter for sous vide-matlagning, «cook-hold» eller «cook-serve» og «cook-chill» eller «cook-freeze». «Cook-hold» eller «cook-serve» sous vide innebærer vakuumpakking og oppvarming eller pasteurisering før servering. «Cook-chill» eller «cook-freeze» innebærer vakuumpakking, pasteurisering, rask avkjøling og kjølelagring eller fryselaugring før oppvarming igjen like før servering. Faren med «cook-chill» eller «cook-freeze» er at pasteurisering ikke nødvendigvis reduserer mengden patogene sporer til et trygt nivå, og dersom maten ikke avkjøles raskt nok eller kjølelagres for lenge, kan de patogene sporene vokse og formere seg til nivåer som er uakseptable for matprodukter (Baldwin 2012). Varmebehandlingen av makrell i denne studien ble gjennomført etter «cook-chill»-konseptet.

Vakuumpakking av matprodukter før varmebehandling har vist seg å ha flere fordeler. Hovedfordelen med vakuumsforsegling er at varme overføres effektivt fra vannbadet eller dampovnen til maten. I tillegg til god varmeoverføring, vil vakuumsforsegling forlenge holdbarheten til maten ved å redusere risikoen for rekontaminering og redusere tap av næringsstoffer. Lite tilgang på oksygen i vakuumatmosfæren vil hindre oksidasjon og dermed redusere dårlig smak og lukt som følge av dette (Baldwin 2012). Sous vide-tilberedning resulterer i bevaring av saftighet, redusert tap av smaksstoffer, og redusert væsketap under varmeprosessen (Church & Parsons 2000). Også redusert aerobisk vekst av bakterier er observert ved sous vide-tilberedning av mat (Baldwin 2012).

Til tross for at sous vide-tilberedning er mildere enn tradisjonell varmebehandling, kan endringer i kvalitetsparametre som tekstur, farge, oksidasjon av lipider og proteiner, mengde løselige proteiner og væsketap også observeres for sous vide-muskelmat. Díaz et al. (2010) fant ubetydelige endringer i vannaktivitet og farge

for laks tilberedt med «cook-chill» og kjølelagret (2°C) i opptil 10 uker. Videre ble det rapportert om redusert sensorisk kvalitet til laksen under lagringsperioden, som følge av mikrobiell og fysio-kjemisk bedervelse. Det er funnet signifikant lavere vanninnhold i sous-vide-prosessert laks og ørret, sammenlignet med rå fiskemuskel (García-Linares et al. 2004), noe som tyder på stort væsketap under prosesseringen. Proteininnholdet i samme studie, var også lavere i etter sous vide-prosessen.

1.9 Målet med dette arbeidet

Konsum av fet fisk som makrell er gunstig for god folkehelse, ettersom makrell inneholder viktige næringsstoffer som lipider, proteiner og vannløselige forbindelser. Dette arbeidet hadde to mål. I den første delen var målet å optimalisere kjølelagring av makrell gjennom kjøling på is og superskjøling. Fryselagring ble brukt som referanse. Tidligere studier har vist at makrell kun kan lagres noen få dager ved kjøling. For å kunne studere og optimalisere lagringsmetodene ble endringer i kvalitet og biokjemiske egenskaper som proteinløselighet, drypptap, proteinoksidasjon og endring i enzymaktivitet bestemt for makrell lagret superkjølt og kjølig på is.

I den andre delen var målet å studere hvilken effekt ulik varmebehandling og påfølgende kjølelagring hadde på endringer i ulike kvalitetsparametre til makrell.

2 Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier

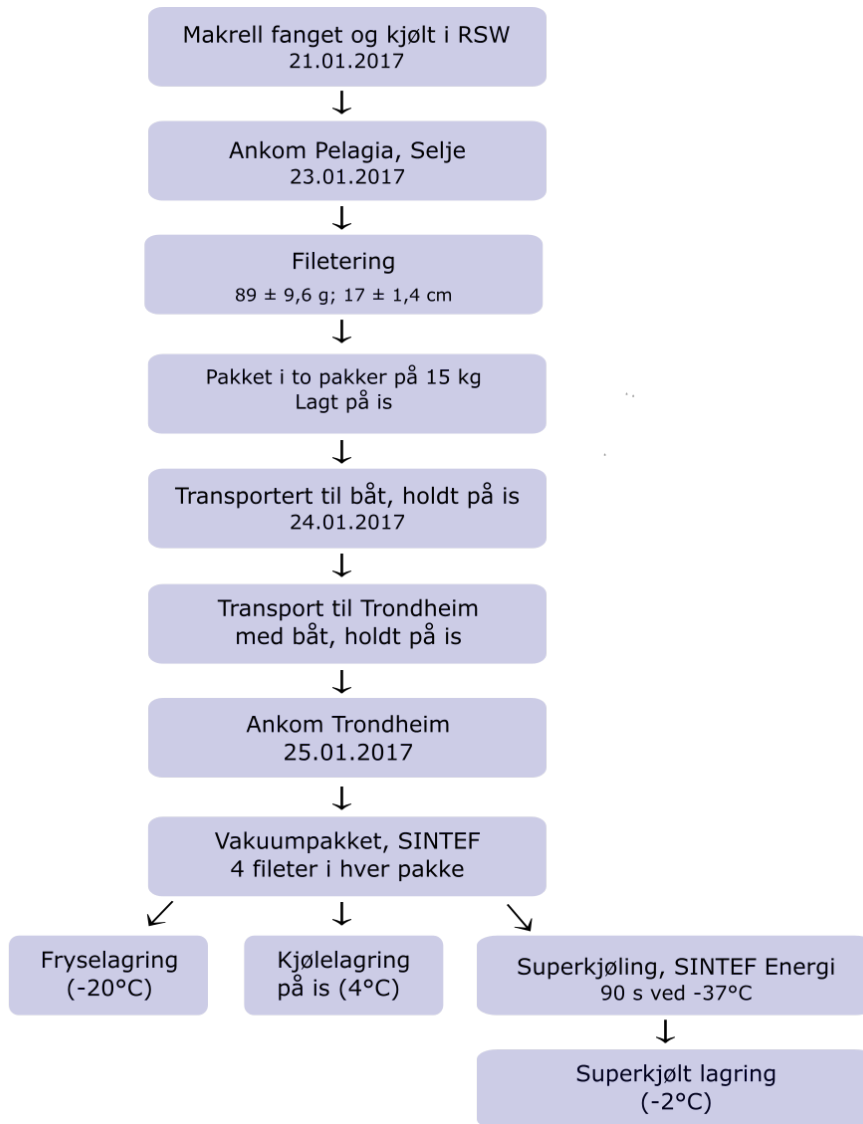
Nedenfor er det gitt en oversikt over kjemikalier og kjemikalieprodusenter som ble benyttet i forbindelse med denne oppgaven.

- Bovin gamma globulin (BGG): SIGMA
- BioRad-reagens (Coomassie Brilliant blue G-250): Bio-Rad Laboratories GmbH
- Bis-tris: Applichem Panreac
- Bovin serum albumin (BSA): SIGMA
- Dithiothreitol (DTT): SIGMA
- Etylendiamintetraacetat (EDTA): MERCK
- Karbobenzoxy-fenylalanyl-arginin-4-metylcoumaryl-7-amid: SIGMA
- Kaliumklorid (KCl): MERCK KGaA EMSURE[®]
- Monokaliumfosfat (KH_2PO_4): MERCK KGaA
- Natriumklorid (NaCl): VWR Chemicals
- Natriummonohydrogenfosfat (Na_2HPO_4): Fluka
- Natriumhydroksid (NaOH): VWR International
- Natriumdodecylsulfat (SDS): SIGMA
- 5-sulfosalisylysyre (dihydrat): MERCK

2.2 Eksperimentoppsett til lagringsforsøk

Makrellen brukt i dette studiet ble fanget 21.01.2017, kjølt med sjøvann (RSW), og levert til Pelagia AS i Selje dagen etter. Pelagia AS er en ledende produsent av pelagiske fiskeprodukter til menneskelig konsum, og de driver 26 fabrikker i Norge, Storbritannia, Irland og Danmark (Pelagia 2017). Hos Pelagia ble makrellen filetert til fileter på $89 \pm 9,6$ g og en lengde på $17 \pm 1,4$ cm. Makrellfiletene hadde en tykkelse på 1-2 cm. Videre ble makrellfiletene pakket i pakker på 15 kg og lagt på is på kjølerom, før de ble fraktet med båt til Trondheim. Under transport ble makrellpakkene holdt på is. Makrellen ankom Trondheim og SINTEF den 25.01.2017, fire dager etter fangstdatoen. Hos SINTEF Fiskeri og havbruk ble

makrellen vakuumpakket med 4 fileter i hver pakke, og pakkene med makrellfiletene ble lagret kjølt, superkjørt eller fryst. Et flyskjema for arbeidsprosessen frem til lagringsmetodene er gitt i Figur 2.1. Figur 2.2 viser vakuumpakkede makrellfileter holdt på is før lagring.



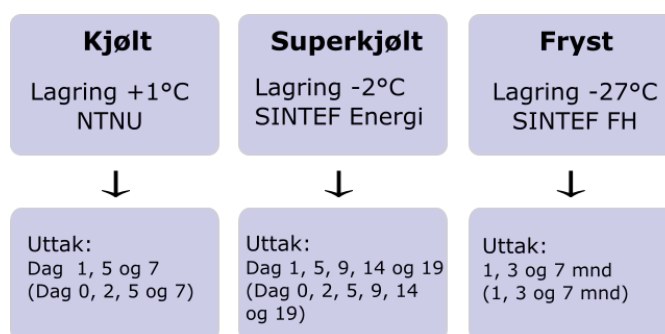
Figur 2.1: Flytskjema for arbeidsprosessen fra fangst av makrell til kjølelagring, fryselagring og superkjølt lagring før utførelse av analyser.



Figur 2.2: Vakuumpakkede makrellfileter hold på is før lagring.

2.2.1 Lagring av makrell

En oversikt over lagringsmetodene og prøveuttaksdager er gitt i Figur 2.3. Dag 0 er satt til den dagen pakkene med makrell ble lagret (superkjølt, kjølt eller fryst), den 25.01.2107.



Figur 2.3: Oversikt over lagringsmetodene kjøling, superkjøling og fryselagring, samt uttaksdager der videre analyser ble gjennomført. Uttaksdagene i parentes gjelder for analysene: mikrobiell status, drypptap, NMR, fargemåling og tekstur. Uttaksdagene uten parentes gjelder for: mengde CTF, proteinløselighet, proteinoksidasjon, proteolytisk aktivitet og bestemmelse av fire aminosyrer. Dag 0 er satt til dagen makrellen ble lagret.

Kjølelagring

Pakker med kjølt makrell ble lagret på is ved 4°C, og holdt omtrent +1°C. De kjølte prøvene ble lagret hos NTNU. Analysene mikrobiologi, drypptap, uttak av prøver til NMR-analyse, fargemåling og tekstur ble utført på kjølt makrell etter 0, 2, 5 og 7 dager, som illustrert i Figur 2.5. Bestemmelse av mengde CTF, proteinløselighet, proteinoksidasjon og frie aminosyrer ble utført på kjølte prøver etter 1, 5 og 7 dager, og er illustrert i Figur 2.6.

Superkjøling

Vakuumpakkede makrellfileter ble skallfryst hos SINTEF Energi (Frigoscandia Equipment, IMPINGEMENT FREEZER, FMC FoodTech) i 90 sekunder ved -37°C . Prøvene ble så lagret ved -2°C (Termaks), frem til prøveuttak dag 1, 2, 5, 9, 11 og 19 etter superkjølingsprosessen. Superkjølt makrell ble tint på kjølerom (4°C) i 3-4 timer de aktuelle uttaksdagene. Mikrobiell status, drypptap, farge og tekstur ble bestemt dag 0, 2, 5, 9, 11 og 19. På de samme dagene ble det tatt ut prøver for NMR-analyse. Bestemmelse av mengde CTF, proteinløselighet, proteinoksidasjon, proteolytisk aktivitet og frie aminosyrer ble utført på superkjølte prøver etter 1, 5, 9, 11 og 19 dager.



Figur 2.4: Skallfrysing av vakuumpakkede makrellfileter før superkjølt lagring ble gjort i 90 sekunder ved -37°C .

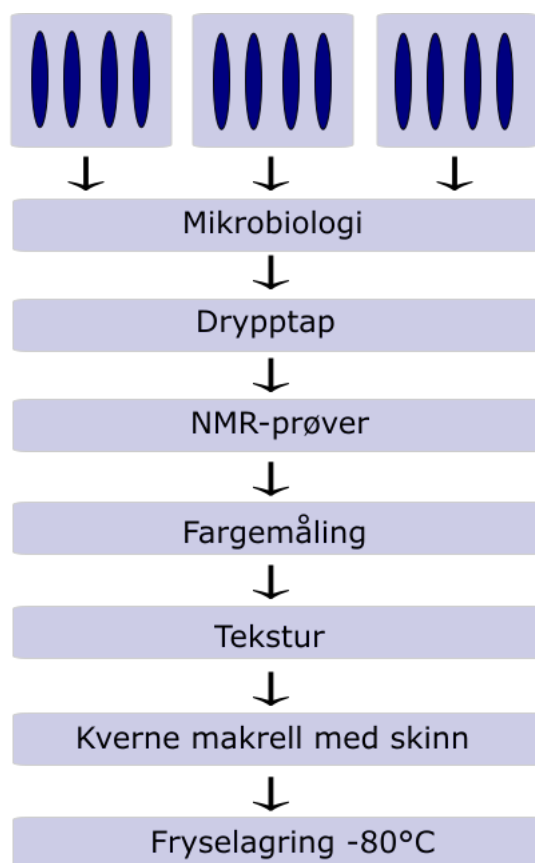
Fryselagring

Fryst makrell ble lagret ved -27°C hos SINTEF Fiskeri og havbruk, og fryste prøver ble analysert etter én måned (33 dager).

2.2.2 Oversikt over analyser

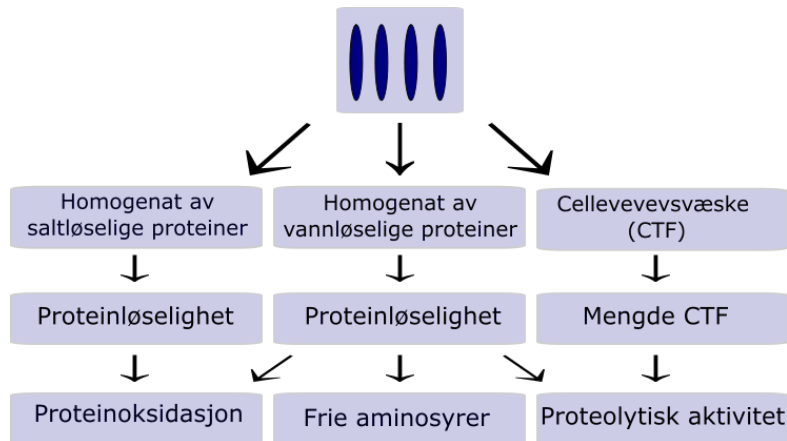
Hver pakke bestod av 4 makrellfileter, og alle analysene ble gjort på alle fire filetene, så hver analyse ble utført i fire paralleller for hver uttaksdag og lagringsmetode. Ved hvert uttak gikk tre makrellpakker med til analysene: mikrobiell status, drypptap, fargemåling og tekstur. Dette er vist i flytskjemaet gitt i

Figur 2.5. I tillegg ble det tatt ut prøver til NMR-analyse for bestemmelse av lavmolekylære metabolitter, og prøvene ble fryselagret (-20°C) før NRM-analysen. NMR-resultater er ikke inkludert i denne oppgaven. Etter hvert prøveuttak ble de fire makrellfiletene kvernet sammen med skinnet på i en foodprocessor (BOSCH, MaxoMixx 800 W: 2-3 minutter), fryst ned (-80°C) og lagret før bestemmelse av vanninnhold og lipidanalyser. Resultater fra lipidanalyser er ikke inkludert i denne oppgaven.



Figur 2.5: Flytskjema for analyser utført på makrellfileter. Alle analysene ble utført på kjølte (dag 0, 2, 5 og 7) og superkjølte (dag 0, 2, 5, 9, 11 og 19) prøver, samt prøver fryst én måned. Analysene ble utført på alle fire filetene i hver pakke.

Ved hvert uttak ble én pakke med makrellfileter brukt til å bestemme mengde CTF, proteinløselighet, proteinoksidasjon, proteolytisk aktivitet og frie aminosyrer. I Figur 2.6 er det gitt et flytskjema med oversikt over dette.



Figur 2.6: Flytskjema for analyser utført på makrellfileter. Alle analysene ble utført på kjølte (dag 1, 5 og 7) og superkjølte (dag 1, 5, 9, 11 og 19) prøver, samt prøver fryst én måned. Analysene ble utført på alle fire filetene i hver pakke.

2.3 Tillaging av CTF og homogenat

2.3.1 CTF

Tillaging av CTF ble gjort som beskrevet av Nilsson & Ekstrand (1993). 10-20 g grovkuttet makrellfillet ble veid ut i sentrifugerør før sentrifugering (Sorvall[®] Instruments RC5C, SS-34 rotor: 28 000×g, 30 minutter, 4°C). Etter sentrifugering ble supernatantet, cellevevsvæsken (CTF), forsiktig pipettert av med glasspipette og tilført forveide eppendorfrør. Kvantifisering av CTF ble bestemt ved å veie eppendorfrørene, og mengde CTF ble bestemt for hver makrellfillet som vektprosent CTF i våtvekt. Eppendorfrørene med CTF ble fryst ned (-20°C) før bestemmelse av proteolytisk aktivitet.

2.3.2 Homogenat av vann- og saltløselige proteiner

Homogenat av vann- og saltløselige proteiner ble lagd for hver makrellfillet. Vann- og saltløselige fraksjoner ble ekstrahert som beskrevet av Hultmann & Rustad (2002), basert på metoden beskrevet av Anderson & Ravesi (1968) og Licciardello et al. (1982). 4 g hvit muskel ble veid ut i sentrifugerør, tilsatt 80 mL fosfatbuffer (0,05 M KH₂PO₄, pH 7,0), homogenisert (IKA ULTRA-TURRAX[®] T25 digital, S25N-/01: 12 000 rpm, 30 sekunder) og sentrifugert (Sorvall[®] RC5B PLUS, SLA 1500: 7 970×g, 20 minutter, 4°C). Supernatanten, som tilsvarer homogenat

av vannløselige proteiner, ble filtrert gjennom glassull og volumet ble oppjustert til 100 mL med fosfatbuffer. Prøvene ble oppbevart på is før og etter homogeniseringen, samt etter sentrifugering. De vannløselige ekstraktene ble etter bestemmelse av proteinløselighet og proteinoksidasjon (Avsnittene 2.4.1 og 2.4.8) fryst ned (-20°C) før bestemmelse av frie aminosyrer og enzymaktivitet.

For å få den saltløselige fraksjonen, ble bunnfallet etter tillaging av vannløselig fraksjon tilsatt 80 mL fosfatbuffer med KCl (0,05 M KH_2PO_4 , 0,6 M KCl, pH 7,0), homogenisert (IKA ULTRA-TURRAX[®] T25 digital, S25N-/01: 12 000 rpm, 30 sekunder) og sentrifugert (Sorvall[®]RC5B PLUS, SLA 1500: 7 970×g, 20 minutter, 4°C) som tidligere. Supernatanten ble filtrert gjennom glassull, og volumet oppjustert til 100 mL med fosfatbuffer med KCl. Dette tilsvarer homogenat av saltløselige proteiner. Ekstraksjonsprosedyren ble utført en gang på hver makrellfillet.

2.4 Kjemiske analyser

2.4.1 Proteininnhold

Proteinløselighet ble bestemt som mengde vann- og saltløselige proteiner ved Bio-Rad-metoden som beskrevet av Bradford (1976). Dette er en fargebindingsanalyse for bestemmelse av proteininnhold som involverer binding av Coomassie Brilliant Blue G-250 til protein. Binding av protein til fargestoffet fører til en endring i absorpsjonsmaksimumet fra 465 til 595 nm (Bradford 1976).

Bovine gamma globulin (BGG) ble brukt som standard, og en stock-løsning av 1,5 mg/mL BGG ble fortynnet til 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 og 1,5 mg/mL. Homogenat av henholdsvis vann- og saltløselige proteiner ble lagd som beskrevet i Avsnitt 2.3.2. Prøvene ble fortynnet med destillert vann til passende fortynning.

100 μL fortynnet prøve ble overført til reagensrør, 5,0 mL fortynnet Bio-Rad farge-reagens ble tilsatt før rørene ble mikset. Reagensrørene ble mikset igjen rett før måling av absorbans ved 595 nm (Thermo SCIENTIFIC GENESYS 10s UV-VIS spectrophotometer). Proteinløseligheten ble bestemt i tre paralleller for både vann- og saltløselige fraksjoner for alle makrellfiletene, og er gitt som mengde protein i prosent av våtvekt makrell.

2.4.2 Mikrobiologi

Mikrobiell status ble bestemt ved hjelp av et analysesett utviklet av LABOLYTIC. Settet besto av dyrkningsslider som er en plastplate med agarfilm på begge sider.

De vakuumpakkede makrellpakkene ble åpnet, og dyrkningssliden ble umiddelbart presset mot makrellfiletene, før filetene ble tatt ut fra pakken. Først den ene siden av dyrkningssliden, så den andre. Deretter ble rørene med dyrkningsslider satt til inkubering ved 30°C i 48 timer før antall kolonier ble telt, og mikrobiell status bestemt som kolonidannende enheter (CFU)/cm² ved å sammenligne dyrkningsslidene med et sammenligningsdiagram som fulgte med analysesettet. Diagrammet er gitt i Figur A.1 i Vedlegg A. Hver uttaksdag ble mikrobiell status bestemt for seks paralleller, tre pakker med makrellfileter, samt begge sidene av dyrkningsslider per pakke. Analysen ble gjennomført av Janna Cropotova.

2.4.3 Drypptap

Mengde drypptap ble bestemt for kjølte og superkjølte prøver, samt prøver fryst én måned. En pakke med fire makrellfileter ble veid, deretter ble dryppet tørket av filetene og fra pakken med tørkepapir, før veiing av den tomme pakken. Videre ble pakken med filetene veid på nytt uten dryppet. Drypptap ble bestemt som % av utveid makrell, og analysen ble utført på tre pakker makrell (tre paralleller) hver uttaksdag og for hver lagringsmetode. Analysen ble gjennomført av Janna Cropotova.

2.4.4 Fargemåling

Fargen til makrellfileter ble målt med et Konica Minolta CR-400 chromameter (Osaka, Japan), som var kalibrert mot en standard hvit, reflekterende plate med samme lysbetingelser og temperatur (20°C) som prøvene. Farge ble målt i fargekoordinatene a* (+60 (rød) til -60 (grønn)), b* (+60 (gul) til -60 (blå)) og L* (0 (svart) til 100 (hvit)) for å måle grad av rødhets, gulhet og lyshet, etter CIELab-skalaen. Fargen ble målt i tre punkter langs hver makrellfilet, og analysen ble utført av Janna Cropotova.

2.4.5 Tekstur

Teksturen til ferske (prøver fra dag 0), kjølte og superkjølte makrellfileter ble evaluert instrumentelt ved hjelp av en TA-XT2-teksturmåler (SMS Stable Micro

System Ltd., Surrey, England), utstyrt med et lodd på 1 kg. Motstanden ble målt i Newton (N) mens prøvene ble presset ned til 60 % av filettykkelsen av en sylinder med flat overflate i enden (12,5 mm i diameter) ved en konstant fart på 1 mm/s. Teksturmåling ble gjort ved å komprimere makrellfiletene to ganger ved hjelp av mekanisk kraft, og teksturparametrene ble bestemt ut ifra en kraft-tid-kurve. Kompresjonen skal etterligne de første tyggene av matprodukter. Figur 2.7 viser teksturmåling av en filet. Teksturparametrene hardhet, bruddstyrke, kohesivitet og gummiaktighet ble bestemt. Teksturmålinger ble gjort på to til fire punkter på begge sider av den laterale midtlinjen på makrellfiletene. Analysen ble utført av Janna Cropotova.



Figur 2.7: Teksturmåling av makrellfilet ved hjelp av en TA-XT2-teksturmåler, utstyrt med et lodd på 1 kg. Foto: Janna Cropotova

2.4.6 Vanninnhold

I og med at vanninnhold er viktig for kvaliteten til fisk, ble vanninnholdet bestemt for makrellfileter. Makrellfileter kvernet med skinnet på og fryselagret (-80°C), ble benyttet. Det ble veid ut ~ 2 g fiskemasse i forveide aluminiumsskåler. Aluminiumsskålene ble plassert i varmeskap (Termaks) ved 105°C i 24 timer, og ble satt i eksikator minst en time før veiing. Skålene ble veid igjen, og vanninnholdet ble bestemt i % av våtvekt. Vanninnhold ble bestemt for superkjølte prøver lagret i 14 dager. Det ble analysert to paralleller for hver prøve. Bestemmelse av vanninnhold i de resterende prøvene skal gjøres senere. Analysen ble gjennomført av praktikant Line Døhl Schjøllberg.

2.4.7 Lipidinnhold

Lipidinnhold ble bestemt for superkjølte prøver på dag 2 ($n = 9$) og dag 14 ($n = 12$) etter metoden beskrevet av (Bligh & Dyer 1959). Bestemmelse av lipidinnhold ble utført av Emilia Budzko. Lipidinnhold og oksidasjonsstatus til de resterende prøvene vil bli besetemt som en del av en masteroppgave som skal leveres våren 2018.

2.4.8 Proteinoksidasjon

Proteinoksidasjon i vann- og saltløselige homogenater ble evaluert ved å måle totalt karbonylgruppeinnhold. Proteinkarbonylering ble bestemt etter en enzyumbundet immunosorbent-analyse, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), en metode utviklet av Buss et al. (1997) og videreutviklet av Alamdari et al. (2005). Metoden heter OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA kit (STA-310), og analysesettet produseres av CELL BIOLABS, INC. Proteinkarbonylmetoden er basert på derivatisering av karbonylgrupper med dinitrophenylhydrazin (DNPH) og bestemmelse av 2,4-Dinitrofenol (DNP) bundet til protein med et antistoff (anti-DNP). Metoden er som følgende:

Tillaging av proteinkarbonylstandard

Oksidert bovin serum albumin (BSA) ble benyttet som standard. $10 \mu\text{g/mL}$ av redusert og oksidert BSA ble laget ved å fortynne 1 mg/mL BSA-standarder i 1X PBS-buffer (137 mM NaCl , $2,7 \text{ mM KCl}$, $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1,8 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4). En fortyningsserie med ulike proteinkarbonylkonsentrasjoner ble laget ved å blande oksidert BSA og redusert BSA. Karbonylkonsentrasjonene er gitt i Tabell 2.1. Det ble analysert tre paralleller for hver karbonylkonsentrasjon.

Tabell 2.1: Konsentrasjon av proteinkarbonyl-BSA benyttet som standard i ELISA-analysen for bestemmelse av karbonylinnhold, et mål på proteinoksidasjon.

Nummer på rør	[Proteinkarbonyl] [nmol/mg]
1	7,5
2	6,0
3	4,5
4	3,0
5	1,5
6	0,75
7	0,375
8	0

Preparering av prøver

Proteinkonsentrasjonen i vann- og saltløselige homogenater ble bestemt ved BioRad-metoden som beskrevet i Avsnitt 2.4.1. Deretter ble homogenatene fortynnet til en konsentrasjon på 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 1X PBS-buffer. Dette ble gjort for kjølte og superkjølte prøver, samt for prøver fryst én måned. De kjølte og superkjølte prøvene fra dag 1 og 5 ble analysert i to paralleller, mens prøvene fra de resterende dagene ble analysert i tre paralleller.

Analysebeskrivelse

100 μL av 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinprøver eller redusert/oksidert BSA-standarer ble tilsatt brønner på en proteinbindingsplate med 96 brønner, før platen ble satt til inkubering (4°C) over natten. Proteinene adsorberes til overflaten i brønnene på grunn av hydrofobe interaksjoner mellom protein og plastbrønner. Etter inkubering ble brønnene vasket tre ganger med 250 μL 1X PBS i hver brønn, og etter siste vask ble platen slått mot papir for å fjerne resterende vaskeløsning.

Videre ble hver brønn tilsatt 100 μL 0,04 mg/mL DNPH (1 mg/mL DNPH Stock-løsning ble fortynnet med DNPH Diluent rett før bruk), og platen ble inkubert mørkt i romtemperatur i 45 minutter. Brønnene ble så vasket med 250 μL 1X PBS/Etanol (1:1 v/v), med inkubering på en «Orbital shaker» (Grant-bio Orbital Shaker PSU-10i) i 5 minutter. Vaskingen ble gjentatt fem ganger med lufttørking mellom hver vask. Etter siste vask ble brønnene tømt og slått mot et absorberende

papir for å fjerne resterende vaskeløsning. Deretter ble brønnene vasket to ganger med 250 μL 1X PBS.

Det ble så tilsatt 200 μL 5 % Blocking Solution (5 g Blocking Reagent løst i 100 mL 1X PBS) til hver brønn, før inkubering i romtemperatur på en «Orbital shaker» i 1 time. Blokkeringsløsninger inneholder melkeproteiner (Alamdari et al. 2005). Videre ble brønnene vasket tre ganger med 250 μL 1X Wash Buffer (10X Wash Buffer Concentrate fortynnet med deionisert vann), med lufttørking mellom hver vask. Etter siste vask ble resten av vaskeløsningen fjernet ved å slå platen over absorberende papir. 100 μL fortynnet anti-DNP antistoff (Anti-DNP antistoff fortynnet 1:1000 med 1X Blocking Solution rett før bruk) ble tilsatt hver brønn, før platen ble satt til inkubering i 1 time i romtemperatur på en «orbital shaker». Etter inkubering ble brønnene vasket tre ganger med 250 μL 1X Wash Buffer som tidligere beskrevet. Deretter ble det tilsatt 100 μL fortynnet HRP-konjugert sekundært antistoff (sekundært antistoff fortynnet 1:1000 med 1X Blocking Solution rett før bruk) før inkubering i 1 time i romtemperatur på en «Orbital shaker». Deretter ble brønnene vasket fem ganger med 1X Wash Buffer som nevnt over.

100 μL romtemperert Substrate Solution ble tilsatt i alle brønnene, før brønnene igjen ble inkubert på en «Orbital shaker» i romtemperatur. Enzymreaksjonen ble stoppet før reaksjonen nådde metningspunktet, ved tilsats av 100 μL Stop Solution til hver brønn. Hvor rask fargeendringen skjedde var avgjørende for hvor lang inkuberingstiden ble. Resultatene ble målt med det samme, siden fargen kan falme over tid. Absorbansen til hver brønn ble målt ved hjelp av en plateleser (TECAN SPARK20M te-cool) med en primær bølglengde på 450 nm. Fullstendig redusert BSA-standard ble brukt som blankprøve.

2.4.9 Aktivitet av katepsin B+L-lignende enzymer

Proteolytiske enzymer kutter peptidbindinger og nedbryter proteiner. En metode for å bestemme aktiviteten til spesifikke proteolytiske enzymer, er å tilsette bestemte substrater som består av aminosyrer og den fluorescerende forbindelsen 4-methylcoumaryl-7-amid (AMC). Substratet er ikke selv fluorescerende, men fritt AMC kan måles ved hjelp av fluorescens. Katepsin B+L-lignende enzymer kan spalte av AMC fra substratet karbobenzoxy-fenylalanyl-arginin-4-metylcoumaryl-7-amid (Barrett & Kirschke 1981). Aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer ble bestemt for vannløselige homogenater og for CTF fra alle makrellfiletene, etter metoden beskrevet av Stoknes & Rustad (1995), Hultmann et al. (2004). Analysen ble utført i tre paralleller for hver prøve.

Homogenat- og CTF-prøvene, laget som beskrevet i Avsnitt 2.3.2 og 2.3.1, ble tint før analysen. 100 μL reaksjonsbuffer (150 mM bis-Tris, 30 mM EDTA, 6 mM DTT, pH 6,0) ble hatt i reagensrør og tilsatt 100 μL ferdig fortynnet prøve. Homogenatene ble fortynnet 1:2 (bortsett fra de kjølte prøvene fra dag 1 som var ufortynnet) og CTF-prøvene ble fortynnet 1:20. Blank prøve bestod av 100 μL destillert vann. Reagensrørene ble satt i vannbad (30°C) i 15 minutter før reaksjonen ble startet ved tilsats av 100 μL av substratet (0,09375 mM karbobenzoxy-fenylalanyl-arginin-4-metylcoumaryl-7-amid) (Barrett & Kirschke 1981). Etter videre inkubering i vannbad (30°C, 15 minutter), ble reaksjonen stoppet ved tilsats av 3,0 mL stoppløsning (1 % SDS 50 mM bis-Tris, pH 7,0) til alle reagensrørene. Reagensrørene ble deretter avkjølt. Homogenatprøvene ble satt på is, mens CTF-prøvene ble satt i kaldt springvann. Prøvene satt på is ble blakket etter en stund, noe som kan ha påvirket måleresultatene.

Fluorescens ble målt for alle prøvene med et spektrometer (PERKIN ELMER Luminescence spectrometer LS50B) ved en emisjonsbølgelengde på 360 nm og en eksitasjonsbølgelengde på 460 nm. Endring i intensitet ble bestemt ved å trekke fra verdien til tilhørende blankprøve fra intensiteten til hver av prøvene.

2.4.10 Frie aminosyrer

Mengde frie aminosyrer (FAA) i homogenat av vannløselige proteiner ble bestemt etter metoden beskrevet av Osnes & Mohr (1985), og ble bestemt for alle prøvene. Bestemmelse av frie aminosyrer ble gjort i tre paralleller for hver makrellfillet.

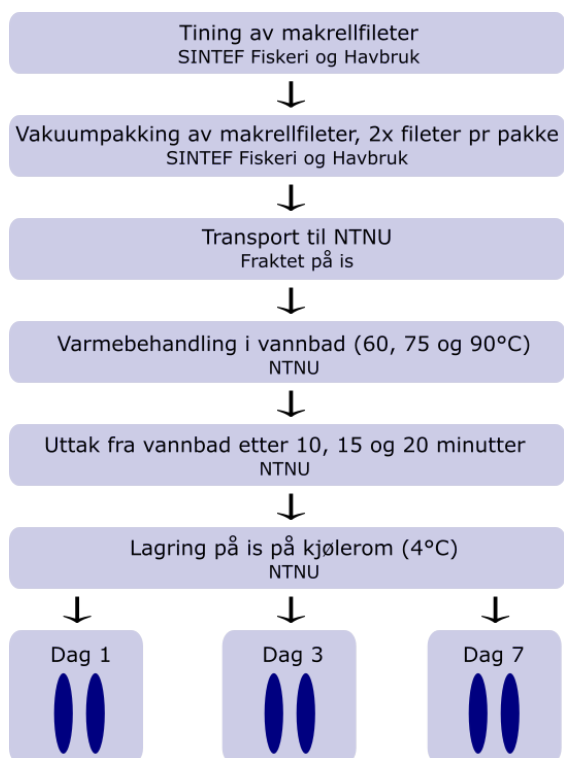
1 mL vannløselig ekstrakt og 0,25 mL 10 % sulfosalisytsyre ble blandet i eppendorfrør. Prøvene stod kjølig (4°C) i 30 minutter, før de ble sentrifugert (Centrifuge 5415R (Eppendorf AG): 9 300 \times g, 10 minutter, 4°C). For å sjekke at alt av proteiner var felt ut, ble prosedyren gjentatt ved å ta ut prøve (0,5 mL) fra én av parallellenes supernatant og tilsette sulfosalisytsyre (10 %, 0,125 mL), før risting, kjøling og sentrifugering som tidligere. Siden det ikke ble bunnfall i andre runde, ble supernatant fra de første parallellene tatt ut og fortynnet 1:20 med ionefritt vann. Fortynningene ble filtrert gjennom filter med porestørrelse 0,2 μm og fryst ned (-20°C) før kjøring på revers HPLC (Ultimate 3000 (Thermo Scientific), Dionex RF 2000 fluorescence detector). HPLC-analysen ble utført av Siri Stavrum ved NTNU.

Aminosyrene glysin og arginin ble bestemt sammen, siden toppene overlapper hverandre. Total mengde FAA ble bestemt til mg FAA/g våtvekt. FAA ble beregnet som en del av proteinet, ved at molekylvekten til vann (18 g/mol) ble subtrahert fra molekylvekten til aminosyrene. I tillegg ble mengden av hver aminosyre bestemt

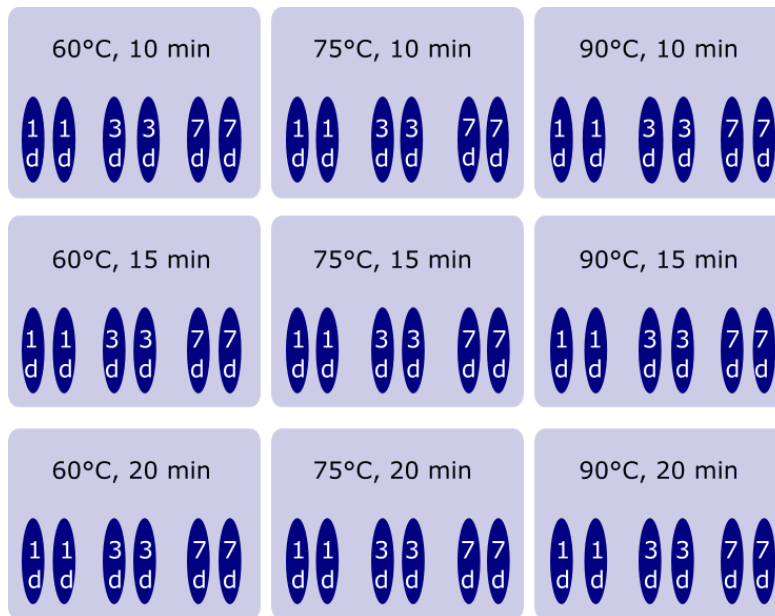
for, å se hvilke aminosyrer som dominerer.

2.5 Varmebehandling av makrell - Sous vide

Det ble også gjennomført et lagringsforsøk med varmebehandlet makrell, som en del av ProHealth-prosjektet. Makrellfileter fryselauret i litt over to måneder ble benyttet. Figur 2.8 viser et flytskjema for varmebehandlingsprosessen. Fryste makrellfileter ble tint på is på kjølerom (4°C) over natten. Videre ble makrellfiletene vakuumpakket (WEBOMATIC. Super Max: P = 4) med to fileter i hver pakke. De vakuumpakkede makrellpakkene ble holdt på is frem til varmebehandlingen. Pakker med makrell ble varmebehandlet i vannbad ved 60, 75 og 90°C, og for hver temperatur ble makrellprøvene varmet i 10, 15 og 20 minutter. Vakuumpakkene med makrell ble lagt på is rett fra vannbadene, og ble lagret på is på kjølerom (4°C) frem til prøveuttakene. Varmebehandlet makrell ble analysert etter 1, 3 og 7 dager, der dag 0 ble satt til dagen varmebehandlingen fant sted. 90°C-prøvene ble ikke tint over natten før varmebehandling, men lå omtrent fire timer på is på kjølerom, og måtte tines ytterligere i vannbad. En oversikt over alle prøvene er gitt i Figur 2.9.



Figur 2.8: Flytskjema for varmebehandling av makrellfileter. Varmebehandling ble utført i vannbad med 60, 75 og 90°C, og pakker med makrell ble varmebehandlet i 10, 15 og 20 minutter for hver temperatur. Videre analyser ble utført på makrellfiletene etter 1, 3 og 7 dager. Dag 0 er satt til dagen varmebehandlingen fant sted.



Figur 2.9: Oversikt over alle varmebehandlede prøver. Makrellfileter ble varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Uttak og analyser ble utført dag 1, 3 og 7 etter varmebehandling.

Mikrobiell status, drypptap, farge og tekstur ble bestemt for de varmebehandlede makrellfiletene som beskrevet i henholdsvis Avsnitt 2.4.2, 2.4.3, 2.4.4 og 2.4.5. I tillegg ble én pakke makrellfileter som ikke var varmebehandlet analysert som kontrollprøve. Drypptap ble kun analysert i én parallell for hver prøve, ettersom ingen makrellpakker ble varmebehandlet ved samme temperatur og tid i vannbad. Ved bestemmelse av mikrobiell status ble hver side av dyrkningssliden presset mot hver sin makrellfilet. På grunn av dårligere tekstur, ble kun teksturparameterene bruddstyrke og kohesivitet målt. Analysene ble gjennomført av Janna Cropotova.

2.5.1 Tillaging av homogenat

Omtrent like mye fiskemuskel ble tatt fra de to filetene i hver pakke, grovkuttet i biter og blandet sammen. Av denne blandingen ble det veid ut til tillaging av homogenat. På grunn av liten mengde løselige proteiner, ble det veid ut ulike mengder makrell. Omtrentlig mengde veid ut til de ulike homogenatene er gitt i Tabell 2.2. Vann- og saltløselig homogenat ble lagd som beskrevet i Avsnitt 2.3.2.

Tabell 2.2: Omtrentlig mengde makrellmuskel veid ut til tillaging av homogenat av vann- og saltløselige proteiner. På grunn av lite løst protein ble mengden økt utover i lagringsperioden og for høyere varmebehandlingstemperaturer. Mengde makrell veid ut er gitt for hver temperatur (60, 75 og 90°C) og for hver tid i vannbad (min) og dag for uttak (dag).

min-dag	60°C	75°C	90°C
10-1	4	4	25
10-3	4	4	25
10-7	4	4	25
15-1	8	10	30
15-3	8	10	30
15-7	8	10	30
20-1	10	11	30
20-3	10	11	30
20-7	10	11	30

Etter bestemmelse av proteinløselighet og proteinoksidasjon, ble homogenat av vannløselige proteiner fryst ned (-20°C) før videre analyser. Det ble også fryst ned fiskemasse fra alle prøvene som senere ble brukt til å bestemme vanninnhold.

2.5.2 Proteininnhold

Proteinløselighet ble bestemt for alle de varmebehandlede makrellprøvene ved BioRad-metoden, som beskrevet i Avsnitt 2.4.1. Både vann- og saltløselige fraksjoner, fremstilt som beskrevet i Avsnitt 2.5.1, ble analysert ufortynnet på grunn av lav proteinkonentrasjon. Det ble analysert tre paralleller av hver prøve. Proteinløselighet ble bestemt for prøver varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C, i 10, 15 og 20 minutter, og etter 1, 3 og 7 dager lagring på is på kjølerom (4°C).

2.5.3 Proteinoksidasjon

Proteinoksidasjon ble bestemt som beskrevet i Avsnitt 2.4.8 for homogenater av vann- og saltløselige proteiner, og analysen ble utført på makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10 minutter, fra uttaket dag 1. På grunn av høy konsentrasjon av karbonylgrupper, ble homogenatene fortynnet 1:5 med 10 µg/mL redusert BSA. Proteinoksidasjon ble analysert i tre paralleller for hver prøve.

2.5.4 Vanninnhold

Vanninnholdet i varmebehandlet makrell ble bestemt som forklart i Avsnitt 2.4.6. Fryst (-20°C) fiskemasse ble ikke tint før utveiging, for å unngå ytterligere vanntap. Vanninnholdet ble bestemt til prosent vann av våtvekt, og ble bestemt for tre paralleller av hver prøve.

2.6 Statistisk analyse

Statistiske analyser og databehandling ble gjort i Microsoft Excel 2016. Alle analysene ble utført i duplikater eller med flere paralleller, og resultatene er presentert som gjennomsnittsverdi \pm standardavvik (SD) eller som gjennomsnittsverdi \pm standardfeil (SEM). Formelen for empirisk SD (σ_x) er gitt Likning (2.1) og SEM ($\sigma_{\bar{x}}$) er beregnet etter Likning (2.2), der N er antall paralleller, x_i er analyseverdien til prøve i og \bar{x} er gjennomsnittsverdien. Hvilken av SD og SEM som er benyttet er spesifisert for hver enkelt analyse og avhenger av antall paralleller. For kjølte og superkjølte prøver, samt prøver fryst én måned der det ble analysert fire fisk ved hvert uttak og tre paralleller for hver fisk ($n = 12$), ble SEM benyttet for å finne avviket. For varmebehandlede makrellfiletene, der det kun ble analysert tre paralleller for hvert prøveuttak ($n = 3$), ble SD benyttet.

$$SD = \sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.1)$$

$$SEM = \sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{N}} \quad (2.2)$$

For å undersøke om det var signifikante forskjeller mellom resultater fra ulike datasett, ble tosidig students t-test benyttet, med et signifikansnivå på 5 %. For å undersøke om det var korrelasjon mellom ulike resultater, ble lineær korrelasjonskoeffisient (r) beregnet, etter Likning (2.3). σ_{xy} er kovarians, σ_x og σ_y er standardavviket til måleparameterene x og y , x_i og y_i er analyseverdi x og y til prøve i , og \bar{x} og \bar{y} er gjennomsnittsverdier. Korrelasjonskoeffisienten er mellom -1 og 1, der $r = 1$ tilsvarer positiv korrelasjon og $r = -1$ negativ korrelasjon.

$$r = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (2.3)$$

3 Resultater og diskusjon

3.1 Forsøk med lagring av makrell

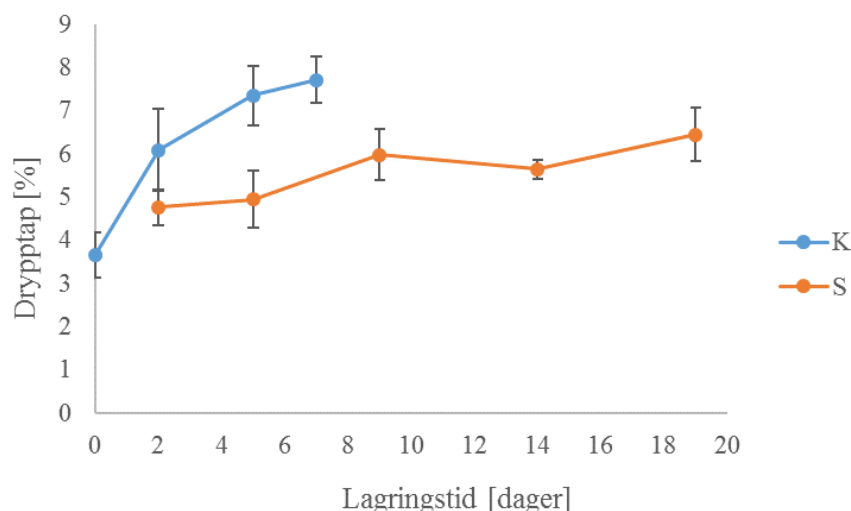
Målet med lagring av fisk er å bevare kvalitet, både mikrobiell, sensorisk og ernæringsmessig. Makrell fiskes sesongvis, og det er behov for lagring før makrellen kan brukes til ulike produkter. Den vanligste lagringsmetoden for makrell er frysing, men det er ønskelig å unngå frysing for å bevare kvalitet og ferskhet. Lagring av fersk makrell har kort holdbarhet, og det er tidligere funnet at 9 dager med kjølelagring var for lenge. Det er ønskelig å optimalisere lagringsmetoder for makrell, og i dette studiet ble superkjøling brukt for å se om det kunne forlenge holdbarheten. Makrell ble også lagret kjøling på is og fryselagret én måned til sammenligning.

Ettersom innholdet av lipider og vann tilsammen utgjør 80 % av en fiskemuskel, er det ønskelig å bestemme lipid- og vanninnholdet, og hvordan disse varierer gjennom en lagringsperiode. Lipidinnhold og oksidasjonsstatus vil bli bestemt som en del av en masteroppgave som skal leveres våren 2018. Derfor er bare lipidinnholdet etter 2 og 14 dager med superkjølt lagring inkludert her. Lipidinnholdet i superkjølte makrellfileter var 12 % lavere dag 14 ($19,7 \pm 2,0$ %) enn dag 2 ($22,3 \pm 2,3$ %). Lipidinnholdet ble bestemt av Emilia Budzko. Vanninnhold ble kun bestemt for superkjølte makrellfileter fra uttaksdag 14. Makrellfileter kvernet med skinnen på var fryselagret (-80°C) frem til bestemmelse av vanninnhold, og ble tint før analyse. For å se på om drypptap fører til endring i vanninnhold gjennom lagringsperioden, må flere analyser utføres. Dag 14 ble vanninnholdet bestemt til $62,4 \pm 2,8$ % av våtvekt. Vanninnholdanalysen ble utført av praktikant Line Døhl Schjølberg. Summen av vann- og lipidinnhold dag 14 utgjorde dermed 82,1 % av våtvekt i makrellmuskelen.

Prosessering og lagring av pelagisk fisk har resultert i tap eller ødeleggelse av kvalitetsparametre til fiskemuskel. Kjemisk sammensetning i muskel, muskelstruktur og -funksjonalitet kan endres gjennom en lagringsperiode, og ulike kvalitetsparametre kan påvirke hverandre. Resultater for de ulike analysene i denne oppgaven er sammenlignet og korrelasjonskoeffisienter er bestemt.

3.1.1 Drypptap

Ved denaturering av myofibrillproteiner endres proteinstrukturen slik at proteinene ikke lenger klarer holde på vannet, og noe av vannet lekker ut som drypptap. Siden drypptap er et godt vekstmedium for bakterier og reduserer kvaliteten til fisken, er det av interesse å optimalisere lagringsmetoden slik at den resulterer i lavest mulig drypptap. Drypptap ble bestemt for kjølte og superkjølte makrellfileter gjennom lagringsperioden, og resultatene er gitt i Figur 3.1. Tallverdier til resultatene er gitt i Tabell B.1 i Vedlegg B.1. Drypptapet økte signifikant ($p < 0,05$) gjennom lagringsperioden for både kjølte og superkjølte makrellfileter. I de kjølelagrede makrellfiletene økte drypptapet fra 3,7 til 7,7 % av våtvekt, mens en lavere økning ble observert for de superkjølte prøvene (4,8-6,5 %). Makrellfileter fryselaagret (-20°C) én måned hadde et drypptap på $7,3 \pm 1,3$ % av våtvekt. Bestemmelse av drypptap ble utført av Janna Crobotova.



Figur 3.1: Drypptap i % av våtvekt for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter. Gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 3$) (Kjølt dag 0: $n = 4$). Drypptap ble bestemt av Janna Crobotova.

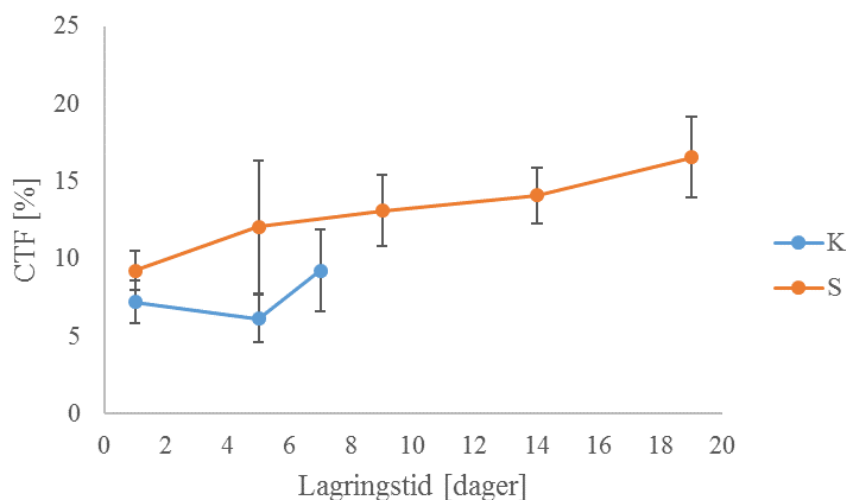
Skallfrysing og superkjølt lagring under riktige betingelser vil resultere i mindre drypp som følge av mindre celleødeleggelse enn fryselaagring (Sivertsvik et al. 2003). Superkjøling er også funnet å gi lavere drypptapp enn kjølelagring (Duun & Rustad 2007, 2008). Resultatene for makrell stemmer overens med dette. Duun & Rustad (2008) fant drypptap på opptil 1,6 % av våtvekt for superkjølt ($-1,4^{\circ}\text{C}$) laks, og siden et drypptap på 1-2 % ikke kan regnes som høyt, ble det konkludert med at drypptap ikke er et stort problem i superkjølt laks. Til sammenligning fant

Sivertsvik et al. (2003) drypptap på 2-5 % for superkjølt (-2°C) og kjølt (4°C) laks, mens drypptapet i regnbueørret ble funnet å øke til 12 % ved superkjølt (-3°C) lagring i 27 dager (Shen et al. 2015).

Ved fryselagring og superkjølt lagring vil deler av vannet fryses ut, noe som kan resultere i denaturering av muskelproteiner og strukturell skade på membraner. Dette kan føre til økt drypptap ettersom muskelproteinene mister evnen til å holde på vannet (Duun & Rustad 2008). Større drypptap for fryselagret makrell enn for superkjølt makrell er dermed som forventet, ettersom mer av vannet fryses under fryseprosessen. Større drypptap for kjølelagrede makrellfileter i forhold til superkjølte og fryste prøver, kan skyldes økt proteolytisk aktivitet. Aktivitet av proteolytiske enzymer resulterer i en løsere struktur og øker vannmengden i ekstracellulære rom (Olsson et al. 2003, 2007). Proteolytisk aktivitet er diskutert i Avsnitt 3.1.7.

3.1.2 Mengde cellevevsvæske (CTF)

Som en konsekvens av postmortale prosesser, mister muskelen evnen til å holde på vannet, og cellevevsvæske (CTF) kan sentrifugeres ut fra cellene. Mengde CTF er et mål på cellulær ødeleggelse, og kan være en indikator på kvalitet til muskelprodukter. Mengde CTF kan kobles til drypptap, og det er forventet en økning i både drypptap og mengde CTF gjennom en lagringsperiode. CTF-mengden er et bedre mål på indre ødeleggelser i muskelceller og membraner, mens drypptap kun viser evnen muskelen har til å holde på væsken.



Figur 3.2: Endring i mengde cellelevsvæske (CTF) i % av våtvekt for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden. Gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 4$). (kjølt dag 7: $n = 3$)

I Figur 3.2 er mengde CTF fra superkjølte (S) og kjølte (K) makrellfileter presentert i % av våtvekt. Tallverdier for mengde CTF er gitt i Tabell C.1 i Vedlegg C. Mengde CTF økte signifikant ($p < 0,05$) gjennom lagringsperioden for superkjølte prøver. For de kjølelagrede makrellprøvene økte mengde CTF fra dag 1 til dag 7, mens minst CTF ble målt dag 5. Superkjølte makrellfileter hadde større mengde CTF enn kjølte makrellfileter, men det var ikke signifikante forskjeller mellom de to lagringsmetodene (dag 1 og 5). For makrellfileter fryselagret én måned ble mengde CTF bestemt til $16,3 \pm 1,7$ %, omtrent det samme som for superkjølte prøver fra dag 19 ($16,5 \pm 2,6$ %). Det tyder på at ødeleggelsene i muskelstrukturen er omtrent like store i de to prøvene. I Avsnitt 3.1.6 er sammenheng mellom proteinløselighet og mengde CTF diskutert.

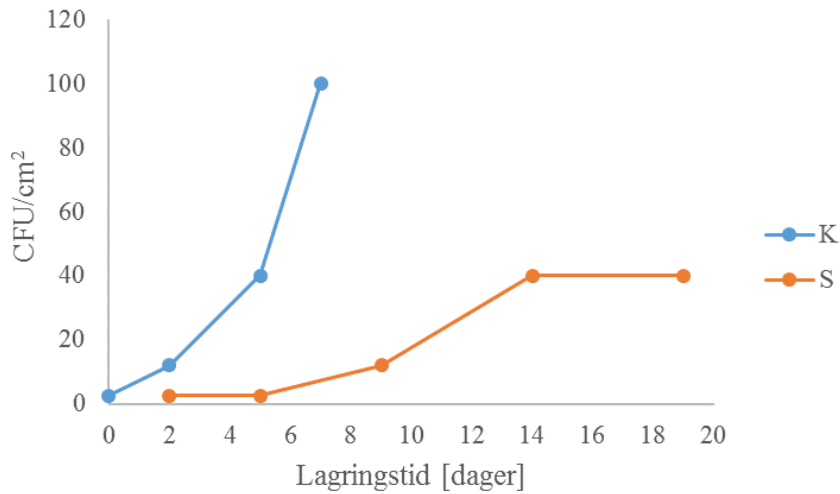
Johansen (2013) fant større mengde CTF fra laksemuskel ved superkjølt lagring sammenlignet med kjølelagring, noe som stemmer godt med resultatene funnet for makrell. Mengde CTF bestemt gjennom lagringsperioden for kjølte og superkjølte makrellfileter (0,07-0,17 g CTF/g våtvekt) ligger innenfor samme område som tidligere funnet for kjølt og superkjølt laks (omtrent 0,06 til 0,2 g CTF/g våtvekt) (Johansen 2013) og lammekjøtt (0,05-0,19 g CTF/g våtvekt) (Friestad 2014).

Både mengde CTF og drypptap øker for superkjølte prøver utover lagringsperioden. Degradering av muskelstrukturen som følge av redusert løselighet av myofibrillproteiner, har resultert i at muskelen ikke klarer holde på vannet i strukturen.

Proteinløselighet og sammenhengen mellom løselighet, drypptap og mengde CTF er diskutert i Avsnitt 3.1.6. Verdiene for mengde CTF er høyere enn for drypptap. Dette skyldes at drypptapet lekker ut bare av tyngdekraften, mens CTF presses ut ved kraftig sentrifugering.

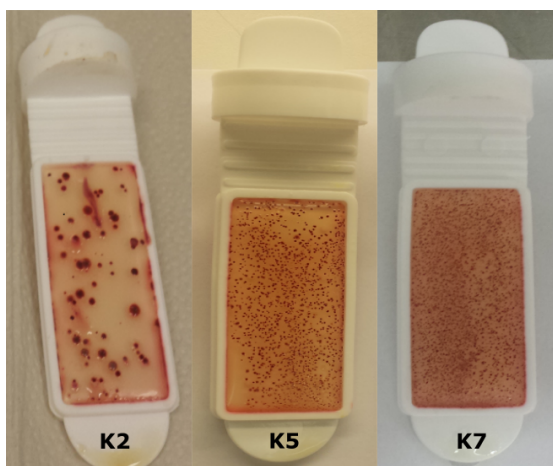
3.1.3 Mikrobiell status

Mikrobiell status er viktig for holdbarheten til matprodukter, og er dermed en viktig kvalitetsparameter for å sikre trygg mat. Holdbarheten til fisk avhenger blant annet av kjemisk sammensetning, fiskeart, lagringsmetode og prosessering. Mikrobiell status for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden er fremstilt i Figur 3.3, og ble bestemt som kolonidannende enheter (CFU)/cm² ved å sammenligne bakterieantallet med diagrammet gitt i Vedlegg A. I tillegg ble antall kolonier telt for de prøvene der det var mulig, og antall telte kolonier er presentert i Tabell D.1 i Vedlegg D.1. I diagrammet beskrives antall bakterier etter grad av vekst, fra «meget liten vekst» til «meget kraftig vekst». Disse begrepene er også brukt i dette Avsnittet for å beskrive bakterieantallet. Bestemmelse av mikrobiell status ble utført av Janna Cropotova.

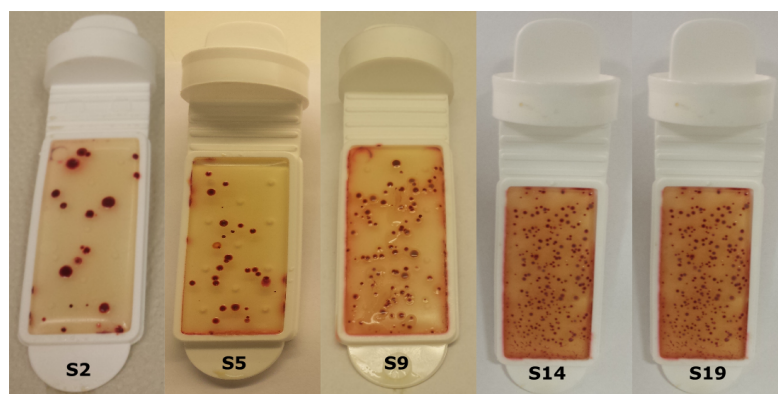


Figur 3.3: Mikrobiell vekst (CFU/cm²) på overflaten av kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden. Utviklingen av mikrobiell vekst ble bestemt ved å sammenligne prøvene med sammenligningsdiagrammet gitt i Vedlegg A. Mikrobiell status ble bestemt av Janna Cropotova.

For kjølelagrede makrellfileter ble det observert en rask økning i antall bakterier. Dag 0 var det meget liten vekst (omtrent 2,5 CFU/cm²), dag 5 var det moderat vekst og dag 7 var det kraftig vekst (rundt 100 CFU/cm²). Utviklingen i mikrobiell status for makrellfileter lagret på is på kjølerom fra dag 2 (K2) til dag 7 (K7) er vist i Figur 3.4. Det ble også observert en økning i antall bakterier hos superkjølte makrellfileter, men økningen skjedde saktere enn hos de kjølte filetene. Meget liten vekst ble observert frem til dag 5 av lagringsperioden, og dag 19 var veksten moderat (omtrent 40 CFU/cm²). Utviklingen i mikrobiell status for superkjølte makrellfileter fra dag 2 (S2) til og med dag 19 (S19) er presentert i Figur 3.5. For makrellfileter fryselaagret i én måned ble det observert meget liten mikrobiell vekst.



Figur 3.4: Utvikling av mikrobiell vekst på overflaten av kjølte makrellfileter (K) fra prøveuttak dag 2 (K2), dag 5 (K5) og dag 7 (K7). Mikrobiell status endret seg fra meget liten vekst (dag 0) til kraftig vekst (S7). Bildene er tatt av Janna Crobotova.



Figur 3.5: Utvikling av mikrobiell vekst på overflaten av de superkjølte (S) makrellfiletene gjennom lagringsperioden, fra dag 2 (S2) til dag 19 (S19). Mikrobiell status endret seg fra meget liten vekst (S2) til moderat vekst (S19). Bildene er tatt av Janna Crobotova.

Som forventet resulterte fryselagring i lavest antall bakterier, etterfulgt av superkjøling. For å kunne fastsette holdbarheten til atlantisk makrell ved de ulike lagringsmetodene er det nødvendig å bestemme mikrobiell status ut i fra anbefalte grenseverdier. Ifølge ICMSF (1986) ligger grenseverdier for fersk fisk og kjøtt mellom 10^6 - 10^7 CFU/g. 10^6 tilsvarer 100 CFU/cm² (kraftig vekst), mens den øvre

grensen på 10^7 tilsvarer 250 CFU/cm² (meget kraftig vekst). Etter disse retningslinjene var de kjølte makrellfiletene i alle fall akseptable til og med dag 5, som tilsvarer ni dager etter fangst. Dag 7 var filetene akkurat på grensen til det som er akseptabelt. Superkjølt makrell var holdbar til og med dag 19 (24 dager etter fangst), med tanke på mikrobiell status. Tidligere er det funnet at kjølelagring av makrell i 9 dager er for lenge, på grunn av for mye histamin (Standal et al. n.d.). Lavere bakterievekst under superkjølt lagring enn ved kjølelagring er også tidligere funnet for atlantisk laks (*Salmo salar*) (Duun & Rustad 2008), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Shen et al. 2015) og brasme (*Megalobrama amblycephala*) (Song et al. 2012). På bagrunn av blant annet totalt antall aerobiske bakterier, var fileter av regnbueørret akseptabel i 5 dager ved kjølelagring (3°C) og 11 dager ved superkjølt lagring (-3°C) (Shen et al. 2015). Dette er kortere mikrobiell holdbarhet enn det funnet for makrellfiletene i dette studiet. Resultatene viser at superkjølt lagring effektivt hindret mikrobiell vekst ved å forlenge lagfasen (Shen et al. 2015).

Ettersom dryppet som lekker ut av muskelcellene er et godt vekstmedium for bakterier, er det av interesse å sammenligne mikrobiell status med mengde dryppetap. Både drypptap og mikrobiell vekst økte utover lagringsperioden for kjølte og superkjølte makrellfileter, så det tyder på at det kan være en sammenheng mellom bakterievekst og mengde drypptap. Ettersom metoden benyttet for å bestemme mikrobiell status gir omtrentlige tall for CFU/cm², er ikke korrelasjonskoeffisientet inkludert.

3.1.4 Farge og utseende

Farge og utseende til fiskemuskel er viktig for forbrukernes oppfatning av kvaliteten til fisken (Shen et al. 2015). I dette studiet ble farge bestemt som grad av lyshet (L^*), rødfarge (a^*) og gulffarge (b^*) etter CIELab-skalaen. I tabell 3.1 er verdier for L^* , a^* og b^* presentert for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter, samt for makrellfileter fryselaagret (F) én måned. Fargeanalysen ble utført av Janna Crobotova.

Tabell 3.1: Fargemåling i kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter gjennom lagringsperioden. lyshet (L^*), rødhet (a^*), gulhet (b^*) er gitt for alle prøvene. Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SEM ($n = 36$). Fargeanalysen ble gjennomført av Janna Cropotova.

Prøver	Uttaks- dag	L^*	a^*	b^*
K0	0	$41,42 \pm 4,50$	$4,44 \pm 0,25$	$3,28 \pm 0,13$
K2	2	$49,11 \pm 0,93$	$3,86 \pm 0,38$	$3,96 \pm 0,19$
K5	5	$53,02 \pm 0,85$	$3,66 \pm 0,34$	$5,43 \pm 0,19$
K7	7	$53,06 \pm 0,83$	$3,47 \pm 0,23$	$5,48 \pm 0,23$
S2	2	$54,46 \pm 0,79$	$3,31 \pm 0,25$	$5,67 \pm 0,19$
S5	5	$54,45 \pm 0,96$	$3,22 \pm 0,26$	$5,73 \pm 0,30$
S9	9	$54,45 \pm 0,81$	$2,34 \pm 0,17$	$5,56 \pm 0,19$
S11	11	$53,45 \pm 0,85$	$2,20 \pm 0,15$	$5,45 \pm 0,27$
S19	19	$51,79 \pm 0,87$	$2,03 \pm 0,17$	$5,78 \pm 0,27$
F1	33	$56,05 \pm 0,56$	$2,57 \pm 0,11$	$6,76 \pm 0,13$

I løpet av lagringsperioden økte lysheten for de kjølte makrellfiletene, og overflaten til filetene var 1,3 ganger lysere dag 7 sammenlignet med dag 0. Superkjøling resulterte i lysere fileter enn kjølelagring, men for de superkjølte makrellfiletene holdt lysheten seg omtrent konstant på 54,5 frem til og med dag 9. Fra dag 9 til dag 19 gikk lysheten ned med 5 %. Videre ble høyest lyshet funnet for fileter fryselaget én måned (56,05). Også for regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) er det funnet mørkere farge (reduert L^* -verdi) ved kjølelagring og liten variasjon i lyshet ved superkjølt lagring (Shen et al. 2015). Hultmann & Rustad (2004) fant en L^* -verdi på $45,4 \pm 0,7$ i atlantisk laks (*Salmo salar*) kjølelagret på is i 10 dager. Denne verdien er innenfor samme område som funnet for makrellfiletene i denne oppgaven. Tidligere funnet L^* -verdier for atlantisk laks, fryselagret (-20°C) i to måneder, lå mellom 44,9 og 45,3, avhengig av ulike oljer i fiskefôret (Regost et al. 2004). Etersom laks inneholder karotenoidet astaxantin, er det som forventet at L^* -verdiene til fryste makrellfileter er høyere enn for laks.

Lavere rødhet (a^*) ble målt for både kjølte og superkjølte makrellfileter utover i lagringsperiodene. Verdiene var høyere for kjølte fileter enn for de superkjølte, og a^* -verdien til makrellfileter fryselagret én måned lå mellom verdiene for superkjølte prøver fra dag 5 og dag 9. Rødhetsverdiene varierte mellom 2,57 og 4,44. Shen et al. (2015) fant høyere a^* -verdier i kjølte prøver sammenlignet med for superkjølte prøver av regnbueørret, noe som også var tilfelle for makrellfiletene,

men for regnbueørret økte rødheten under kjølelagringsperioden på seks dager.

Verdier for gulhet (b^*) var høyest for fryst makrell, og superkjølte fileter hadde høyere gulhet enn kjølte prøver. Det ble målt økende b^* -verdier for kjølte prøver utover lagringsperioden, mens små variasjoner ble målt i superkjølte makrellfileter. Shen et al. (2015) rapporterer om reduserte b^* -verdier for regnbueørret ved kjølelagring og superkjølt lagring. Duun & Rustad (2008) fant ingen forskjeller i rød- eller gulhet mellom kjølte og superkjølte laksefileter.

Det er tidligere rapportert om endring i farge under kjøle- og fryselagring av fiskemuskel (Gobantes et al. 1998, Shen et al. 2015, Regost et al. 2004). Etersom det ble funnet mindre variasjon i målte fargeverdier for superkjølte makrellfileter i forhold til kjølte makrellfileter, tyder det på at superkjøling fører til høyere fargestabilitet. Det samme er funnet for regnbueørret (Shen et al. 2015). Farge er ikke bare avgjørende for den sensoriske kvaliteten til fiskemuskel, fargeendring kan også være en indikator på biokjemiske endringer i muskelstrukturen, men mekanismene bak fargeendringer er ikke helt forstått (Shen et al. 2015). Fargeendring gjennom lagringsprosesser kan skyldes denaturering av muskelproteiner (Scheffler & Gerrard 2007, Kazemi et al. 2011). Scheffler & Gerrard (2007) fant at lavere pH i *post mortem* muskel fra svin fører til denaturering av sarkoplasma- og myofibrillproteiner, og resulterte i blekere farge og redusert vannbindingsevne. Fargeendring som følge av denaturering av proteiner er diskutert i Avsnitt 3.1.6. Det er også funnet at drypptap kan resultere i fargeendring (Traore et al. 2012). Drypptap gjennom lagringsperioden for kjølte makrellfileter viste god korrelasjon med målte fargeverdier (L^* : $r = 0,996$, a^* : $r = -0,994$, b^* : $r = 0,948$). For superkjølte makrellfileter var det negativ korrelasjon mellom drypptap og lyshet ($r = -0,754$), samt mellom drypptap og rødhet ($r = -0,944$), men det ble ikke funnet noen sammenheng mellom gulhet og drypptap. Rask økning i drypptap for kjølte prøver i løpet av de første lagringsdagene, kan ha resultert i lysere farge på overflaten til makrellfiletene (Shen et al. 2015). Flere korrelasjonskoeffisienter mellom fargeparametre og andre analyser er gitt i Vedlegg K.

Andre observasjoner av utseende

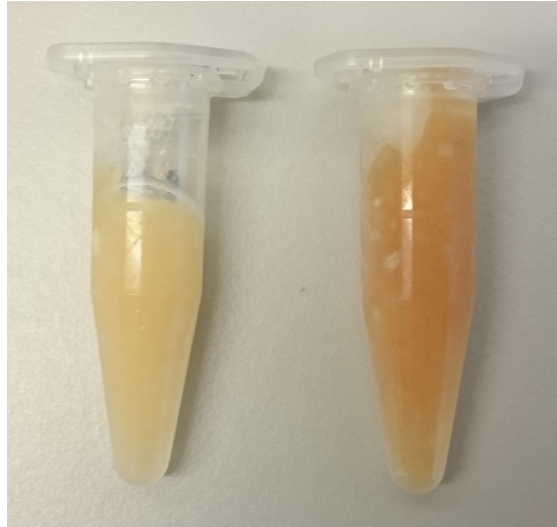
Utover i lagringsperioden ble det observert hvite flekker på overflaten til de superkjølte makrellfiletene, som vist i Figur 3.6. Flekkene dukket først opp etter noen dager. Disse flekkene var sannsynligvis denaturerte proteiner ettersom de reagerte med BioRad-reagens (Coomassie Brilliant blue G-250). I og med at makrellfiletene var relativt små, med en tykkelse på kun 1-2 cm, kan det være at mer enn kun det ytterste laget ble fryst under skallfrysingen i superkjølingsprosessen, og dette kan ha ført til raskere denaturering enn forventet.

Hvite flekker er tidligere oppdaget på overflaten av superkjølte torskefileter (*Gadus morhua*) (Duun & Rustad 2007) og på laksefileter (*Salmo salar*) (Duun & Rustad 2008). Disse flekkene dukket først opp etter noen dager med superkjølt lagring, etter at filetene hadde oppnådd jevn temperatur. Duun & Rustad (2007) konkluderer med at flekkene ikke var av mikrobiell opprinnelse, og at de ikke skyldtes lekkasje av aminosyrer, men foreslår at flekkene oppsto på grunn av diffusjons-effekt gjennom dryppkanaler fra innsiden av muskelen til muskeloverflaten. Det er tidligere vist at slike kanaler kan dannes i biff (Taylor et al. 1995). Det er også funnet at degradering av transmembrane proteiner kan åpne opp dryppkanaler i *post mortem* svinemuskel (Lawson 2004).



Figur 3.6: Under lagringsperioden dukket det opp hvite flekker på overflaten av de superkjølte makrellfiletene. Flekkene skyldes trolig denaturerte proteiner.

En annen observasjon som ble gjort under dette studiet, var at cellevevsvæsken (CTF) hadde en oransje farge. Vannfraksjonen var farget, mens fettlaget som også ble med CTF, var blankt. Mengde fett som ble med over i CTF varierte stort mellom de ulike prøvene. Styrken på fargen varierte mellom makrellfiletene. Et bilde av CTF fra makrell er gitt i Figur 3.7. Pigmentstoffene som gir den oransje fargen må dermed være vannløselige, og fargen til makrell kan skyldes vannløselige fargestoffer. Fargen til laks skyldes karotenoidet astaxanthin, og astaxanthin er fettløselig. Vannfraksjonen/CTF fra laks er derfor blankt, mens fargen blir med fettlaget. Videre karakterisering av CTF fra makrell vil være nødvendig for å bestemme pigmentstoffer i makrell.



Figur 3.7: Cellevevsvæske (CTF) fra makrellfileter hadde en oransje farge som skyldes vannløselige pigmenter. Styrken på fargen varierte mellom makrellfiletene.

3.1.5 Tekstur

Tekstur er viktig for kvaliteten til fisk, og myke fileter er et problem i fiskeindustrien (Hultmann & Rustad 2004, Andersen et al. 1997, Sigholt et al. 1997, Duun & Rustad 2008). Teksturresultatene for kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter er gitt i Tabell 3.2. Teksturmålingene ble utført av Janna Cropotova.

Bruddstyrke tilsvarende kraften som må tilføres før første signifikante brudd i prøven under første kompresjon, og kan sammenlignes med kraften som kreves for å bite gjennom overflaten til makrellfileten (Hultmann 2003). Superkjølte makrellfileter hadde generelt høyere bruddstyrke enn kjølte makrellfileter. En reduksjon i bruddstyrke ble observert fra dag 0 (5,71 N) til dag 5 (4,50 N) for kjølte fileter, mens det måtte tilføres mer kraft før brudd ved overflaten dag 7 (5,42 N). Redusert bruddstyrke gjennom en kjølelagringsperiode er også funnet for laks og torsk lagret på is (Hultmann & Rustad 2002). For superkjølte makrellfileter økte bruddstyrken gjennom hele lagringsperioden, fra 6,06 N til 8,10 N.

3 RESULTATER OG DISKUSJON

Tabell 3.2: Teksturparametrene hardhet, bruddstyrke, gummiaktighet og kohesivitet for kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter gjennom lagringsperioden. Verdiene er gjennomsnittsverdier \pm SEM ($n = 18-36$). Måligene ble utført av Janna Cropotova.

Prøve	Uttaks- dag	Bruddstyrke [N]	Hardhet [N]	Kohesivitet	Gummiaktighet [N]
K0	0	5,71 \pm 0,58	7,50 \pm 0,42	0,41 \pm 0,02	3,10 \pm 0,18
K2	2	5,56 \pm 0,51	7,04 \pm 0,21	0,37 \pm 0,02	2,61 \pm 0,17
K5	5	4,50 \pm 0,34	6,82 \pm 0,22	0,32 \pm 0,01	2,18 \pm 0,11
K7	7	5,42 \pm 0,32	6,81 \pm 0,19	0,34 \pm 0,01	2,35 \pm 0,11
S2	2	6,06 \pm 0,37	7,52 \pm 0,34	0,36 \pm 0,01	2,74 \pm 0,20
S5	5	6,28 \pm 0,21	8,06 \pm 0,31	0,37 \pm 0,01	3,01 \pm 0,19
S9	9	6,64 \pm 0,25	8,09 \pm 0,19	0,40 \pm 0,03	3,19 \pm 0,16
S11	11	8,05 \pm 0,24	9,06 \pm 0,23	0,39 \pm 0,01	3,55 \pm 0,11
S19	19	8,10 \pm 0,34	9,28 \pm 0,31	0,41 \pm 0,01	3,80 \pm 0,16
F1	33	5,85 \pm 0,31	7,37 \pm 0,28	0,47 \pm 0,05	3,91 \pm 0,70

Hardhet er et mål på hvor resistente fiskefiletene er ved maksimal kompresjon, og tilsvarer hvor mye motstand det er i fiskefileten ved første bitt (Hultmann 2003). De kjølte makrellfiletene ble mykere utover i lagringsperioden, og hardheten ble redusert med 9,2 %. Det motsatte ble observert for superkjølte makrellfileter, der hardheten økte med 23,4 %. Duun & Rustad (2008) fant signifikant høyere hardhetsverdier i superkjølt (-3,6 og -1,4°C) laks sammenlignet med kjølelagret og fyselagret laks. Gallart-Jornet et al. (2007) derimot, fant at hardheten gikk ned utover lagringsperioden for både kjølte og superkjølte laksefileter. Verdiene for hardhet i makrellfiletene (6,81-9,28 N) ligger i samme område eller er høyere enn som funnet i flere tidligere studier (Mørkøre et al. 2002, Skjervold et al. 2001, Hultmann & Rustad 2004). Høyere hardhetsverdier er funnet i superkjølt laks (>10 N) Duun & Rustad (2008).

Kohesivitet er forholdet mellom det positive kraftarealet under andre kompresjon og kraftarealet under første kompresjon, og gummiaktighet tilsvarer produktet av hardhet og kohesivitet (Hultmann 2003). Gummiaktighet måles i Newton (N). Kohesivitetsverdien indikerer deformingene som prøven er utsatt for ved påføring av kraft, og dersom kohesiviteten er 1, er deformingene rent elastisk og prøven vil gjenoppta sin opprinnelige form mellom kompresjonene (Hultmann & Rustad 2002). For de kjølte makrellfiletene ble det målt kohesivitetsverdier mellom 0,32 og 0,41, der filetene fra dag 0 viste størst grad av elastisitet. Kohesivitetsverdiene ble

lavere utover i lagringsperioden, men økte igjen mellom dag 5 og dag 7, akkurat som bruddstyrkeverdiene. Hultmann & Rustad (2002) derimot, fant økt kohesivitet for laks lagret på is. For superkjølte makrellfileter økte kohesiviteten gjennom lagringsperioden, men verdiene lå i samme område som for de kjølte makrellfiletene (0,36-0,41), så det var lite variasjoner mellom de to lagringsmetodene. Også gummiaktigheten viste en nedgang for kjølte prøver, men økte for superkjølte prøver. Av de kjølte prøvene, var det kun makrellfileter fra dag 0 (3,10 N) som hadde høyere gummiaktighet enn de laveste verdiene målt for superkjølte makreller fra dag 2 og dag 5 (2,74 og 3,01 N). Eppersom superkjølte makrellfileter har høyere verdier for gummiaktighet, vil det kreves mer energi for å bryte ned makrellmuskelen ved superkjølt lagring sammenlignet med kjølelagring på is (Hultmann & Rustad 2002).

Høyere hardhetsverdier for superkjølte makrellfileter indikerer at mykning av makrellfileter ikke er et stort problem ved superkjølt lagring. Samme konklusjon er rapportert for superkjøling av laks (Duun 2008), og ifølge Gallart-Jornet et al. (2007) ser det ut til at superkjøling over korte perioder har liten effekt på teksturen, sammenlignet med kjølelagring og fryselagring. Økning i bruddstyrke og gummiaktighet gjennom lagringsperioden støtter opp om dette. Forbrukere foretrekker gjerne fast og elastisk fiskekjøtt (Rasmussen 2001), og resultatene presentert i Tabell 3.2 tyder på teksturen til superkjølt makrell er av bedre sensorisk kvalitet i forhold til kjølte makrellfileter. Dette bekrefter at optimal lagringstemperatur kan være avgjørende for ønsket tekstur.

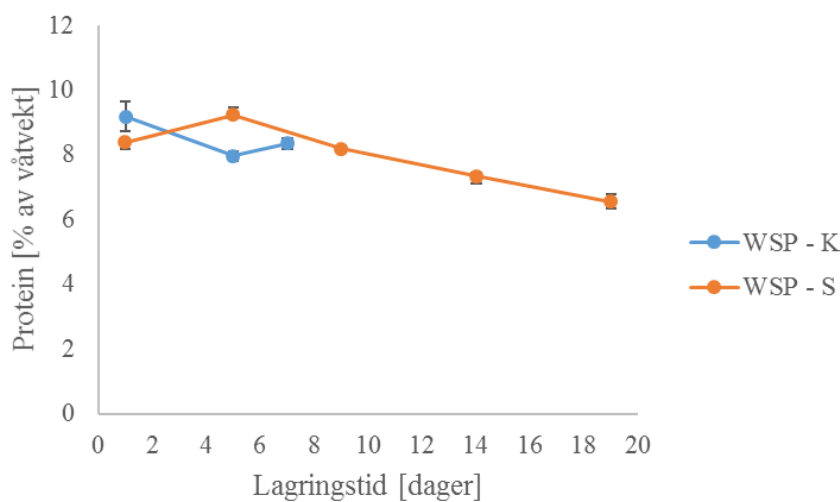
Resultatene for bruddstyrke og hardhet viser korrelasjon med drypptap for både kjølte og superkjølte makrellfileter. For kjølte makrellfileter er korrelasjonen negativ (bruddstyrke: $r = -0,981$, hardhet: $r = -0,996$), mens en positiv korrelasjon er funnet for superkjølte prøver (bruddstyrke: $r = 0,764$, hardhet: $r = 0,777$). En slik trend ble også funnet mellom bruddstyrke/hardhet og bakterieantall, negativ korrelasjon for kjølte prøver og positiv korrelasjon for superkjølte. Korrelasjonskoeffisienter er ikke inkludert siden mikrobiell status ble bestemt som omtrentlig CFU/cm². Dette tyder på at det er en sammenheng mellom drypptap, antall bakterier og tekstur, men sammenhengen er ikke lik ved kjøling og superkjøling. Denaturering av proteiner og membranødeleggelse kan føre til endring i tekstur og økt drypptap, så det de observerte korrelasjonene kan skyldes endring i muskelproteiner. I Avsnitt 3.1.6 er mulige sammenhenger mellom mengde løste proteiner, drypptap og tekstur diskutert ytterligere. Flere korrelasjonskoeffisienter er gitt i Vedlegg K.

3.1.6 Proteinløselighet

Endringer i proteinløselighet gjennom ulike prosesser har vært vist å være korrelert med andre funksjonelle egenskaper slik som tekstur og vannbinding, ettersom saltløselige proteiner er viktige for muskelens funksjonelle egenskaper samtidig som de kan denatureres ved frysing og tining. Endring i proteinløselighet i makrell ble bestemt ved å måle mengde vann- og saltløselige proteiner gjennom lagringsperioden.

Løselighet av sarkoplasmaproteiner

Figur 3.8 viser hvordan mengde vannløselige proteiner (WSP) endret seg gjennom lagringsperioden for kjølte (K) og superkjølte (S) prøver. Tallverdier er gitt i Tabell F.1 i Vedlegg F.1. Uavhengig av lagringsmetode, varierte mengde vannløselige proteiner mellom 6,6 og 9,2 % av våtvekt. Mengde WSP i superkjølt makrell økte mellom dag 1 og dag 5, før det gikk gradvis ned etter dag 5. Reduksjonen i mengde WSP mellom dag 1 og dag 19 for superkjølt makrell var signifikant ($p < 0,05$). Også de kjølte makrellfiletene hadde lavere mengde WSP ved slutten av lagringsperioden (dag 7) sammenlignet med dag 1, men forskjellen mellom dag 1 og dag 7 var ikke signifikant. Makrellfileter fryselaagret i én måned hadde en mengde WSP på $7,5 \pm 0,2$ %, som er høyere enn for superkjølte prøver fra dag 14 og 19, men lavere enn de resterende prøvene.



Figur 3.8: Mengde vannløselige proteiner (WSP) i % av våtvekt for kjølte (K) og superkjølte (S) prøver gjennom lagringsperioden. Gjennomsnittsverdier \pm SEM ($n = 12$).

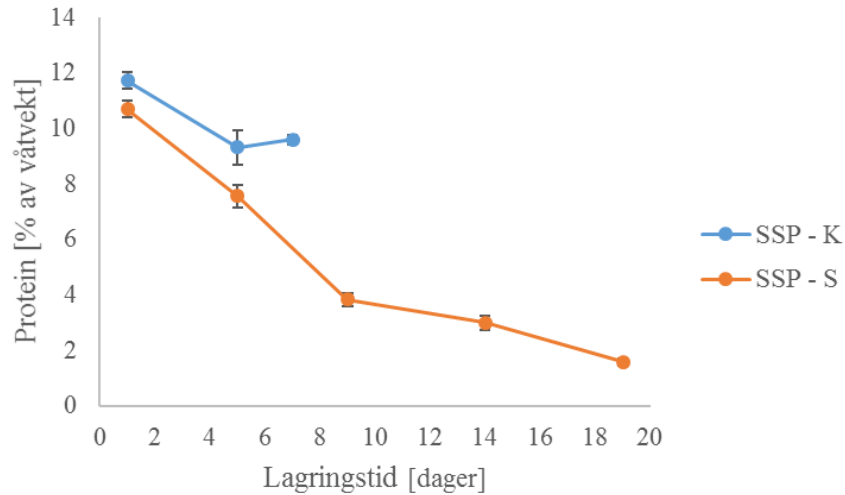
Til sammenligning varierte mengde WSP for fryste, kjølte og superkjølte fileter mellom 2,4 og 4,3 % av våtvekt for torsk og mellom 6,0 og 10,5 % for laks (Duun 2008). Sarkoplasmiske proteiner utgjør en større del av muskelproteinene i laks enn i torsk, ettersom laks er en aktivt svømmende fiskeart og dermed har større mengder myoglobin, noe som resulterer i høyere ekstraksjon av WPS i laks (Ofstad et al. 1996, Duun 2008). I og med at makrell også er en aktiv svømmer, var det som forventet at mengde WSP i makrell var høyere enn i torsk. Hverken Duun & Rustad (2008) eller Gallart-Jornet et al. (2007) fant signifikante forskjeller i mengde WSP i laks mellom ulike lagringsmetoder. Som Figur 3.8 viser, er det ikke store løselighetsvariasjoner mellom de ulike lagringsmetodene for makrell, og dette stemmer godt overens med disse studiene.

Proteolytisk aktivitet kan føre til økt proteinløselighet (Duun 2008). Dette kan være en forklaring på økningen i målt mengde vannløselige proteiner fra dag 1 til dag 5 for superkjølte makrellfileter, samt for kjølte fileter fra dag 5 til dag 7. Videre kan redusert ekstraherbarhet av WSP skyldes at proteolytiske enzymer degraderer proteiner til peptider eller frie aminosyrer slik at de ikke lenger kan binde seg til fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250. En annen mulig forklaring på reduksjonen i mengde WSP (spesielt i de superkjølte makrellfiletene) er at WSP kan lekke ut av cellene og gå tapt i dryppet. Aktiviteten til proteolytiske enzymer og mer om sammenhengen mellom proteolytisk aktivitet og mengde vannløselige proteiner er beskrevet i Avsnitt 3.1.7. Bestemmelse av frie aminosyrer er beskrevet i Avsnitt 3.1.9.

Løselighet av myofibrillproteiner

I tidligere studier det foreslått at stabiliteten til myofibrillproteiner er direkte relatert til kvaliteten til fisk (Rodríguez et al. 2006, Martinez et al. 2001). Myofibrillproteiner i fisk er lite stabile og vil lett denatureres under prosessering og lagring. Dette gjenspeiles i redusert løselighet. Ettersom denaturering fører til strukturødeleggelse i proteiner, er egenskapene til saltløselige proteiner (SSP) en viktig faktor som påvirker vannbindingsevnen og teksturen til fiskemuskel (Hultmann & Rustad 2002). Mengde SSP i kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden er gitt i Figur 3.9. Tallverdiene er gitt i Tabell F.1 i Vedlegg F.1. Løseligheten til myofibrillproteiner ble redusert med 85 % gjennom lagringsperioden for superkjølte makrellfileter, og siste uttaksdag (dag 19) var løseligheten på under 2 % av våtvekt. Størst reduksjon ble målt mellom dag 1 og dag 9, deretter avtok reduksjonsraten. Også kjølelagret makrell viste redusert løselighet av SSP gjennom lagringsperioden, selv om løseligheten økte fra dag 5 til dag 7 (ikke signifikant). Makrellfileter fryselauret i én måned hadde en løselighet av myofibrill-

proteiner på $5,7 \pm 0,4$ % av våtvekt, som er 3,6 ganger høyere enn løseligheten funnet dag 19 i superkjølt makrellfileter.



Figur 3.9: Mengde saltløselige proteiner (SSP) i % av våtvekt for kjølte (K) og superkjølte (S) prøver gjennom lagringsperioden. Gjennomsnittsverdier \pm SEM ($n = 12$).

Gallart-Jornet et al. (2007) fant en nedgang i SSP ved lagring for laks lagret kjølt på is (4°C), superkjølt (-1°C) og fryst (-40°C). Videre fant Duun & Rustad (2008) at ekstraherbarheten av SSP i superkjølt ($-1,4^{\circ}\text{C}$) laks gikk ned under lagringsperioden, mens ekstraherbarheten i kjølt laks holdt seg relativt stabilt. For torsk derimot, ble det funnet en økning i løseligheten av SSP for kjølelagrede (4°C) fileter ($3,9$ - $5,5$ % av våtvekt) og liten endring i SSP ved superkjøling ($-2,2^{\circ}\text{C}$). Den store reduksjonen i mengde SSP i superkjølte makrellfileter viser stor ødeleggelse og denaturering av myofibrillproteiner gjennom lagringsperioden, og stemmer godt overens med resultatene funnet i de nevnte studiene. Dette skyldes trolig fryse-/tineødeleggelser under lagringsprosessen. Ettersom filetene kun hadde en tykkelse på 1-2 cm, er det mulig at mer enn kun det ytterste laget av makrellfiletene ble fryst under skallfrysingen. Mildere betingelser under superkjølingen ville sannsynligvis resultert i mindre proteindenaturering, og optimalisering av superkjølingsprosessen vil være nødvendig for å minimere denatureringen av myofibrillproteiner (Duun & Rustad 2007).

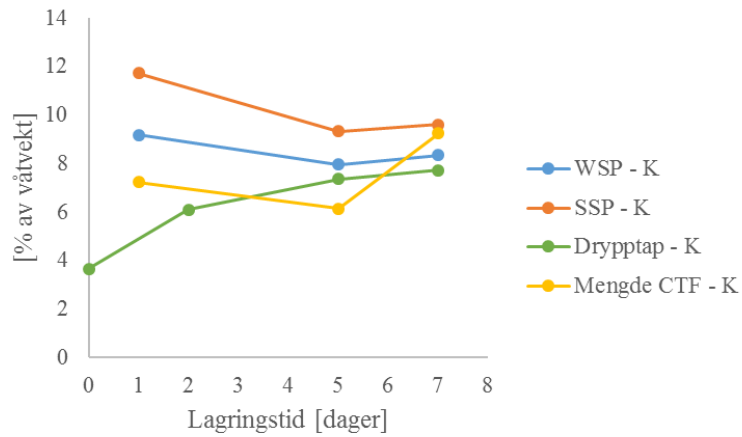
Sammenheng mellom proteinløselighet og andre analyser

Ettersom denaturering av muskelproteiner resulterer i ødelagt struktur og dårligere evne til å holde på vannet, er det ønskelig å sammenligne proteinløselighet med drypptap og CTF. Figur 3.10 viser sammenhengen mellom mengde vann- (WSP) og saltløselige proteiner (SSP), drypptap og mengde CTF funnet for superkjølte (S) og kjølte (K) makrellfileter gjennom lagringsperioden. Alle resultatene er gitt i % av våtvekt.

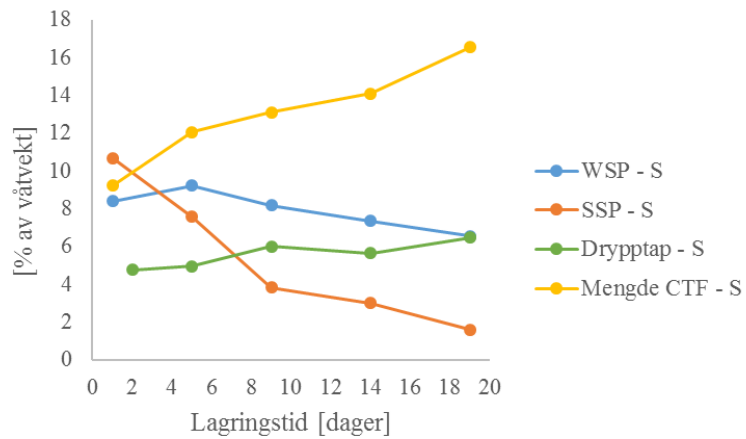
For kjølte prøver (Figur 3.10a) reduseres både mengde WSP og SSP med økende drypptap, men tydeligst sammenheng ble observert mellom mengde SSP og mengde drypp. Mengde CTF følger reduksjonen i WSP og SSP frem til dag 5, men til dag 7 er det ikke sammenheng mellom proteinløselighet og mengde CTF for kjølelagret makrellfileter. For superkjølte makrellfileter (Figur 3.10b) er det en klar negativ korrelasjon ($r = -0,957$) mellom mengde CTF og SSP. Samtidig er det en tydelig sammenheng mellom mengde WSP og drypptap, ettersom proteinløseligheten av WSP avtar omtrent like mye som drypptapet øker. I tidligere litteratur er det diskutert hvor mye WSP bidrar til vannbindingsevne, men det er ikke kommet frem til om det er en sammenheng. Sammenhengene mellom mengde SSP og drypptap, samt SSP og mengde CTF observert ved begge lagringsmetodene bekrefter at økt ødeleggelse i muskelstrukturen som følge av nedbrytning av proteiner fører til at muskelen mister evnen til å holde på vannet.

Endring av opprinnelig proteinstrukturen kan resultere i fargeendring (Estévez 2011). I Figur 3.11 er mengde vann- (WSP) og saltløselige proteiner (SSP) plottet mot fargeparametrene lyshet (L^*), rødhet (a^*) og gulhet (b^*) for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter. Ettersom de superkjølte makrellfiletene viste liten variasjon i farge gjennom lagringsperioden (Avsnitt 3.1.4), samtidig som mengde SSP ble kraftig redusert ved superkjølt lagring, tyder det på at denaturering av myofibrillproteiner har liten direkte påvirkning på fargeendring ved superkjøling. Til sammenligning er det tidligere funnet at denaturering av proteiner førte til fargeendring i svinekjøtt (Kazemi et al. 2011).

3 RESULTATER OG DISKUSJON



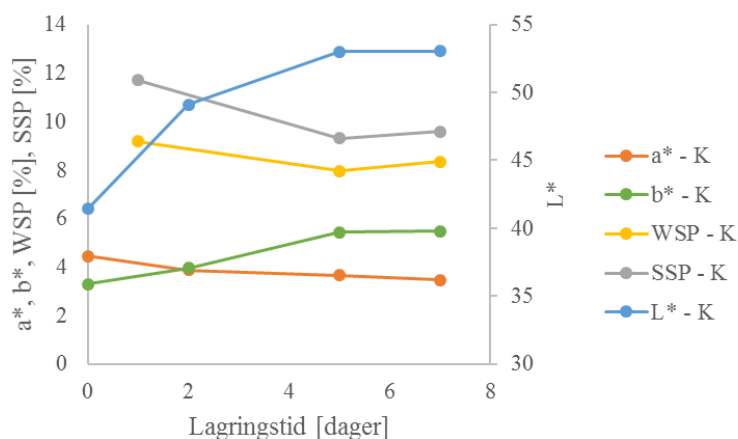
(a) Kjølte (K) prøver.



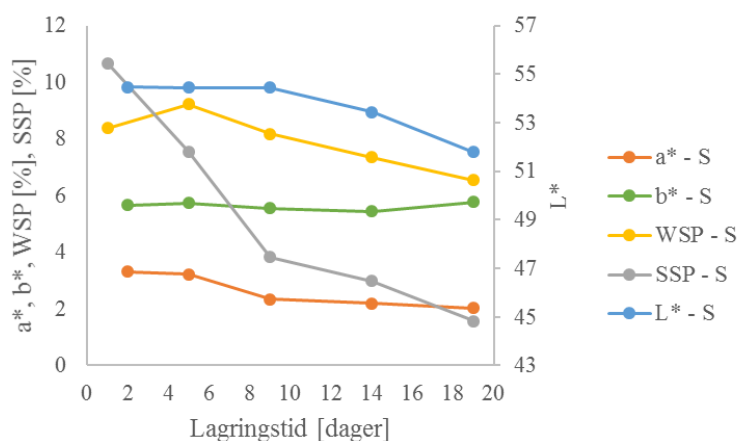
(b) Superkjølte (S) prøver.

Figur 3.10: Mengde vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner, drypptap og mengde cellevevsvæske (CTF) gjennom lagringsperioden for makrellfileter lagret ved (a) kjølelagring (K) og (b) superkjøling (S).

3 RESULTATER OG DISKUSJON



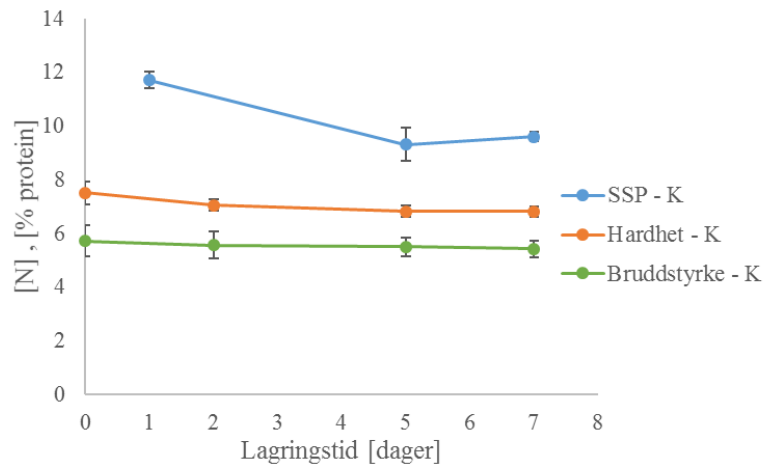
(a) Kjølte prøver.



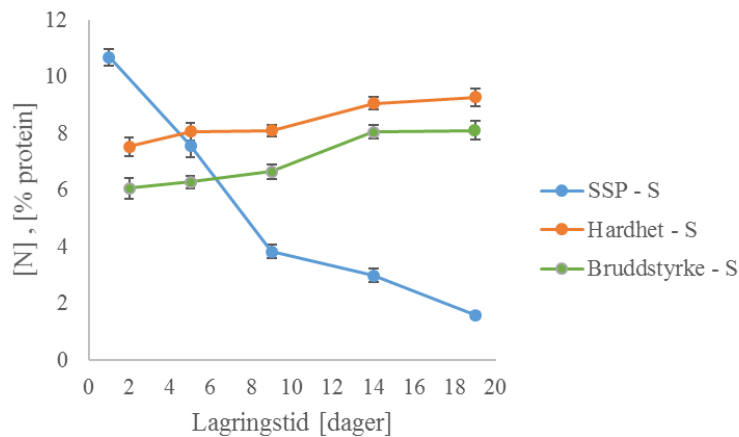
(b) Superkjølte prøver.

Figur 3.11: Sammenheng mellom mengde vann- (WSP) og saltløselige proteiner (SSP) og fargeparametrene lyshet (L^*), rødhet (a^*) og gulhet (b^*) for makrellfileter lagret ved (a) kjøling (K) og (b) superkjøling (S).

Biokjemiske prosesser som skjer i fiskemuskel under lagring kan påvirke teksturen. Denaturering av myofibrillproteiner, som følge av dannelse av iskrystaller eller som et resultat av proteolytisk aktivitet, vil ødelegge muskelnettverket som binder vann, noe som igjen kan påvirke teksturen. I Figur 3.12 er mengde saltløselige proteiner (SSP) og teksturparameterne bruddstyrke og hardhet presentert.



(a) Kjølte prøver.



(b) Superkjølte prøver.

Figur 3.12: Innhold av saltløselige proteiner (SSP) i % av våtvekt, samt hardhet og bruddstyrke i Newton [N] for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden. Gjennomsnittsverdier \pm SEM.

Som Figur 3.12a viser, resulterte kjølelagring på is (4°C) i liten endring både i innhold av saltløselige proteiner og teksturparametrene hardhet og tekstur. Denne sammenhengen kan forklares med lite denaturering av myofibrillproteiner i de kjølte prøvene, slik at teksturen ikke endres nevneverdig som følge av ødelagt struktur i muskelcellene. For de superkjølte makrellprøvene (Figur 3.12b) ble filetene hardere ettersom større andel av myofibrillproteinene ble denaturert. Ødeleggelse av myofibrillproteiner ser dermed ikke ut til å resultere i mykere tekstur ved superkjøling. Liten endring i tekstur ved superkjølt lagring stemmer overens

med tidligere studier (Lee & Toledo 1984, Duun 2008, Gallart-Jornet et al. 2007). Blant annet fant Lee & Toledo (1984) kun små strukturelle endringer i mulle (*Mugil spp.*) på grunn av iskrystaller ved en lagringstemperatur på -2°C , sammenlignet med ved fryselaging (-20°C). Teksturen til fiskemuskel avhenger også av bindevevet mellom myofibrillene, og innholdet av bindevevsproteinet kollagen bidrar til teksturegenskaper i rå fiskemuskel (Hultmann 2003). Intakt kollagen i superkjølte prøver kan være en forklaring på liten teksturendring.

3.1.7 Aktivitet av katepsin B+L

I *post mortem* muskel kan ødeleggelse av lysosomer resultere i frigjørelse av lysosomale proteolytiske enzymer. Proteolytiske enzymer som katepsin, er kjent for å degradere muskelproteiner, og aktiviteten til katepsiner er derfor viktig for kvalitetsendring i muskel. Aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer er bestemt i denne oppgaven, og innebærer den kombinerte aktiviteten til katepsin B og katepsin L. Forholdet mellom aktiviteten til katepsin i CTF og homogenat sier noe om grad av ødeleggelse av lysosomer. Katepsin B+L-lignende aktivitet ble bestemt i vannløselig homogenat og i CTF for kjølte, superkjølte og fryste makrellfileter.

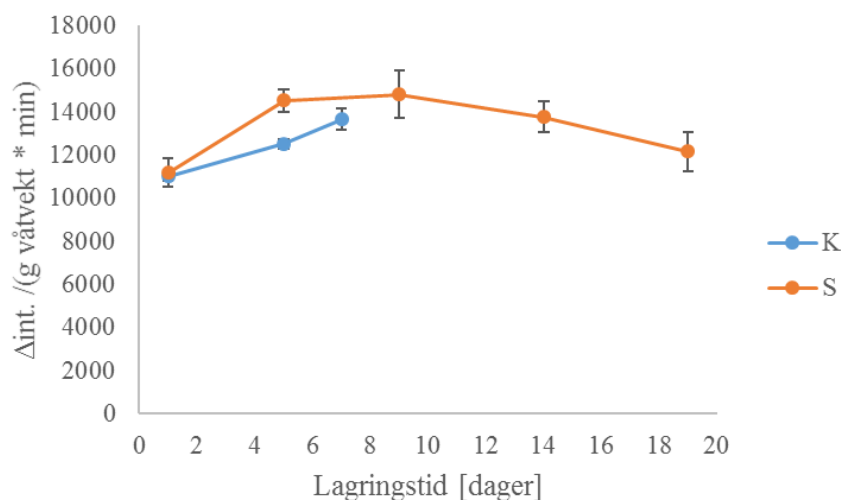
Katepsin B+L-lignende aktivitet i vannløselig homogenat

Enzymaktiviteten til B+L-lignende enzymer i vannløselig proteinfraksjon for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter er fremstilt i Figur 3.13, og er bestemt som økning i intensitet per gram våtvekt og per minutt ($\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt} \cdot \text{min})$). Tallverdier er gitt i Tabell G.1 i Vedlegg G.1. Dette tilsvarer den totale enzymaktiviteten i makrellfiletene, og den varierte mellom 10724 og 14823, uavhengig av lagringsmetode. Verdiene for total aktivitet av katepsin B+L-lignende enzymer stemmer godt overens med verdiene funnet for havabbor ($11823 \pm 681 \Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt} \cdot \text{min})$) (Chéret et al. 2007). Enzymaktiviteten ble også bestemt som økning i intensitet per mg proteininnhold per minutt for vannløselig homogenat. Disse resultatene er vedlagt i Figur G.1 i Vedlegg G.1.

Katepsin B+L-lignende aktivitet økte gjennom lagringsperioden i vannløselig homogenat fra makrellfileter kjølelagret på is, men økningen var ikke signifikant. For superkjølte makrellfileter økte aktiviteten fra dag 1 til dag 5, og fortsatte å øke frem til dag 9. Økningen var ikke signifikant fra dag 1 til dag 9. Etter dag 9 gikk aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer ned, og på dag 19 var aktiviteten 8 % høyere enn dag 1. Redusert aktivitet av katepsin B+L-lignende enzymer under en lagringsperiode er også tidligere funnet for superkjølt laks (Johansen 2013), mens Bahuaud et al. (2008) fant at den totale katepsin B+L-lignende aktiviteten holdt

seg stabil i laks lagret ved kjøletemperatur etter superkjøling. I kjølte makrellfileter var det lavere aktivitet enn i superkjølte fileter alle uttaksdagene, men forskjellene mellom dag 1 og 5 var ikke signifikant forskjellige. Dette er ikke i overensstemmelse med Johansen (2013) som fant at kjølelagret laks viste høyere enzymaktivitet enn superkjølte prøver. Duun & Rustad (2008) fant at valg av lagringsmetode ikke resulterte i signifikante forskjeller i enzymaktiviteten i laks, noe som stemmer godt med resultatene for makrell i dette studiet. Total enzymaktivitet skal i utgangspunktet ikke variere mellom ulike behandlingsmetoder, dersom behandlingen gjøres *post mortem* (Bahuaud et al. 2008). Dermed vil ikke den totale aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer gi en indikasjon på om superkjøling påvirker kvaliteten til fiskemuskel. Lavest aktivitet ble observert for makrellfileter fryst én måned ($10724 \Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt} \cdot \text{min}) \pm 572$, ($n = 9$)). Lav aktivitet i fryste prøver skyldes at enzymer er denaturert. Det vil sannsynligvis være større ødeleggelse av lysosomer ved frysing, på grunn av dannelse av iskrystaller som forstyrrer strukturen i muskelcellene. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom de ulike lagringsperiodene, så ulike temperaturer under lagring ser ikke ut til å ha stor innvirkning på aktiviteten av katepsin B+L-lignende enzymer i makrellfilet.

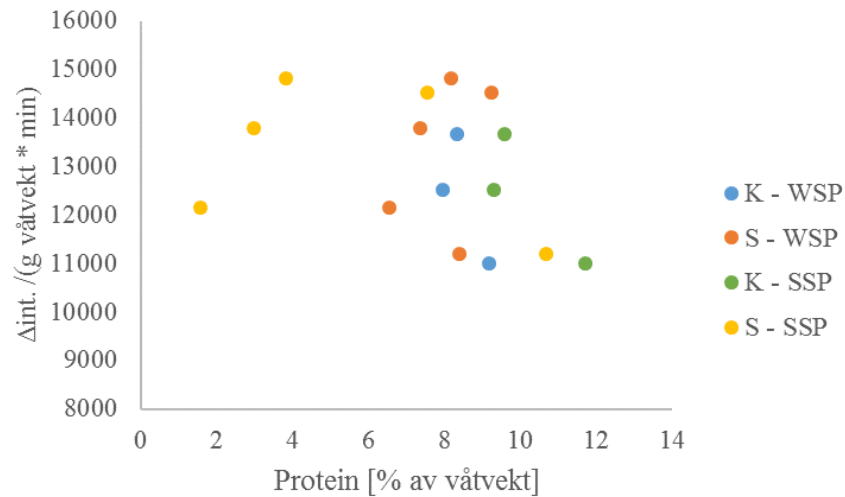
Økningen i katepsin B+L-lignende aktivitet mellom dag 1 og dag 5 for superkjølte makrellfileter og mellom dag 1 og 7 for kjølte fileterskyldes trolig at inhibitorer er nedbrutt, siden det ikke er forventet økning i total enzymaktivitet etter døden.



Figur 3.13: Enzymaktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer gitt som økning i intensitet per g våtvekt og minutter reaksjonstid ($\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt} * \text{min})$) i homogenat av vannløselige proteiner for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden. Gjennomsnittsverdier \pm SEM ($n = 12$).

Ettersom proteolytiske enzymer bryter ned muskelproteiner, er enzymaktivitet sammenlignet med proteininnhold for de superkjølte og kjølte makrellfiletene. Tidligere resultater tyder på at nedbrytning av hvit muskel i havabbbor (*Dicentrarchus labrax*) delvis skyldes katepsin B+L-lignende aktivitet (Chéret et al. 2007). I Figur 3.14 er sammenhengen mellom aktivitet av katepsin B+L-lignende enzymer og mengde av henholdsvis vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter presentert. For superkjølte prøver øker enzymaktiviteten med økende mengde SSP ved lave SSP-mengder ($< 5\%$), som gjelder fra dag 9 til dag 19. Ettersom lav mengde SSP indikerer nedbrytning av myofibrillproteiner, og med tanke på at proteolytiske enzymer kan bryte ned myofibrillproteinene, var det forventet en motsatt trend med lavere mengde SSP som følge av økt proteolytisk aktivitet. Det er vanskelig å forklare årsaken til disse resultatene. For superkjølte makrellfileter fra uttaksdag 1 og 5 resulterte høyere katepsin B+L-lignende aktivitet i lavere mengde SSP, og det er sannsynlig at flere proteolytiske enzymer er frigjort fra lysosomer og dermed større grad av nedbrytning av myofibrillproteiner. Videre er det god korrelasjon ($r = 0,86$) mellom katepsin B+L-lignende aktivitet og mengde SSP i kjølelagrede makrellfileter. I og med at det var lite variasjon i innhold av vannløselige proteiner (WSP) gjennom lagringsperioden for både kjølte og superkjølte fileter, er det vanskeligere å se sammenhenger mellom proteolytisk aktivitet og mengde løselige proteiner. Utover i lagringsperioden

kan noe av de saltløselige proteinene gått over i den vannløselige fraksjonen ettersom myofibrillproteiner brytes ned av proteolytiske enzymer. Tendenser til dette er funnet for WSP i superkjølte makrellfileter, ettersom $\Delta \text{int.}/(\text{g v\AA}t\text{vekt} \cdot \text{min})$ økte med økende mengde WSP, men dette ser ikke ut til å ha skjedd for andre prøvene.

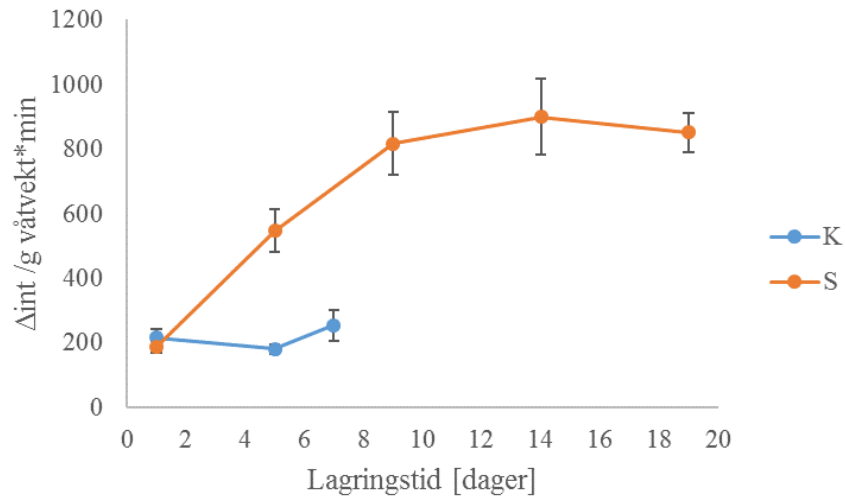


Figur 3.14: Sammenheng mellom aktivitet av katepsin B+L-lignende enzymer ($\Delta \text{int.}/(\text{g v\AA}t\text{vekt} \cdot \text{min})$) i homogenat av vannløselige proteiner og mengde vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter.

Gjennom lagringsperioden avtok bruddstyrken og hardheten for makrellfileter lagret på kjølerom, som fremstilt i Tabell 3.2. Ettersom aktiviteten av katepsin B+L-lignende enzymer økte i de kjølte prøvene, er det sannsynlig at økt proteolytisk aktivitet har ført til større nedbrytning av myofibrillproteiner som igjen har resultert i mykere tekstur. Til sammenligning foreslår Duun & Rustad (2008) at katepsin B+L-lignende enzymer kan ha ført til mykere laksemuskel under kjølelagring. For de superkjølte makrellfiletene økte både bruddstyrken og hardheten gjennom hele lagringsperioden, mens den proteolytiske aktiviteten økte frem til dag 9 før den deretter avtok. Det ble dermed ikke studert noen sammenheng mellom aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer og tekstur ved superkjøling av makrellfileter.

Katepsin B+L-lignende aktivitet i CTF

Aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer i CTF er en indikator på lekkasje fra lysosomene, og forholdet mellom enzymaktivitet i CTF og vannløselig homogenat er et mål på membranødeleggelse og hvor mye katepsin som har lekket ut av lysosomene. Enzymaktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer i CTF fra kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden er gitt i Figur 3.15. Tallverdier er gitt i Tabell G.2 i Vedlegg G.2. Den totale aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer funnet i homogenat av vannløselige proteiner var som ventet høyere enn aktiviteten målt i CTF. Dette er i overensstemmelse med proteolytisk aktivitet målt for laks (Gallart-Jornet et al. 2007). I kjølelagrede fileter varierte katepsin B+L-lignende aktivitet i CTF lite. Dette tyder på liten endring i lysosomal lekkasje gjennom lagringsperioden ved en lagringstemperatur i underkant av 4°C. Videre økte aktiviteten av katepsin B+L-lignende enzymer signifikant ($p < 0,05$) i løpet av lagringsperioden i CTF fra superkjølte makrellfileter. Høyest aktivitet ble funnet dag 14, og mellom dag 9 og dag 19 var aktiviteten relativt konstant. Bahuaud et al. (2008) fant at superkjøling resulterte i større lekkasje fra lysosomer enn kjølelagring, ved å måle katepsin B+L aktiviteten i lysosomer. Økningen i aktivitet funnet for superkjølte prøver indikerer celleødeleggelse og økt frigjøring av proteolytiske enzymer fra lysosomene gjennom lagringsperioden som følge av dannelse av ekstra- og intracellulære iskrystaller i muskelbuntene (Gallart-Jornet et al. 2007, Bahuaud et al. 2008).

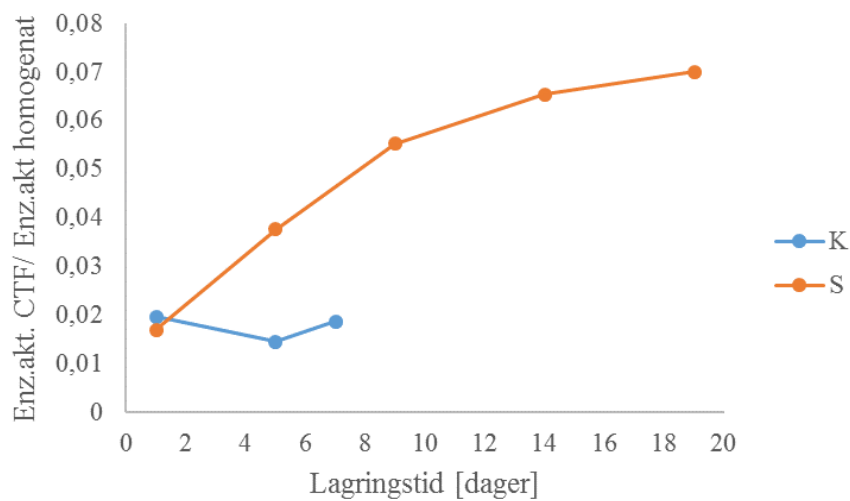


Figur 3.15: Enzymaktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer i CTF gitt som økning i intensitet per g våtvekt og minutter reaksjonstid ($\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt}*\text{min})$) for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden. Gjennomsnittsverdier \pm SEM (n = 12, superkjølt dag 9 og 19: n = 11).

I CTF fra makrellfileter fryselaagret i én måned ble økningen i intensitet per gram våtvekt og minutter bestemt til 973 ± 126 (n = 12), som tilsvarer en høyere proteolytisk aktivitet enn ved kjølelagring og superkjølt lagring. Mer katepsin B+L-lignende enzymer har dermed lekket ut av lysosomene ved fryselaagring, sammenlignet med ved de to andre lagringsmetodene. Dette viser at fryselaagring resulterer i større ødeleggelser av membranstrukturer som følge av isdannelse. Høyere aktivitet i CTF i fryste prøver, sammenlignet med superkjølte prøver, er også tidligere funnet for laks (Gallart-Jornet et al. 2007). Videre er det god negativ korrelasjon mellom aktiviteten av katepsin B+L-lignende enzymer og mengde saltløselige proteiner ($r = -0,969$). Dette bekrefter at økt proteolytisk aktivitet kan føre til økt nedbrytning av myofibrillproteiner. For både kjølte (K) og superkjølte (S) prøver er det god korrelasjon mellom mengde CTF og katepsin B+L-lignende aktivitet i CTF ($r = 0,990$ (K), $r = 0,888$ (S)). Flere korrelasjonskoeffisienter er gitt i Vedlegg K.

For at katepsin B+L-lignende enzymer skal kunne protolysere proteiner, må de først lekke ut av lysosomene. For å kunne studere grad av ødeleggelse av lysosomer, er forholdet mellom katepsin B+L-lignende aktivitet i CTF og homogenat for superkjølte (S) og kjølte (K) makrellfileter gitt i Figur 3.16. Dag 1 var det liten forskjell mellom de to lagringsmetodene, og forholdet mellom katepsin B+L-

ligninende aktivitet i CTF og homogenat var lavt. Forholdet holdt seg relativt konstant for de kjølte prøvene, mens for superkjølte prøver økte forholdet gjennom hele lagringsperioden, og dag 19 var forholdet 4,1 ganger større enn dag 1. For de makrellfileter fryst én måned ble forholdet mellom aktivitetene i CTF og homogenat funnet å være 0,091, som er 1,3 ganger høyere enn forholdet for superkjølte fileter dag 19 (0,070). Liten endring i forholdet mellom aktiviteten til katepsin B+L-lignende enzymer i CTF og homogenat for kjølte prøver indikerer at kjølelagring ikke resulterer i ødeleggelse av lysosomer. Samtidig fører superkjøling til større ødeleggelse av lysosomer utover i lagringsperioden. Økt ødeleggelse av lysosomer ved superkjøling er også tidligere funnet for laks (Bahuaud et al. 2008).



Figur 3.16: Forhold mellom katepsin B+L-lignende aktivitet i CTF og vannløselig homogenat for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter. Forholdet sier noe om grad av ødeleggelse av lysosomer.

3.1.8 Proteinoksidasjon

Reaksjoner som inkluderer reaktive oksygenforbindelser (ROS) fører til endringer i muskelproteiner som kan gå ut over kvaliteten til fiskekjøtt (Lund et al. 2011, Xiong 2000). ROS-reaksjoner kan blant annet føre til dannelse av kryssbindinger og endringer i tekstur, og oksidasjon av proteiner som følge av ROS-reaksjoner kan resultere i dannelse av karbonylgrupper. Kvantifisering av karbonylgrupper vil dermed reflektere graden av oksidasjon i proteinene. I denne oppgaven ble proteinkarbonylgrupper bestemt som nmol/mg protein og som nmol/g våtvekt for vann- og saltløselige fraksjoner fra både makrellfileter lagret kjølt på is (K) og ved superkjøling (S).

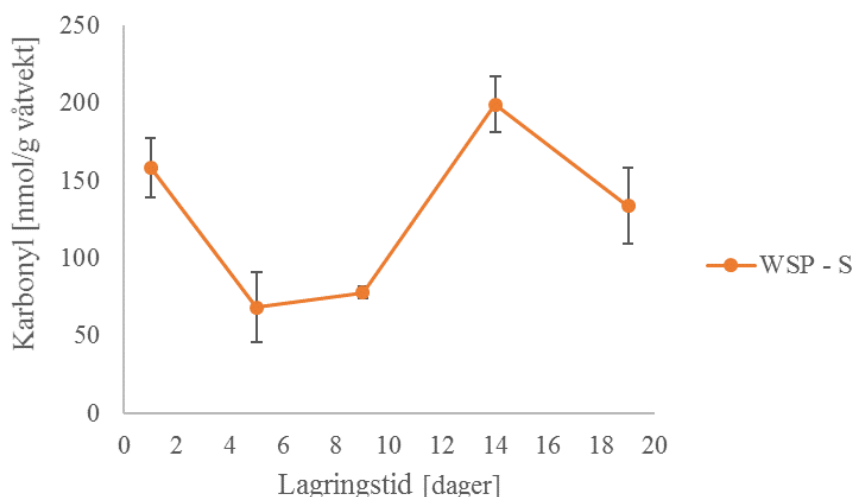
Karbonylgrupper i sarkoplasmaproteiner

I Figur 3.17 er bestemmelse av karbonylgrupper i nmol per gram våtvekt for homogenat av vannløselige proteiner (WSP) gitt for superkjølte makrellfileter gjennom lagringsperioden. Karbonylgrupper per mg protein i vannløselig homogenat er presentert i Figur H.1 i Vedlegg H.1. Tallverdier er gitt i Tabell H.1. Det ble ikke observert proteinoksidasjon i vannløselige homogenater fra kjølte makrellfileter, ettersom mengde karbonylgrupper var under deteksjonsgrensen. Det ble funnet karbonylgrupper i prøven fra dag 1, men det skyldes trolig feil i gjennomføringen av metoden. Det sees derfor bort fra disse verdiene.

Det kan nevnes at det var store variasjoner i målt mengde karbonylgrupper i de ulike parallellene de aktuelle uttaksdagene. Dette tyder på at ELISA-metoden ikke er helt optimal. Videre er det tidligere funnet store variasjoner i karbonylinnhold mellom regnbueørretindivider, og det tyder på at det kan være store variasjoner mellom individer (Baron et al. 2007).

Innholdet av proteinkarbonylgrupper varierte i homogenat av WSP gjennom lagringsperioden for superkjølte prøver. Høyest karbonylinnhold ble funnet dag 14 (199 ± 18), og dag 5 ble det målt lavest mengde karbonylgrupper (68 ± 23). Dag 1 ble mengde proteinkarbonyl bestemt til 158 ± 19 som var den dagen med nest høyest innhold av karbonylgrupper. Reduksjonen fra dag 1 til dag 5 var ikke signifikant, men fra dag 5 til dag 14 var økningen i proteinkarbonylgrupper signifikant ($p < 0,05$). Etter dag 14 gikk proteinkarbonylinnholdet ned igjen (ikke signifikant). I homogenat av WS for makrellfileter fryselagret én måned, ble karbonylinnholdet bestemt til 124 ± 10 nmol/g våtvekt. Fryselagring resulterte i høyere innhold av karbonylgrupper enn dag 5 og dag 9, men lavere enn for de resterende uttaksdagene av superkjølte prøver. Til sammenligning fant Alinasabhematabadi (2015) et karbonylinnhold i sarkoplasmaproteiner på 40-50 nmol/g våtvekt i lys muskel

for kjølelagret (4°C) atlantisk makrell (*Scomber scombrus*) og for atlantisk makrell fryst (-30°C) én måned. Dette er lavere enn det som ble bestemt for superkjølte makrellfileter i denne studien, men høyere enn for de kjølte prøvene.

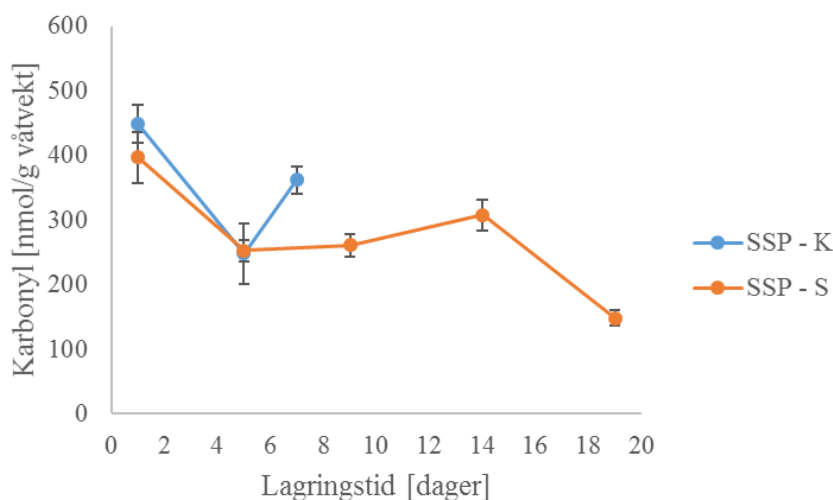


Figur 3.17: Proteinkarbonylinnhold [nmol/g våtvekt] i homogenat av vannløselige proteiner (WS) for superkjølte (S) makrellfileter. Gitt som gjennomsnittsverdi \pm SEM (n = 6-12).

Lite innhold av proteinkarbonylgrupper i vannløselig homogenat fra kjølelagrede (4°C) makrellfileter tilsvarer svært lav oksidasjon av sarkoplasmaproteiner gjennom lagringsperioden. Etersom det ble målt oksidasjon av sarkoplasmaproteiner i vannløselige homogenater fra superkjølt makrell, er det sannsynlig at skallfrysingen av filetene og den lavere lagringstemperaturen (-2°C), sammenlignet med for kjølte makrellfileter, i større grad resulterer i ROS-reaksjoner. Det er tidligere rapportert om økning i karbonylforbindelser ved frysing (Baron et al. 2007, Passi et al. 2005), noe som stemmer godt med resultatene for makrellfiletene.

Karbonylgrupper i myofibrillproteiner

Oksidasjon av muskelproteiner kan resultere i dårligere funksjonalitet og kvalitet av muskel, og dette kan blant annet resultere i endringer i egenskaper som løselighet, tekstur og evnen til å holde på vann (Lund et al. 2011, Xiong 2000). Proteinkarbonylinnhold (nmol/g våtvekt) i homogenat av saltløselige proteiner (SSP) for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden er presentert i Figur 3.18.

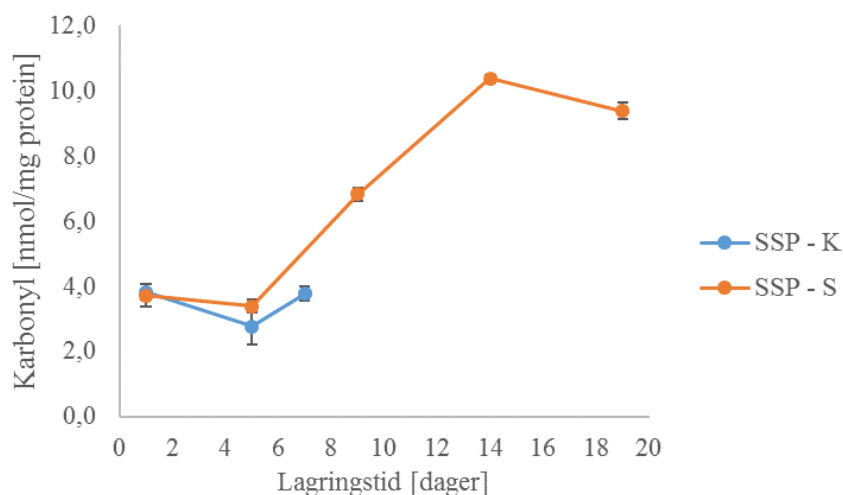


Figur 3.18: Proteinkarbonylinnhold [nmol/g våtvekt] i saltløselig homogenat (SS) for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter, gitt som gjennomsnittsverdi \pm SEM ($n = 7-12$).

Innholdet av proteinkarbonylforbindelser per gram våtvekt gikk ned i homogenat av SSP gjennom lagringsperioden for både kjølte og superkjølte makrellfileter. For superkjølte fileter gikk karbonylinnholdet signifikant ned ($p < 0,05$) gjennom lagringsperioden på 19 dager, mens nedgangen ikke var signifikant i kjølte prøver. Dag 1 og dag 5 var det lite variasjon i mengde karbonylforbindelser mellom de to lagringsmetodene, men etter dag 5 økte innholdet av karbonylforbindelser i kjølte makrellfileter, mens innholdet flatet ut for superkjølte prøver. Mellom dag 14 og dag 19 gikk innholdet av proteinkarbonyler signifikant ned for superkjølte prøver. Av de tre lagringsmetodene kjøling, superkjøling og frysing, hadde kjølte prøver fra dag 1 høyest innhold av karbonylforbindelser på 448 ± 29 nmol/g våtvekt, etterfulgt av 430 ± 28 nmol/g våtvekt for makrellfileter fryst én måned og 396 ± 39 nmol/g våtvekt for superkjølte fileter fra dag 1. Lavest innhold (148 ± 12 nmol/g våtvekt) ble målt dag 19 for superkjølte makrellfileter.

Alinasabhematabadi (2015) rapporterer om relativt stabilt karbonylinnhold i myofibrill- og sarkoplasmaproteiner i nmol/g våtvekt gjennom lagringsperioden for makrell lagret kjølt (4°C) i 4 og 9 dager, og fryselagret (-30°C) i 1, 7 og 12 måneder. Til sammenligning lå karbonylgruppeinnholdet på rundt 230-250 nmol/g våtvekt for myofibrillproteiner fra lys muskel i kjølt makrell og makrell fryst én måned. Dette er omtrent likt karbonylgruppeinnhold som ble funnet i denne studien for superkjølte makrellfileter fra dag 5 og dag 9. Videre foreslår Alinasabhematabadi (2015) at den reduserte proteinløseligheten av myofibrillproteiner gjennom lagringsperioden kan

skyldes dannelse av karbonylgrupper som fører til at det dannes kryssbindinger mellom polypeptider og proteiner. Slike kryssbindinger kan resultere i at proteiner aggregerer, og aggregererte proteiner kan assosieres med dårligere proteinløselighet.



Figur 3.19: Proteinkarbonylinnhold [nmol/mg protein] i homogenat av saltløselige proteiner (SS) for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter, gitt som gjennomsnittsverdi \pm SEM ($n = 7-12$).

Kvantifisering av proteinkarbonylgrupper ble også bestemt per mg protein, og resultatene for innholdet av karbonylgrupper i myofibrillproteiner fra kjølte og superkjølte makrellfileter er presentert i Figur 3.19. Tallverdier er presentert i Tabell H.1 i Vedlegg H.1. For superkjølte makrellfileter økte innholdet av karbonylgrupper signifikant gjennom lagringsperioden ($p < 0,05$), og dag 9 var karbonylgruppeinnholdet 2,5 ganger høyere enn dag 1. Karbonylgruppeinnholdet i kjølte prøver endret seg ikke signifikant gjennom lagringsperioden. Videre var det ingen signifikant variasjon i innholdet av karbonylgrupper mellom de to lagringsmetodene, noe som tyder på at valg av lagringsmetode ikke påvirker oksidasjon av proteiner over en kortere lagringsperiode. For makrellfileter fryselaagret (-20°C) i én måned, ble innholdet av karbonylgrupper bestemt til $7,8 \pm 0,2$ nmol/mg protein. Dette var lavere enn dag 14 ($10,4 \pm 0,1$) og dag 19 ($9,4 \pm 0,3$) for superkjølte makrellfileter, men høyere enn de resterende prøvene. Tidligere er det rapportert om karbonylinnhold på omtrent 15 nmol/mg protein i hvit muskel fra atlantisk makrell ved kjølelagring (4°C) og ved fryselaagring (-30°C) én måned (Alinasabhematabadi 2015). Dette er høyere verdier enn funnet i dette studiet.

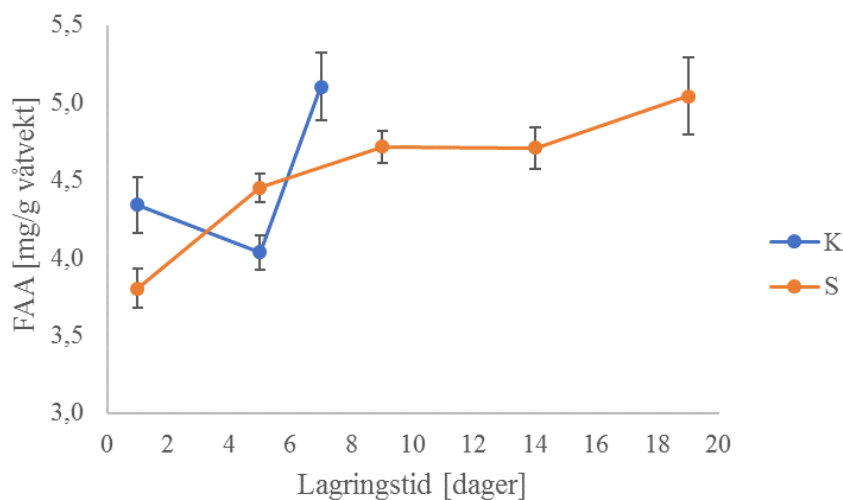
Proteinoksidasjon fører til dannelse av kryssbindinger som fører til lavere løselighet av myofibrillproteiner. Økt innhold av karbonylgrupper regnet per mg protein for superkjølte prøver kan forklares med at de løste proteinene er mer oksidert. Etter som løseligheten går under superkjølt lagring, reduseres karbonylinnholdet per g våtvekt. Det relativt stabile innholdet av karbonylgrupper i myofibrillproteiner under kjølelagring indikerer at makrell lagret på is ikke ble utsatt for proteinoksidasjon som resulterte i karbonylforbindelser. Dette stemmer overens med tidligere resultater for kjølelagret makrell (Alinasabhematabadi 2015). Tidligere studier rapporterer om karbonylinnhold mellom 1,48 og 27 nmol/mg protein (Popova et al. 2009, Martinaud et al. 1997, Baron et al. 2007, Huang et al. 2013). Baron et al. (2007) fant karbonylinnhold på 2,9 nmol/mg protein i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) etter 48 timer lagring på is, men det var store variasjoner mellom individer.

Proteinoksidasjon i muskel kan føre til endringer i fysiokjemiske egenskaper til proteiner, inkludert egenskaper som evnen til å holde på vann, løselighet, tekstur og følsomhet overfor proteolytisk aktivitet (Xiong 2000). Resultatene for karbonylinnhold i kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden viste god korrelasjon med proteolytisk enzymaktivitet i cellevevsvæske (CTF) (K: $r = 0,82$, S: $r = 0,84$), og også med mengde CTF (K: $r = 0,74$, S: $r = 0,82$). Det var derimot liten korrelasjon mellom proteinkarbonylinnhold og enzymaktivitet i homogenat av WSP. Videre viste endringer i proteinkarbonylinnhold per mg protein i superkjølte makrellfileter negativ korrelasjon med mengde vannløselige proteiner ($r = -0,88$) og med mengde saltløselige proteiner ($r = -0,89$). Det er sannsynligvis en sammenheng mellom økt proteinoksidasjon og redusert løselighet til muskelproteiner. En mulighet er at denaturering av proteiner kan føre til økt motakelighet for ROS-angrep. Det er også kjent at oksidasjon av proteiner kan føre til denaturering, gjennom at radikaler og reaktive oksygenforbindelser (ROS) reagerer med proteiner og peptider i nærvær av oksygen og fører til fragmentering av proteinkjeder eller endring i aminosyresidekjeder (Lund et al. 2011, Davies 2005). Videre konkluderte Davies et al. (1987) med at det er en sammenheng mellom proteinødeleggelse forårsaket av oksygenradikaler og økt følsomhet for proteolytisk aktivitet. Den aktuelle studien ble utført på bovin serum albumin (BSA). Oksidasjon av myofibrillproteiner i de superkjølte makrellfiletene kan ha resultert i denaturering av proteinene som igjen har ført til økt følsomhet for proteolytisk aktivitet. Som nevnt i Avsnitt 3.1.5 ble makrellfiletene hardere under lagringsperioden for superkjølte makrellfileter. Oksidasjon av myofibrillproteiner kan dermed ha bidratt til hardere fiskemuskel.

Høyere innhold av proteinkarbonylforbindelser ble bestemt i myofibrillproteiner sammenlignet med i sarkoplasmaproteiner. Dette kan skyldes at myofibrillproteiner er mindre stabile og mer mottakelige for oksidasjon, og derfor lettere ødelegges enn sarkoplasmaproteinene. Tidligere studier har vist at myofibrillproteiner fra fiskemuskel er mer utsatt for degradering under lagring enn sarkoplasmaproteiner (Sotelo et al. 1994, Siddaiah et al. 2001, Gallart-Jornet et al. 2007, Alinasabhema-tabadi 2015). Ettersom aminosyresammensetningen kan variere mellom myofibrill- og sarkoplasmaproteiner, kan myofibrillene inneholde aminosyrer som lettere oksideres. Sidekjedene i aminosyrene prolin, arginin, lysin og treonin har vist se å være spesielt utsatt for oksidasjon (Estévez 2011). Dersom myofibrillproteiner inneholder en større andel av disse aminosyrene enn sarkoplasmaproteinene, kan dette være en mulig årsak til høyere proteinoksidasjon i myofibrillproteinene.

3.1.9 Frie aminosyrer

Økning i frie aminosyrer (FAA) er et mål på proteolytisk nedbrytning av proteiner. FAA spiller en viktig rolle for smak og lukt av fiskemuskel, og er dermed viktig for god sensorisk kvalitet. I muskel fra vannlevende organismer ligger innholdet av frie aminosyrer normalt mellom 0,5-2 % (w/w) av muskelvekt (Hultmann 2003). Endring i total mengde FAA i mg/g våtvekt for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden er presentert i Figur 3.20. Uavhengig av lagringsmetode varierte mengde FAA mellom 3,8-5,1 mg/g våtvekt (0,4-0,5 % (w/w)). Mengde FAA økte signifikant ($p < 0,05$) for både kjølte og superkjølte makrellfileter gjennom lagringsperioden. Økt mengde frie aminosyrer under lagring er tidligere funnet for blant annet torsk (Duun & Rustad 2007) og atlantisk laks (Gallart-Jornet et al. 2007, Duun & Rustad 2008, Hultmann & Rustad 2004). Dag 1 var mengde FAA signifikant ($p < 0,05$) større for kjølte makrellfileter (4,3 mg/g våtvekt) enn for superkjølte (3,8 mg/g våtvekt). Mengde frie aminosyrer dag 1 er i samme område som initielle verdier på 3-4 mg/g av våtvekt funnet for kjølt og superkjølt torsk (Duun & Rustad 2007), mens lavere verdier (1,2-1,8 mg/g våtvekt) ble funnet for laks de første to ukene med superkjølt lagring (Duun & Rustad 2008). Siste dag av lagringsperiodene (K: dag 7, S: dag 19) for makrell, var det ingen signifikant forskjell mellom lagringsmetodene, så etter superkjølt lagring i 19 dager var mengde FAA omtrent likt som etter kjølelagring i 7 dager. For makrellfileter fryselaagret én måned ble mengde FAA bestemt til $4,6 \pm 0,2$ mg/g våtvekt, noe som tilsvarer mengden funnet mellom dag 5 og dag 9 for superkjølte prøver.



Figur 3.20: Total mengde frie aminosyrer i mg/g våtvekt for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter gjennom lagringsperioden. Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SEM (n = 12, superkjølt dag 5: n = 11).

For kjølte makrellfileter gikk mengde FAA ned mellom dag 1 og dag 5, men økte igjen til dag 7. Nedgang i mengde FAA er tidligere funnet ved kjølelagring (4°C) av laks, men da ble redusert mengde FAA observert mot slutten av lagringsperioden (mellom dag 9 og dag 16) (Gallart-Jornet et al. 2007). Gallart-Jornet et al. (2007) foreslår at redusert mengde frie aminosyrer under kjølelagring kan skyldes høyere bakterieantall. Dette kan være en mulig forklaring for nedgangen funnet for makrell, men ettersom mengde FAA øker igjen mellom dag 5 og dag 7 kan det være andre årsaker til nedgangen dag 5.

Lavere mengde FAA funnet for makrell fryselaagret én måned sammenlignet med mot slutten av lagringsperioden for kjølte og superkjølte prøver stemmer overens med tidligere studier på torsk (Duun & Rustad 2007) og lysing (*Merluccius merluccius*) (Sotelo et al. 1995). Sotelo et al. (1995) fant at mengde frie aminosyrer i lysing økte med lagringstid ved -5°C, men ikke ved -20°C. Når deler av vannet fryser ved superkjøling og frysing, vil konsentrasjonen av enzymer øke i de delene som ikke er fryst. Høyere enzymkonsentrasjon kan føre til proteolytisk aktivitet under lagring som igjen fører til økt mengde FAA (Duun & Rustad 2008). Mengde FAA var høyere i fryste makrellfileter enn for de første dagene av superkjølt og kjølt lagring. Dette kan skyldes høyere enzymkonsentrasjon som følge av frysing.

Som nevnt indikerer økning i frie aminosyrer høyere aktivitet av proteolytiske enzymer. For både kjølte (K) og superkjølte (S) prøver var det god korrelasjon mellom mengde FAA og mengde cellevevsvæske (CTF) (K: $r = 0,998$, S: $r = 0,970$) og mellom mengde FAA og katepsin B+L-lignende aktivitet i CTF (K: $r = 0,978$, S: $r = 0,944$), mens dårligere korrelasjon ble funnet mellom mengde FAA og katepsin B+L-lignende aktivitet i homogenat (K: $r = 0,630$, S: $r = 0,422$). Dette tyder på en sammenheng mellom lekkasje av proteolytiske enzymer fra lysosomene og mengde frie aminosyrer, mens det ikke er noen klar sammenheng mellom mengde FAA og den totale proteolytiske aktiviteten. Superkjølte prøver viste også god korrelasjon mellom mengde FAA og ødeleggelse av lysosomer (forhold mellom total proteolytisk aktivitet og aktivitet i CTF) ($r = 0,963$), mens en lignende sammenheng ikke ble funnet for kjølte prøver ($r = 0,588$). For superkjølte prøver var det i tillegg god negativ korrelasjon mellom mengde FAA og mengde saltløselige proteiner ($r = -0,966$). Dette skyldes trolig at proteolytisk nedbrytning av myofibrillproteiner resulterer i redusert løselighet til proteiner, og i tillegg til at enzymene bryter ned proteiner til peptider og frie aminosyrer. Korrelasjonskoeffisienter mellom mengde FAA og resultater fra andre analyser er gitt i Tabell K.1 og K.2 i Vedlegg K.

I tillegg til total mengde frie aminosyrer ble mengde av hver enkelt aminosyre bestemt for kjølte, superkjølte og fryste makrellfileter gjennom lagringsperioden. Resultatene er presentert i Tabell 3.3. Aminosyrene glysin og arginin ble bestemt sammen. Aminosyren histidin dominerte for alle prøvene, uavhengig av uttaksdag og lagringsmetode. Mengde histidin varierte mellom 2,76-3,55 mg/g våtvekt, som tilsvarer 65,8-75,3 % av total mengde frie aminosyrer. Andre aminosyrer det ble funnet nevneverdige mengder av var glutamat, lysin og alanin. For makrell fryst én måned og kjølelagret makrell fra dag 1 ble det funnet større innhold av lysin enn glutamat, mens de resterende dagene ved kjølelagring samt alle uttaksdagene for superkjølt makrell, ble det funnet større mengder glutamat enn lysin. Mengde glutamat økte gjennom lagringsperioden for både kjølte og superkjølte prøver, og innholdet av histidin økte for superkjølte prøver gjennom lagringsperioden. Jiang & Lee (1985) fant at aminosyrene histidin, lysin og alanin dominerte i fryst (-20°C) makrellmuskel, noe som stemmer godt med resultatene funnet for makrell i dette studiet. Jiang & Lee (1985) fant også at muskelproteiner med stort innhold av fritt histidin og lysin var relativt ustabile under fryselagring (-20°C), mens fiskemuskel som inneholder mye fritt glysin, prolin og alanin viste høyere stabilitet. Det er også funnet at histidin er blant de aminosyrene som er mest utsatt for angrep av radikaler, siden sidekjeden enkelt kan oksideres (Saha et al. 1995). I kjølt og superkjølt laksemuskel derimot, dominerer fritt alanin og glysin/arginin (Hultmann & Rustad 2004, Gallart-Jornet et al. 2007), og Hultmann & Rustad (2004) fant også betydelig mengde lysin. Variasjon i hvilke frie aminosyrer som dominerer mellom fiskeartene kan skyldes ulik aminosyresammensetning til enkelte

3 RESULTATER OG DISKUSJON

muskelproteiner. Ulik aminosyresammensetning kan muligens påvirke kvalitet og holdbarhet til forskjellige fiskearter under lagring. Lund & Nielsen (2001) derimot, fant at histidin dominerte blant de frie aminosyrene i kjølelagret atlantisk laks, noe som stemmer bedre overens med det som ble funnet for makrell.

Tabell 3.3: Mengde av hver enkelt aminosyre (mg/g våtvekt) gjennom lagringsperioden for frysede, superkjølte og kjølte makrellfileter, samt total mengde frie aminosyrer. Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SEM ($n = 12$, superkjølt dag 5 og fryst 1 mnd: $n = 11$).

Lagring	Fryst (-20°C)					Superkjølt (-2°C)					Kjølt på is (4°C)						
	1 Mnd	Dag 1	Dag 5	Dag 9	Dag 14	Dag 19	Dag 1	Dag 5	Dag 9	Dag 14	Dag 19	Dag 1	Dag 5	Dag 9	Dag 14	Dag 19	
Aminosyre																	
Asp	0,015	0,003	0,007	0,009	0,004	0,009	0,003	0,003	0,003	0,004	0,009	0,003	0,003	0,003	0,006	0,006	0,006
Glu	0,365	0,346	0,391	0,408	0,495	0,620	0,289	0,289	0,410	0,495	0,620	0,289	0,410	0,410	0,429	0,429	0,429
Asn	-	0,001	0,001	0,001	-	0,001	-	-	-	-	0,001	-	-	-	0,001	-	0,001
His	3,088	2,757	3,074	3,104	3,170	3,217	3,268	3,268	2,795	3,170	3,217	3,268	2,795	2,795	3,553	3,553	3,553
Ser	-	0,039	0,088	0,160	0,064	0,059	0,022	0,045	0,033	0,064	0,059	0,022	0,045	0,045	0,033	0,033	0,033
Gln	0,066	0,070	0,064	0,062	0,063	0,049	0,107	0,089	0,064	0,063	0,049	0,107	0,089	0,089	0,064	0,064	0,064
Gly/Arg	0,104	0,076	0,099	0,114	0,105	0,116	0,079	0,075	0,133	0,105	0,116	0,079	0,075	0,075	0,133	0,133	0,133
Thr	0,070	0,044	0,054	0,071	0,072	0,084	0,038	0,070	0,073	0,072	0,084	0,038	0,070	0,070	0,073	0,073	0,073
Ala	0,162	0,121	0,164	0,185	0,191	0,223	0,119	0,185	0,279	0,191	0,223	0,119	0,185	0,185	0,279	0,279	0,279
Tyr	0,044	0,025	0,042	0,051	0,055	0,059	0,031	0,054	0,054	0,055	0,059	0,031	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054
Aba	0,004	0,008	0,009	0,009	0,016	0,017	0,008	0,008	0,014	0,016	0,017	0,008	0,008	0,008	0,014	0,014	0,014
Met	0,004	0,002	0,005	0,006	0,008	0,011	0,004	0,004	0,006	0,008	0,011	0,004	0,004	0,009	0,006	0,006	0,006
Val	0,042	0,025	0,041	0,046	0,051	0,063	0,026	0,039	0,045	0,051	0,063	0,026	0,039	0,039	0,045	0,045	0,045
Phe	0,018	0,016	0,027	0,034	0,040	0,043	0,016	0,029	0,028	0,040	0,043	0,016	0,029	0,029	0,028	0,028	0,028
Ile	0,023	0,014	0,023	0,026	0,028	0,031	0,015	0,022	0,021	0,028	0,031	0,015	0,022	0,022	0,021	0,021	0,021
Leu	0,040	0,024	0,038	0,046	0,046	0,052	0,024	0,036	0,037	0,046	0,052	0,024	0,036	0,036	0,037	0,037	0,037
Lys	0,393	0,233	0,326	0,383	0,298	0,388	0,292	0,178	0,329	0,298	0,388	0,292	0,178	0,178	0,329	0,329	0,329
Totalt	4,439	3,802	4,452	4,715	4,707	5,040	4,340	4,034	5,104	4,707	5,040	4,340	4,034	4,034	5,104	5,104	5,104

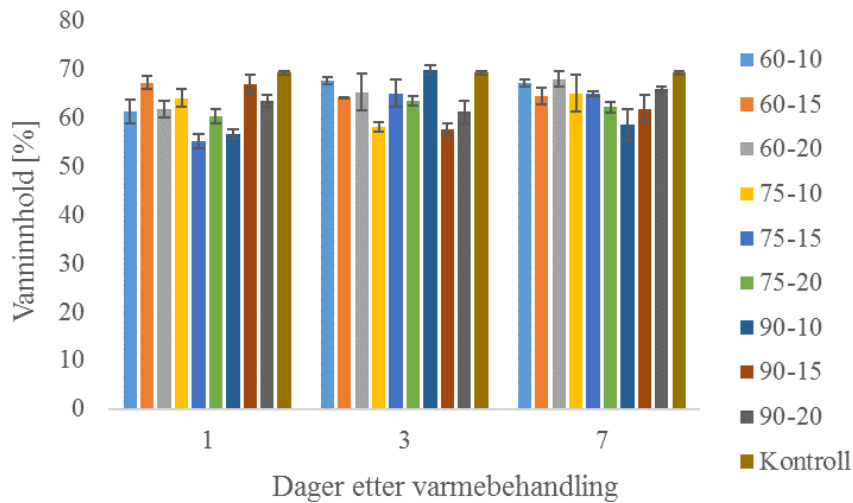
3.2 Varmebehandling av makrell - Sous vide

For å kunne utvikle makrellprodukter med gode sensoriske egenskaper og høy kvalitet, er prosessering etter lagring viktig. Varmebehandling av fisk har lenge vært en av de vanligste prosesseringsmetodene for å sikre trygg mat med god holdbarhet. Fisk er sensitiv mot termisk behandling og prosessering ved høye temperaturer vil kunne redusere kvalitetsparametre som væsketap, tekstur, vannbindingsevne, farge og mindre løselige proteiner som følge av denaturering. Det er derfor ønskelig å optimalisere varmebehandlingsprosessen og gjerne senke temperaturen, men dette kan være utfordrende med tanke på holdbarheten til fiskeprodukter. Sous vide-behandling har vist seg lovende for fisk, og i dette studiet ble vakuumpakket makrell varmebehandlet i vannbad ved ulike temperaturer med påfølgende kjølelagring på is. Tiden for varmebehandlingen ble også variert. Sous vide-prosesseringen i dette studiet er et pilotforsøk for utvikling av makrellprodukter.

Prøvekodene for varmebehandlet makrell består av temperatur i vannbad, tid i vannbad og uttaksdag etter kjølelagring. Prøve 60-10-1 er makrell varmebehandlet ved 60°C i 10 minutter, og er analysert dag 1 etter varmebehandling.

3.2.1 Vanninnhold

Vanninnholdet for makrellfileter varmebehandlet 10, 15 og 20 minutter ved 60, 75 og 90°C er gitt i Figur 3.21. Kontrollprøven er makrellfilet før varmebehandling. Tallverdier og endring i vanninnhold i forhold til kontrollprøven er gitt i Tabell J.1 i Vedlegg J. Ingen tydelige trender ble funnet for vanninnholdet ved de ulike temperaurene. Uavhengig av tid i vannbad og temperatur, varierte vanninnholdet mellom 55,2 og 69,9 %. Størst vanninnhold ble funnet for prøve 90-10-3, mens vanninnholdet var lavest for 75-15-1. Kontrollprøven hadde vanninnhold på 69,3 %. Kun prøve 90-10-3 hadde høyere vanninnhold enn kontrollprøven, og for de andre prøvene gikk vanninnholdet ned mellom 1,6 og 20,3 % som følge av varmebehandlingen. Til sammenligning fant González-Fandos et al. (2004) at vanninnholdet gikk ned med 2 % etter sous vide-behandling av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*).



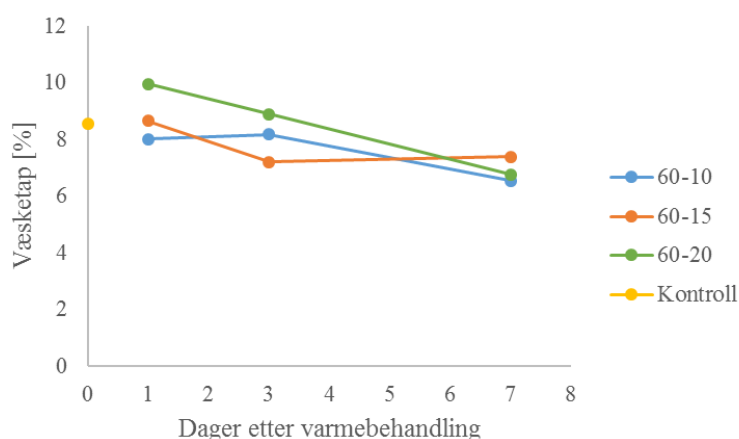
Figur 3.21: Vanninnhold i makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter, før lagring på is på kjølerom (4°C) i 1, 3 og 7 dager. Vanninnhold til makrellfiletet før varmebehandling (kontroll) er også inkludert. Vanninnholdet er gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD (n=3).

Liten forskjell i vanninnhold mellom kontrollprøve og varmebehandlede prøver stemmer godt overens med det (Skipnes et al. 2011) fant for atlantisk torsk (*Gadus morhua*). Vanninnholdet både i rå torskemuskel og varmebehandlet torskeprøver lå rundt 78 %. Vanninnhold og lipidinnhold utgjør som nevnt 80 % av en fiskemuskel til enhver tid. Lavere innhold av vann i makrell sammenlignet med torsk skyldes at lipidinnholdet i makrell er vesentlig høyere enn i torsk. Lipidinnholdet kan også variere mellom individer, noe som kan forklare liten forskjell i vanninnhold for makrellfiletene ved ulike varmebehandling. Lipidinnholdet ble ikke bestemt som en del av dette studiet.

Etttersom det var lite variasjon mellom ulike uttaksdager, temperaturer og tid i vannbad, kan væsketapet ha stabilisert seg ved en temperatur på 60°C og en prosesseringstid på 10 minutter, slik at alt av vannet som kan lekke ut av muskelen som koketap og drypptap allerede da har lekket ut. Væsketap er diskutert i Avsnitt 3.2.2.

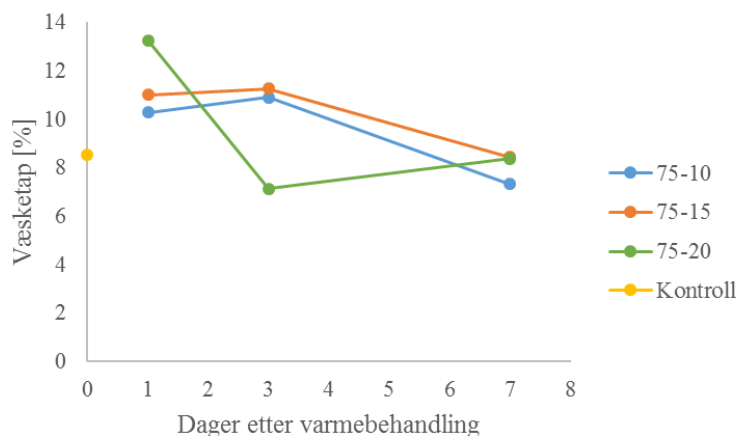
3.2.2 Væsketap

Væsken som tapes fra muskel ved varmebehandling og påfølgende lagring inneholder både drypp fra lagringsprosessen og koketap fra varmebehandlingen. Termisk denaturering av muskelproteiner og den mekaniske kraften som oppstår som følge av endringer i proteinstruktur, er en betydelig årsak til koketap (Bell et al. 2001). Væsketapet for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C er gitt i henholdsvis Figur 3.22, 3.23 og 3.24. Tallverdier er gitt i Tabell B.2 i Vedlegg B.2. Bestemmelse av væsketap ble utført i samarbeid med Janna Cropotova. Væsketapet varierte mellom 6,55 og 13,25 % av våtvekt. Størst væsketap ble funnet for 75-20-1, mens 60-10-7 hadde minst væsketap. Kontrollprøven hadde et drypptap på 8,54 %. I løpet av lagringsperioden gikk væsketapet ned for alle temperatu- rene og alle prosesseringstidene. Uavhengig av tid i vannbad gikk væsketapet for prøver behandlet ved 60, 75 og 90°C ned med henholdsvis 22, 30 og 19 %. Denne nedgangen er basert på gjennomsnittsverdier for hver uttaksdag for de ulike temperatu- rene.

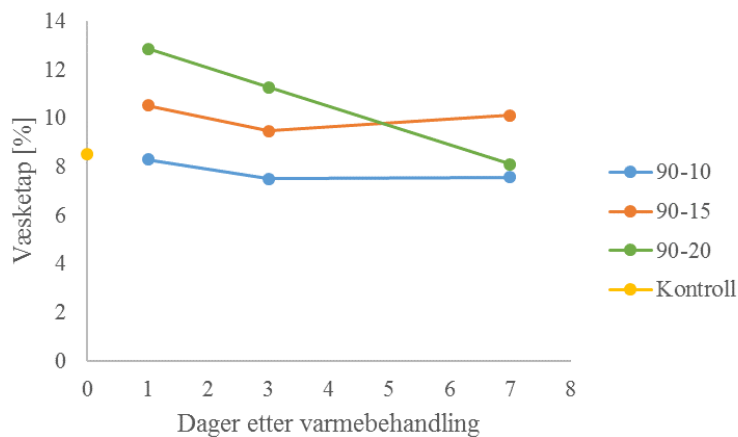


Figur 3.22: Væsketap i % av våtvekt for makrellfileter varmebehandlet ved 60°C, samt for kontrollprøve uten varmebehandling. Makrellfiletene ble varmet i vannbad i 10 (60-10), 15 (60-15) og 20 (60-20) minutter, og væsketap ble bestemt etter lagring på kjølerom i 1, 3 og 7 dager etter varmebehandlingen. Bestemmelse av væsketap ble utført av Janna Cropotova.

3 RESULTATER OG DISKUSJON



Figur 3.23: Væsketap i % av våtvekt for makrellfileter varmebehandlet ved 75°C, samt for kontrollprøve uten varmebehandling. Makrellfiletene ble varmet i vannbad i 10 (75-10), 15 (75-15) og 20 (75-20) minutter, og væsketap ble bestemt etter lagring på kjølerom i 1, 3 og 7 dager etter varmebehandlingen. Bestemmelse av væsketap ble utført av Janna Cropotova.



Figur 3.24: Væsketap i % av våtvekt for makrellfileter varmebehandlet ved 90°C, samt for kontrollprøve uten varmebehandling. Makrellfiletene ble varmet i vannbad i 10 (90-10), 15 (90-15) og 20 (90-20) minutter, og væsketap ble bestemt etter lagring på kjølerom i 1, 3 og 7 dager etter varmebehandlingen. Bestemmelse av væsketap ble utført av Janna Cropotova.

Dag 1 hadde prøver varmebehandlet i 20 minutter større væsketap enn prøver med kortere tid i vannbad, uavhengig av prosesseringstemperatur. 10 minutter i vannbad resulterte i lavest væsketap, så på dag 1 etter varmebehandling økte væsketapet med økende tid i vannbad. Uavhengig av temperatur var det mindre variasjon mellom de tre prosesseringstidene på dag 7 enn dag 1, noe som tyder på at væsketapet stabiliserer seg utover i lagringsperioden. For dag 1 ble det funnet størst spredning i væsketap mellom de ulike tidene i vannbad ble funnet for 90°C.

I flere tidligere studier på varmebehandlet fisk, er det funnet at koketapet øker med økende tid og temperatur (Ofstad et al. 1993, Kong et al. 2007, Skipnes et al. 2011). Koketapet ble ikke bestemt like etter varmebehandling av makrellfiletene, men væsketapet har trolig ikke endret seg mye frem til dag 1. Resultatene fra dag 1 viser at væsketapet øker med økt tid i vannbad ved alle temperaturer. Uavhengig av tiden i vannbad, ble størst væsketap dag 1 funnet for prøver varmebehandlet ved 75°C. Større væsketap ved 75°C enn ved 90°C kan skyldes at makrellfiletene som ble behandlet ved 90°C ble tint i vannbad før vakuumpakking, mens filetene varmet ved 60°C og 75°C ble tint på is over natten. Tining i vannbad kan ha ført til økt drypptap før vakuumpakking og varmebehandling, og dette dryppet er ikke med i væsketapet etter varmebehandling og lagring. Frysing og tining av makrellfiletene før vakuumpakking og varmebehandling førte til drypptap, så makrellfiletene hadde allerede mistet en del av vannet før varmebehandlingen. Dette kan ha påvirket væsketap og vanninnhold. Ettersom det er ønskelig å redusere væsketap fra fiskeprodukter, bør det ved senere studier undersøkes om annen lagring enn fryselagring før varmebehandling egner seg bedre.

Under varmebehandling vil muskelproteiner denatureres, og det var derfor forventet større væsketap med økt tid og temperatur. Samtidig var det ventet at varmebehandling ville føre til større væsketap enn kontrollprøven. Varmebehandling ved 60°C, og 10 minutter ved 90°C resulterte i omtrent likt væsketap som kontrollen, mens prøvene varmet ved 75°C og i 15 og 20 minutter ved 90°C resulterte i større væsketap enn kontrollprøven. Ettersom makrellfiletene ble fryselagret (-20°C) i over to måneder før varmebehandlingen, var en del av muskelproteinene allerede denaturert som følge av isdannelse i muskelcellene. Liten forskjell mellom kontrollprøven og prøvene varmet ved 60°C tyder på at videre denaturering ikke resulterte i økt væsketap ved denne temperaturen. Denaturering av muskelproteiner er diskutert videre i Avsnitt 3.2.6.

Nedgangen i væsketap gjennom lagringsperioden skyldes at noe av vannet tas opp av muskelen igjen under lagring. Dette til tross for at strukturelle endringer og proteindenaturering som følge av termisk behandling er funnet å være irreversible (Ofstad et al. 1993, Skipnes et al. 2008). Kun en liten mengde av væsken som frigjøres fra muskelstrukturen under termisk behandling vil absorberes igjen ved

kjøling, og konformasjonsendringer i muskelen som følge av varmebehandling vil forbli uendret ved påfølgende kjøling (Skipnes et al. 2011). Stormo et al. (2017) fant at væsketapet i atlantisk torsk varmebehandlet i 4,16 minutter ved 70°C holdt seg stabilt ved kjølelagring (4°C) i 19 dager.

Utover i lagringsperioden ble det observert geldannelse på overflaten av makrellfileter varmebehandlet ved 75 og 90°C. Dette kan skyldes dannelse av gelatin fra kollagen. Denaturering av kollagen i fiskemuskel begynner rundt 63°C, og ved høyere temperaturer vil det kunne dannes gelatin (Deng 1981). På grunn av lavt innhold av kollagen i fisk, spiller kollagenet i fiskemuskel større rolle ved gelering og teksturendringer enn for kjøtt (Brown 1986). Et annet argument for at geldannelsen skyldes kollagen, er at koketap også inneholder stoffer som kollagen, gelatin, muskelfragmenter og koagulerte sarkoplasmaproteiner (Kong et al. 2007). Gelen kan også skyldes geldannelse av andre muskelproteiner. Ifølge Skipnes et al. (2011) kan enzymer i sarkoplasma påvirke gelering av intakt muskel. Videre analyser er nødvendig for å kunne slå fast årsaken til geldannelsen. Det ble tatt ut prøver for videre analyse, men funnene er ikke med i denne oppgaven.

3.2.3 Mikrobiell vekst

Termisk behandling vil sikre tryggere matprodukter blant annet ved å redusere mikrobiell vekst. Varmebehandling ved lavere temperaturer er ønskelig for å bevare sensorisk og ernæringsmessig kvalitet, men kan gå ut over holdbarheten og mattrykgheten. Mikrobiell status etter kjølelagring i 1, 5 og 7 dager for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter er gitt i Tabell 3.4. Den mikrobielle statusen ble bestemt som CFU/cm² ved å sammenligne dyrkningsslidene med diagrammet gitt i Figur A.1 i Vedlegg A. Antall telte kolonier er gitt i Tabell D.2 i Vedlegg D.2. Bestemmelse av mikrobiell status ble utført i samarbeid med Janna Cropotova.

3 RESULTATER OG DISKUSJON

Tabell 3.4: Mikrobiell status for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Omtrentlig CFU/cm² ble bestemt ved å sammenligne tettheten av kolonier med diagrammet gitt i Vedlegg A. Bestemmelse av mikrobiell status ble utført av Janna Crobotova.

Prøver	Uttaksdag	CFU/cm ²	Vekst
Kontroll	-	2,5	Meget liten
60-10-1	1	12	Liten
60-10-3	3	2,5	Meget liten
60-10-7	7	2,5	Meget liten
60-15-1	1	-	Ingen
60-15-3	3	2,5	Meget liten
60-15-7	7	-	Ingen
60-20-1	1	2,5	Meget liten
60-20-3	3	2,5	Meget liten
60-20-7	7	2,5	Meget liten
75-10-1	1	-	Ingen
75-10-3	3	-	Ingen
75-10-7	7	2,5	Meget liten
75-15-1	1	-	Ingen
75-15-3	3	-	Ingen
75-15-7	7	-	Ingen
75-20-1	1	2,5	Meget liten
75-20-3	3	-	Ingen
75-20-7	7	2,5	Meget liten

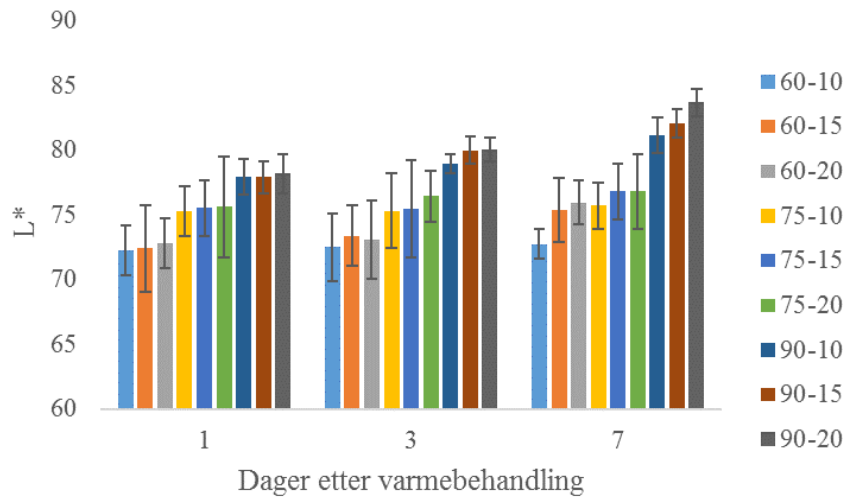
Prøvene varmebehandlet ved 90°C er ikke med i Tabell 3.4, ettersom det kun ble observert bakterier for prøvene 90-10-1 og 90-10-5, og antall bakterier tilsvarte omtrent 2,5 CFU/cm² (veldig liten vekst) for begge disse prøvene. Størst bakterieantall ble funnet dag 1 for makrellfileter varmebehandlet ved 60°C i 10 minutter med omtrent 12 CTF/cm² (tilvarer liten vekst). Ettersom det var færre bakterier dag 5 og 7 for prøvene varmet ved 60°C i 10 minutter (omtrent 2,5 CFU/cm²), kan antall bakterier funnet dag 1 skyldes forurensing. Det ble observert bakterier alle tre uttaksdagene for makrellfileter varmebehandlet ved 60°C i 10 og 20 minutter, men bortsett fra for 60-10-1, var veksten veldig liten for alle prøvene. Lavt bakterieantallet for alle prøvene viser god holdbarhet i minst 7 dager for varmebehandlet makrell, uavhengig av prosesseringstemperatur.

Til sammenligning fant Stormo et al. (2017) lav mikrobiell vekst i atlantisk torsk de 4 første dagene etter varmebehandling (70°C, 4,16 minutter). Etter dag 4 økte den mikrobielle veksten kraftig og dag 12 var det ingen forskjell mellom kontrollprøven som ikke var varmebehandlet og varmebehandlet torsk.

3.2.4 Farge og utseende

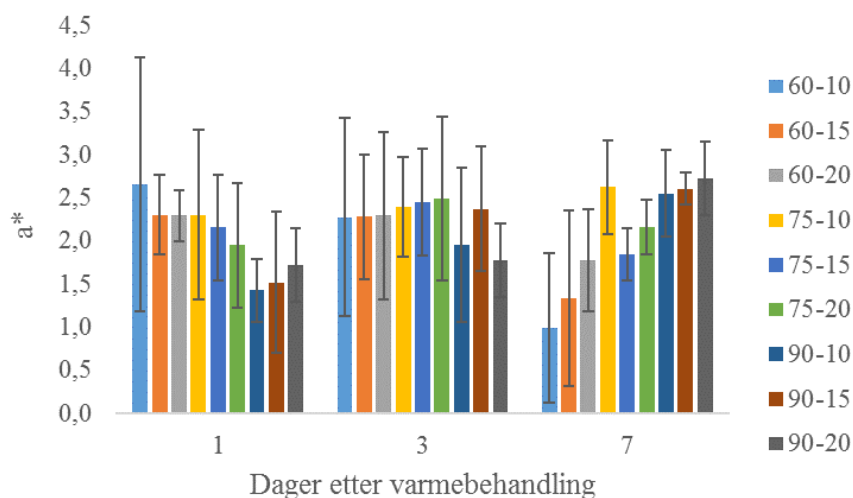
Farge er også en kvalitetsparameter som kan endres ved varmebehandling, men mildere varmebehandlinger som sous vide, kan redusere fargeendringene. Dette kan være viktig for den sensoriske kvaliteten til fiskemuskel. Fargen kan også påvirkes under lagring etter termisk behandling. I Figur 3.25 er lyshet (L*) gitt for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Tallverdier er gitt i Tabell E.1 i Vedlegg E. Lyshet ble målt 1, 3 og 7 dager etter varmebehandlingen. Fargemålinger ble utført av Janna Crobotova.

Hovedtrenden i lyshetsmålingene er at høyere varmebehandlingstemperatur fører til lysere makrellfileter. Varmebehandling ved 60°C ga L*-verdier mellom 72,29 (60-10-1) og 75,94 (60-20-7), 70°C-prøvene hadde L*-verdier mellom 75,31 (75-10-1) og 76,81 (75-15-7 og 75-20-7), og 90°C mellom 77,93 (90-15-1) og 83,71 (90-20-7). Til sammenligning var L*-verdien til kontrollprøven $69,18 \pm 3,89$, så det er tydelig at makrellfiletene ble lysere ved varmebehandling. Økt lyshet ved varmebehandling er tidligere funnet for laks (*Oncorhynchus gorbuscha*) (Kong et al. 2007), stillehavslaks (*Oncorhynchus keta*) (Bhattacharya et al. 1994) og atlantisk torsk (*Gadus morhua*) (Skipnes et al. 2011). Dag 1 var det ingen variasjon mellom de ulike prosesseringstidene, verken ved 60, 75 eller 90°C, og det ser ut til at lysheten kun avhenger av temperaturen under varmebehandlingen. Til sammenligning fant Skipnes et al. (2011) at lysheten i torsk økte med økende temperatur i temperaturintervallet 30-70°C, men ingen signifikant forskjell ble funnet mellom 70, 80 og 90°C.



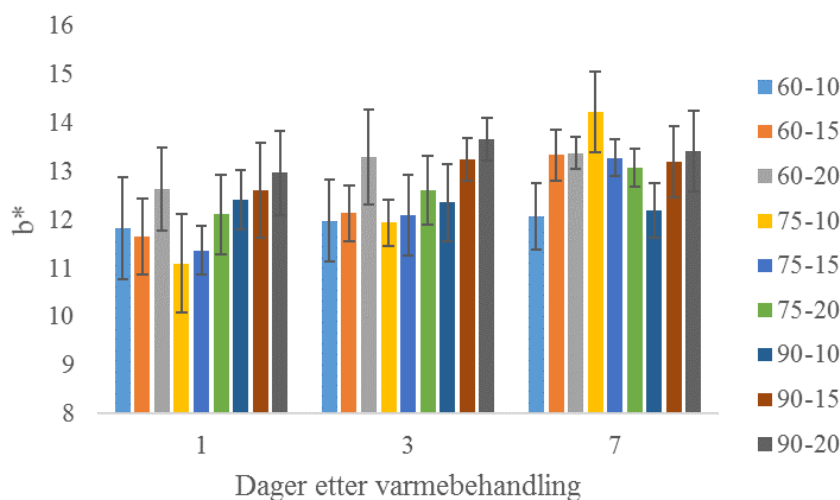
Figur 3.25: Lyshet (L^*) dag 1, 3 og 7 etter varmebehandling av makrellfileter varmet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 6$). Fargemålinger ble utført av Janna Cropotova.

For makrellfiletene ble det målt noe høyere lyshetsverdier dag 3 og 7, og dag 7 var lysheten omtrent lik for prøver varmebehandlet ved 60 og 75°C. Størst økning i L^* -verdi gjennom lagringsperioden ble funnet for prøve 60-20 som økte med nærmere 7 % fra dag 1 til dag 7. I tillegg til at varmebehandling resulterer i lysere fileter, vil påfølgende kjølelagring øke lysheten ytterligere. Økningen i lyshet skyldes trolig denaturering av hemproteiner (hemoglobin og myoglobin) som gir farge til fisk og mørk muskel (Kong et al. 2007). Franklin et al. (1994) fant at 50 % av hemoglobinet i teleost (*Notothenia coriiceps*) var denaturert etter varmebehandling (50°C) i 19 minutter.



Figur 3.26: Rødhet (a^*) dag 1, 3 og 7 etter varmebehandling av makrellfileter varmet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 6$). Fargemålinger ble utført av Janna Cropotova.

Målte verdier for rødhet (a^*) til makrellfiletene dag 1, 3 og 7 etter varmebehandling ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter er gitt i Figur 3.26. Tallverdier er gitt i Tabell E.1 i Vedlegg E. Verdiene for rødhet varierte mellom 0,99 (60-10-7) og 2,77 (90-20-7), men på grunn av store standardavvik er det vanskelig å finne noen trend mellom rødhet og prosesseringstid og -temperatur gjennom lagringsperioden. Kontrollprøven hadde en a^* -verdi på $2,46 \pm 0,69$. Ettersom kontrollprøven har en a^* -verdi i samme område som de varmebehandlede makrellfiletene, førte ikke varmebehandling til noen særlig endring i rødhet. Dette stemmer ikke overens med a^* -verdier funnet for laks (*Oncorhynchus gorbuscha*), som gikk raskt ned ved varmebehandling (100-131°C) (Kong et al. 2007). Redusert a^* -verdi ble også funnet ved varmebehandling av stillehavslaks (*Oncorhynchus keta* (Bhattacharya et al. 1994)). Det ble heller ikke funnet noen trend i rødhet gjennom lagringsperioden mellom prosesseringstid og -temperatur. For prøvene varmet ved 90°C økte a^* -verdien gjennom lagringsperioden, mens a^* -verdien gikk ned for 60°C-prøvene. Mindre endringer i rødhet ble funnet for 70°C-prøvene under lagring.



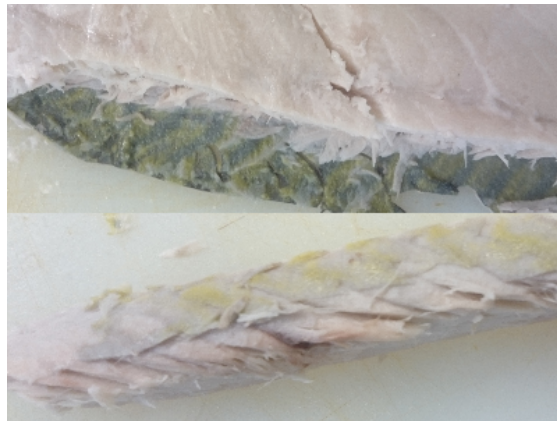
Figur 3.27: Gulhet (b^*) dag 1, 3 og 7 etter varmebehandling av makrellfileter varmet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 6$). Fargemålinger ble utført av Janna Cropotova.

Gulhet (b^*) i makrellfiletene dag 1, 3 og 7 etter varmebehandling ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter er presentert i Figur 3.26. Tallverdier er gitt i Tabell E.1 i Vedlegg E. Gulhetsverdiene varierte mellom $11,10 \pm 1,02$ (75-10-1) og $14,23 \pm 0,83$ (75-10-7), uavhengig av prosesseringstid og -temperatur. De varmebehandlede makrellfiletene hadde høyere b^* -verdier enn kontrollprøven med gulhet på $8,48 \pm 1,14$. Makrellfiletene fikk dermed mer gulhet ved varmebehandling. For laks (*Oncorhynchus gorbuscha*) derimot, er det funnet en rask reduksjon i b^* -verdier ved varmebehandling (100-131°C), men b^* -verdiene økte igjen under langvarig varmebehandling (90-180 minutter) (Kong et al. 2007).

Alle 60°C- og 75°C-prøvene hadde høyere b^* -verdi dag 7 enn dag 1, men hvor mye gulheten økte, varierte mellom prøvene. Signifikant ($p < 0,05$) økning ble funnet for prøve 60-15 og alle 75°C-prøvene. 90°C-prøvene økte også gjennom lagringsperioden, men samtlige av prøvene hadde noe høyere b^* -verdier dag 3 enn dag 7. Resultatene viser at makrell får økt gulhet under varmebehandling og økningen fortsetter ved påfølgende lagring.

Andre observasjoner av utseende

Like under skinnet av den blågrønne delen til makrellfiletene, over den laterale linjen, ble det observert gult stoff for varmebehandlede fileter utover i lagringsperioden. Figur 3.28 viser det gule stoffet like under skinnet og ved mørk muskel til makrellfileter. Stoffet hadde gellignende konsistens. Dette gule stoffet var i de mest fettrike områdene av makrellfiletene, og kan derfor være fettrelatert. Ettersom det lå like under det fargede delen av skinnet, kan det også hende at det gule stoffet er et fargestoff fra skinnet som frigjøres ved varmebehandling eller påfølgende kjølelagring. For å kunne avgjøre hva dette gule stoffet er og skylder, er videre karakterisering nødvendig. Det gule stoffet ble samlet opp for videre karakterisering, men resultatene er ikke inkludert i dette studiet.



Figur 3.28: Det ble observert et gult stoff like under skinnet til makrell etter varmebehandling med påfølgende kjølelagring.

3.2.5 Tekstur

Denaturering av muskelproteiner som følge av varmebehandling kan resultere i endret tekstur i fiskemuskel. Ved kraftig varmebehandling vil fiskekjøttet bli hardere, tørrere og dele seg i flak (Rosnes et al. 2011, Skipnes et al. 2011). Varmebehandling ved lavere temperaturer har vist seg å gi mykere tekstur (Deng 1981). Ved sous vide-behandling bevares tekturen bedre enn ved tradisjonell varmebehandling (Creed 1995). Bruddstyrke og kohesivitet for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C, er gitt i henholdsvis Tabell 3.5, 3.6 og 3.7. Teksturparameterne for prøver varmebehandlet i 10, 15 og 20 minutter ble målt 1, 3 og 7 dager etter varmebehandlingen. På grunn av dårlig kvalitet til fiksemuskelen etter varmebehandling, viste ikke teksturkurven hardhet. Derfor er kun resultater for

bruddstyrke og kohesivitet presentert her. Teksturmålingene ble utført av Janna Crobotova.

Bruddstyrkeverdiene varierte mellom 5,12 og 8,37 N, uavhengig av temperatur og tid under varmebehandlingen og uttaksdag. Til sammenligning hadde makrellfileter fryselaagret i én måned bruddstyrke på $5,85 \pm 0,31$ N (presentert i Avsnitt 3.1.5). Høyest bruddstyrkeverdier ble funnet for prøve 90-10-1, og 75-20-7 hadde lavest verdi. Alle prøvene hadde høyere bruddstyrke dag 1 enn dag 7, men for makrellfiletene varmebehandlet ved 60°C var bruddstyrken høyere dag 3 enn dag 7 uavhengig av tid i vannbad. Prøven 90-20-3 viste høyere bruddstyrke enn 90-20-1, ellers var verdiene høyere dag 1 enn dag 3 for resten av prøvene. Ut ifra verdiene fra dag 1 førte varmebehandling ved 90°C til høyest bruddstyrke, etterfulgt av 75°C og deretter 60°C. Det må altså mer kraft til for å bite gjennom makrellfiletene behandlet ved 90°C enn de som blir behandlet ved lavere temperaturer.

Tabell 3.5: Bruddstyrke målt i Newton (N) og kohesivitet for makrellfileter varmebehandlet ved 60°C i 10, 15 og 20 minutter. Teksturparametrene ble målt 1, 3 og 7 dager etter varmebehandling. Gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 6-10$). Teksturmålingene ble utført av Janna Crobotova.

Prøve	Uttaksdag	Bruddstyrke [N]	Kohesivitet
60-10-1	1	$6,59 \pm 0,94$	$0,39 \pm 0,03$
60-10-3	3	$5,97 \pm 0,95$	$0,39 \pm 0,06$
60-10-7	7	$6,12 \pm 1,11$	$0,39 \pm 0,04$
60-15-1	1	$6,34 \pm 0,69$	$0,39 \pm 0,04$
60-15-3	3	$5,27 \pm 0,34$	$0,35 \pm 0,04$
60-15-7	7	$5,35 \pm 0,80$	$0,35 \pm 0,02$
60-20-1	1	$6,01 \pm 0,64$	$0,36 \pm 0,02$
60-20-3	3	$5,24 \pm 0,70$	$0,33 \pm 0,04$
60-20-7	7	$5,72 \pm 1,18$	$0,38 \pm 0,06$

3 RESULTATER OG DISKUSJON

Tabell 3.6: Bruddstyrke målt i Newton (N) og kohesivitet for markrellfileter varmebehandlet ved 75°C i 10, 15 og 20 minutter. Teksturparametrerne ble målt 1, 3 og 7 dager etter varmebehandling. Gjennomsnittsverdier \pm SD (n = 6-10). Teksturmålingene ble utført av Janna Cropotova.

Prøve	Uttaksdag	Bruddstyrke [N]	Kohesivitet
75-10-1	1	7,77 \pm 1,27	0,32 \pm 0,18
75-10-3	3	6,79 \pm 0,74	0,38 \pm 0,06
75-10-7	7	5,55 \pm 0,92	0,34 \pm 0,02
75-15-1	1	6,60 \pm 0,32	0,29 \pm 0,16
75-15-3	3	5,45 \pm 0,90	0,37 \pm 0,05
75-15-7	7	5,15 \pm 0,38	0,34 \pm 0,04
75-20-1	1	7,13 \pm 0,80	0,39 \pm 0,06
75-20-3	3	6,25 \pm 0,79	0,34 \pm 0,04
75-20-7	7	5,12 \pm 0,58	0,36 \pm 0,05

Tabell 3.7: Bruddstyrke målt i Newton (N) og kohesivitet for markrellfileter varmebehandlet ved 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Teksturparametrerne ble målt 1, 3 og 7 dager etter varmebehandling. Gjennomsnittsverdier \pm SD (n = 6-10). Teksturmålingene ble utført av Janna Cropotova.

Prøve	Uttaksdag	Bruddstyrke [N]	Kohesivitet
90-10-1	1	8,37 \pm 1,90	0,36 \pm 0,03
90-10-3	3	7,81 \pm 0,79	0,36 \pm 0,04
90-10-7	7	7,19 \pm 0,56	0,38 \pm 0,03
90-15-1	1	8,22 \pm 0,44	0,38 \pm 0,04
90-15-3	3	7,63 \pm 0,31	0,24 \pm 0,19
90-15-7	7	6,74 \pm 0,64	0,34 \pm 0,04
90-20-1	1	7,67 \pm 1,25	0,34 \pm 0,04
90-20-3	3	7,94 \pm 1,43	0,34 \pm 0,03
90-20-7	7	6,72 \pm 0,82	0,39 \pm 0,07

Graden av elastisitet bestemmes ut fra kohesivitetsverdiene, der en kohesivitetsverdi på 1 er mest elastisk. Uavhengig av uttaksdag og parametre under varmeprosessen, varierte kohesiviteten mellom 0,24 og 0,39. Til sammenligning hadde makrellfileter fryselagret én måned en kohesivitet på $0,47 \pm 0,05$. Varmebehandling reduserte altså elastisiteten til makrellfileter. Det ble derimot funnet liten variasjon mellom uttaksdagene og for ulik tid og temperatur i vannbad, så betingelsene under varmebehandlingen ser ikke ut til å påvirke elastisiteten til makrellfiletene. Tidligere er det funnet at kohesiviteten i muskel fra varmebehandlet stillehavslaks ikke ble påvirket av prosesseringstemperaturer (Bhattacharya et al. 1993), noe som stemmer godt overens med resultatene funnet for makrellfileter.

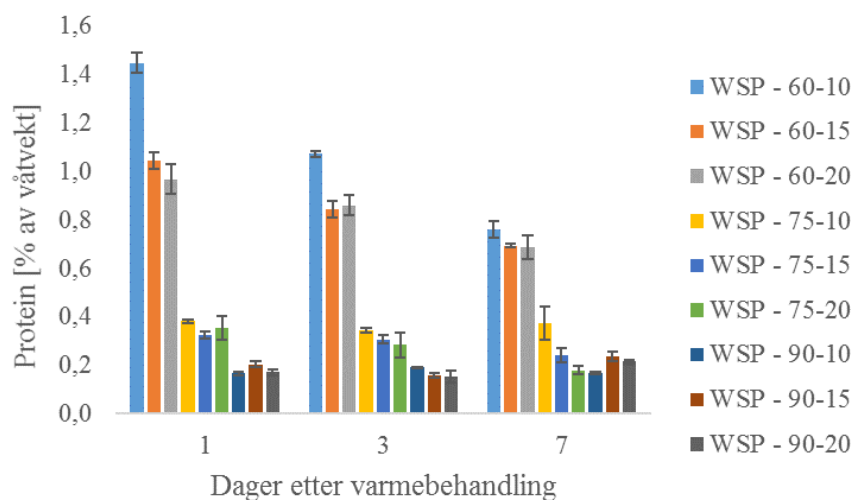
Siden hardhetsverdier ikke ble målt, er det vanskelig å si om valg av temperatur er avgjørende for hvor harde makrellfiletene blir. Lagringsforsøkene med kjølt (K) og superkjølt (S) makrell (presentert i Avsnitt 3.1.5) viste god korrelasjon mellom bruddstyrke og hardhet (K: $r = 0,96$, S: $r = 0,98$), og hvis det også er tilfelle for varmebehandlede makrellfileter, kan målt bruddstyrke fortelle noe om hvordan hardheten endret seg gjennom lagringen etter varmebehandling. Økt bruddstyrke med økt temperatur (dag 1) tyder på at høyere prosesseringstemperatur resulterer i hardere fileter. Hardere fiskemuskel ved høyere temperaturer er også funnet for atlantisk torsk (Skipnes et al. 2011) og for stillehavslaks (Bhattacharya et al. 1993). Redusert bruddstyrke fra dag 1 til dag 7 tyder på at makrellfiletene ble mykere utover i lagringsperioden, uavhengig av tid og temperatur for varmebehandlingen.

Som presentert i Avsnitt 3.2.2, gikk væsketapet ned gjennom lagringsperioden, uavhengig av tid og temperatur i vannbad. Redusert bruddstyrke gjennom lagringsperioden etter varmebehandling, for alle prøver, kan skyldes at noe av væsken tapt fra makrellmuskelen er gjenabsorbent av muskelen under lagring. Dette kan ha resultert i mykere muskel som følge av redusert væsketap. Tidligere er denaturering av proteiner ved termisk behandling ansett som hovedårsaken til både væsketap og teksturendringer i fisk (Ofstad et al. 1996). Høyere bruddstyrke og større væsketap ved høyere prosesseringstemperaturer skyldes denaturering av proteiner. Løselighetsegenskaper til og denaturering av proteiner er diskutert ytterligere i Avsnitt 3.2.6. Endring i bruddstyrke kan også skyldes kollagen. Denaturering av kollagen er blant annet en årsak til flakdannelse i fisk (Rosnes et al. 2011). Fiske-muskelen delte seg opp i flak ved høyere temperaturer, og dette var en av årsakene til at teksturparametrene ble vanskelig å måle.

3.2.6 Proteinløselighet

Termisk denaturering av proteiner antas å være hovedårsaken til endringer i væsketap og tekstur i fiskemuskel (Ofstad et al. 1996). Endringer i proteinstrukturen til fiskemuskel som følge av denaturering eller aggregering ved høye temperaturer, kan resultere i redusert løselighet. Proteinløselighet (i % av våtvekt) av vannløselige proteiner (WSP) for makrellfileter dag 1, 3 og 7 etter varmebehandling ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter er gitt i Figur 3.29. Tallverdier er gitt i Tabell F.8 i Vedlegg F.2.

Makrellfileter varmebehandlet ved 60°C hadde større mengde WSP enn filetene varmet ved 75 og 90°C. Uavhengig av tid i vannbad, varierte mengde WSP i 60°C-prøvene fra 0,76-1,45 % av våtvekt. Til sammenligning ble mengde WSP i makrellfileter fryselaagret én måned (presentert i Avsnitt 3.1.6) bestemt til $7,49 \pm 0,15$, så det er tydelig at varmebehandlingen har resultert i denaturering av sarkoplasmaproteiner. Utover i lagringsperioden ble det funnet redusert mengde WSP for 60°C-prøvene, og størst reduksjon ble funnet for prøve 60-10 som gikk ned 48 % fra dag 1 (1,45 % av våtvekt) til dag 7 (0,76 % av våtvekt). En nedgang på 34 og 29 % ble funnet for henholdsvis prøve 60-15 og 60-20. Mengde WSP i makrellfileter varmebehandlet ved 75 og 90°C varierte mellom 0,15 (90-20-2) og 0,38 (75-10-1) % av våtvekt. For 70°C-prøvene gikk mengde WSP ned gjennom lagringsperioden, men nedgangen var liten. 90°C-prøvene viste ingen endring i mengde WSP, og mengden sarkoplasmaprotein var lavt gjennom hele lagringsperioden.



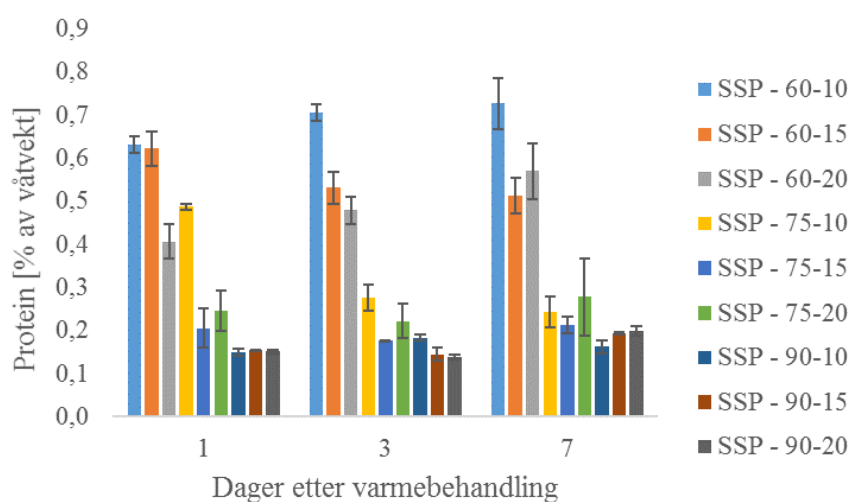
Figur 3.29: Mengde vannløselige proteiner (WSP) i makrellfileter varmet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter, før lagring på is på kjølerom (4°C) i 1, 3 og 7 dager. Mengde WSP er gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD (n = 3).

Det var en klar forskjell mellom 60°C-prøvene og prøvene behandlet ved 75 og 90°C. Dette skyldes større grad av denaturering av sarkoplasmaproteiner ved høyere temperaturer. Ettersom forskjellen dag 1 var mindre mellom prøvene varmebehandlet ved 75 og 90°C, tyder det på at temperaturer over 75°C ikke resulterer i ytterligere denaturering av sarkoplasmaproteiner. Redusert proteinløselighet av sarkoplasmaproteiner er også funnet for hilsa (*Tenualosa ilisha*) og torsk (*Gadus mourhua*) etter varmebehandling ved 30°C (Howgate & Ahmed 1972).

Redusert mengde WSP utover i lagringsperioden skyldes trolig videre aggregering under lagring. Størst reduksjon for prøvene varmebehandlet ved 60°C tyder dermed på at lavere prosesseringstemperatur fører til større grad av aggregering etter varmebehandling. Ifølge Skipnes et al. (2011) kan WSP følge med koketapet under varmebehandling, og proteinene kan koagulere på muskeloverflaten. Relativt lav mengde WSP for alle prøvene etter varmebehandling, kan dermed også skyldes at sarkoplasmaproteinene ble med koketapet.

Mengde saltløselige proteiner (SSP) i % av våtvekt bestemt 1, 3 og 7 dager for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter, er gitt i Figur 3.30. Tallverdier er gitt i Tabell F.8 i Vedlegg F.2. Målt mengde SSP for 75°C-prøvene fra dag 1 var lavere enn deteksjonsgrensen, men er likevel tatt med.

Uavhengig av temperatur og tid i vannbad, varierte mengden SSP mellom 0,14 og 0,63 % av våtvekt. Størst mengde SSP ble funnet for prøve 60-10-1, mens 90-20-7 hadde lavest mengde SSP. Mengde SSP i makrellfileter fryselagret én måned ble bestemt til $5,66 \pm 0,42$ (gitt i Avsnitt 3.1.6), som er 9 ganger større enn funnet for prøve 60-10-1 og 40 ganger større enn mengde SSP funnet for prøve 90-20-3. Varmebehandling ved 60°C resulterte i større mengde SSP enn de to andre temperaturene, bortsett fra 75-10-1 som hadde noe større mengde SSP enn 60-20-1 og 60-20-3. For makrellfileter varmebehandlet ved 60°C i 10 og 20 minutter, økte mengde SSP gjennom lagringsperioden etter varmebehandling. Økning mellom dag 1 (0,41 % av våtvekt) og dag 7 (0,57 % av våtvekt) for makrellfileter varmet ved 60°C i 20 minutter var signifikant ($p < 0,05$), mens en ikke-signifikant økning ble funnet for fileter varmet ved 60°C i 10 minutter. For 60-15-prøvene derimot, ble mengde SSP signifikant redusert fra dag 1 til dag 7. Makrellfileter varmebehandlet ved 75°C i 10 minutter hadde signifikant ($p < 0,05$) større mengde SSP på dag 1 enn dag 7 i lagringsperioden, mens liten endring i mengde SSP gjennom lagringsperioden ble funnet for resten av 75°C- og 90°C-prøvene.



Figur 3.30: Mengde saltløselige proteiner (SSP) i makrellfileter varmet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter, før lagring på is på kjølerom (4°C) i 1, 3 og 7 dager. Mengde SSP er gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 3$).

Signifikant ($p < 0,05$) større mengde SSP ved 60°C sammenlignet med 75 og 90°C tyder på mindre termisk denaturering av myofibrillproteiner, men ettersom målt mengde SSP er under 1 % for alle prøvene, er det tydelig at stor grad av denaturering av myofibrillproteiner skjer ved lavere temperaturer enn 60°C. Myosin

3 RESULTATER OG DISKUSJON

denatureres ved temperaurer mellom 40-60°C (Honikel 1989), så det var forventet denaturering også ved 60°C. Ettersom myofibrillproteinene aktin og aktomyosin er mer stabile og denatureres først rundt 75-80°C (Honikel 1989), kan lavere mengde SSP for prøver varmebehandlet ved 75 og 90°C forklares med økt denaturering av aktin og aktomyosin, samt av tropomyosin og troponin som først denatureres rundt 80°C (Foegeding & Lanier 1996). Myosin utgjør omtrent 45 % av myofibrillproteinene i en muskel (Foegeding & Lanier 1996), så denaturering av myosin vil redusere mengde SSP betraktning.

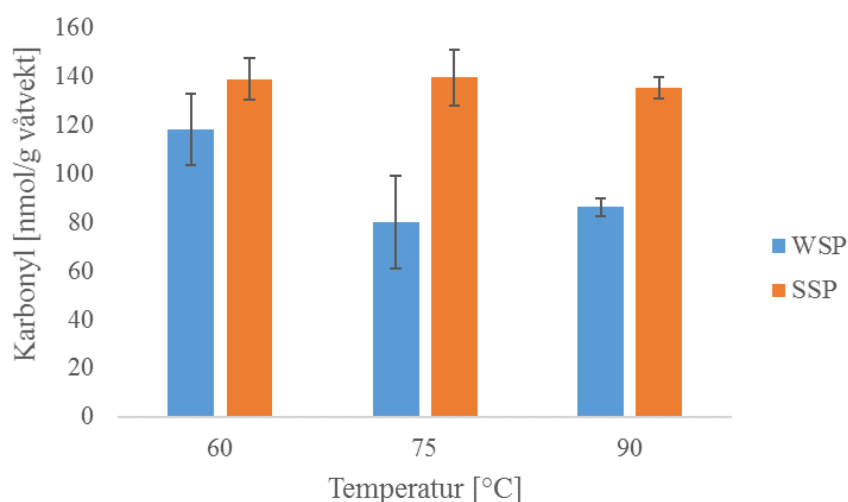
Som følge av termisk denaturering vil myofibrillproteinene og muskelvevet krympe. Disse endringene i muskelstrukturen vil generere mekaniske krefter i muskelen som resulterer i at væske kan bevege seg i vevet (Godsalve et al. 1977). Endringene i struktur kan også resultere i koketap og endret tekstur. Korrelasjonskoeffisienter mellom endring i mengde WSP/SSP og bruddstyrke eller væsketap gjennom lagringsperioden er gitt i Tabell 3.8. Noen av prøvene viste god korrelasjon, andre ikke, og det ble ikke funnet noen direkte sammenheng mellom de ulike parametrene og/eller tid og temperatur for varmebehandlingen. Dette gjør det vanskelig å vurdere om det er en direkte sammenheng mellom løseligheten til myofibrillproteiner og tekstur eller væsketap som følge av denaturering av proteinene. Siden varmebehandling ved 60°C resulterte i størst løselighet av sarkoplasma- og myofibrillproteiner, er det tydelig at lavere prosesseringstemperatur er gunstig med tanke på termisk denaturering av proteiner.

Tabell 3.8: Korrelasjonskoeffisienter mellom vann- (WSP) og/eller saltløselige (SSP) proteiner og væsketap eller bruddstyrke for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 eller 90°C i 10, 15 eller 20 minutter.

Prøve	WSP			SSP	
	Væsketap	Bruddstyrke	SSP	Væsketap	Bruddstyrke
60-10	0,776	0,765	-0,962	-0,575	-0,911
60-15	0,850	0,873	0,964	0,960	0,972
60-20	0,998	0,256	-0,999	-0,993	-0,305
75-10	-0,343	0,263	0,650	0,491	0,904
75-15	0,981	0,742	-0,676	-0,806	-0,007
75-20	0,682	1,000	-0,585	0,193	-0,561
90-10	-0,557	0,029	0,945	-0,798	-0,299
90-15	0,619	-0,597	0,945	0,327	-0,827
90-20	-0,817	-0,998	0,992	-0,882	-0,998

3.2.7 Proteinoksidasjon

Ved termisk behandling kan proteiner bli mer mottakelige for oksidasjon initiert av reaktive oksygenforbindelser (ROS). Det er blant annet funnet god korrelasjon mellom innhold av karbonylgrupper, som følge av oksidasjon av ROS, og væsketap ved varmebehandling, og god negativ korrelasjon mellom innhold av proteinløselighet og karbonylinnhold (Wang et al. 2009). Kvantifisering av karbonylgrupper er i dette studiet bestemt i homogenat av vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner fra makrellfileter varmebehandlet i 10 minutter ved 60, 75 og 90°C, og ble bestemt etter én dag kjølelagring på is (4°C). For å kunne bestemme om varmebehandling med påfølgende lagring resulterer i endring i proteinoksidasjon er det nødvendig å gjenta analysen. Karbonylinnholdet i nmol/g våtvekt er gitt i Figur 3.31. Tallverdier er gitt i Tabell H.3.

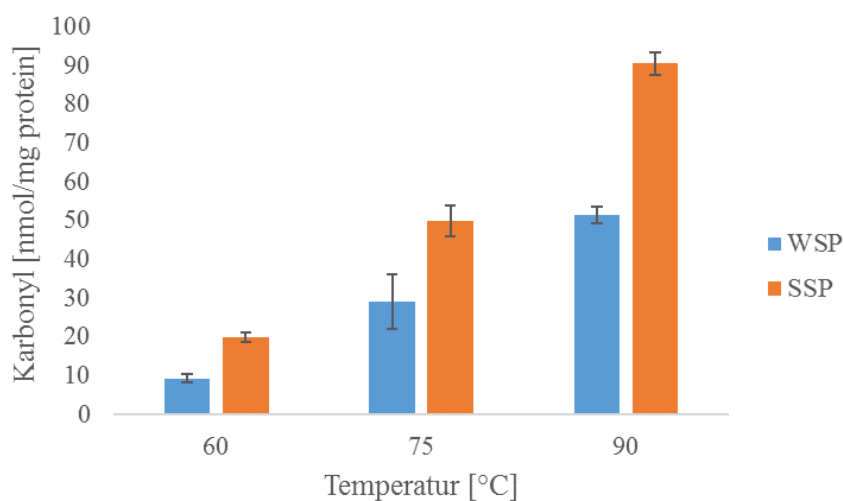


Figur 3.31: Kvantifisering av karbonylgrupper i homogenat av vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner fra makrellfileter varmebehandlet i 10 minutter ved 60, 75 og 90°C, bestemt til nmol/g våtvekt. Karbonylinnholdet ble bestemt dag 1 etter varmebehandling. Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 3$).

Karbonylinnholdet i homogenat av WSP var størst for makrellfileter varmebehandlet ved 60°C ($118,46 \pm 14,72$ nmol/g våtvekt), og minst ved 75°C ($86,23 \pm 19,19$ nmol/g våtvekt). Variasjonen i karbonylinnhold mellom de ulike temperaturene var ikke signifikant. For makrellfileter fryselagret én måned ble karbonylinnholdet i homogenat av WSP bestemt til $123,85 \pm 10,14$ nmol/g våtvekt. Lavere karbonylinnhold i WSP ved varmebehandling skyldes redusert løselighet som følge av

denaturering av proteiner. Som presentert i Avsnitt 3.2.6, varierte løseligheten av WSP mellom 0,17-1,45 % av våtvekt (dag 1), og ettersom karbonylinnholdet er bestemt i homogenat av WSP, er det kun oksidasjon av løste proteiner som måles. Mengde WSP for fileter fryselagret én måned ble bestemt til 7,49 % av våtvekt, som tilsvarer 5-44 ganger mer løste WSP enn funnet etter varmebehandling. Til tross for denne forskjellen i mengde vannløselige proteiner, er karbonylinnhold i fryselagret makrellfileter kun 4 % høyere enn for fileter varmet ved 60°C. Det vil si at de løste proteinene er mer oksidert etter varmebehandling.

I homogenat av SSP var den ingen signifikant forskjell i karbonylinnhold mellom temperaurene. Karbonylinnholdet i SSP lå mellom $135,55 \pm 4,37$ og $139,64 \pm 11,34$. Karbonylinnholdet var høyere i SSP enn WSP, så varmebehandling resulterte i mer oksidasjon av myofibrillproteiner enn av sarkoplasmaproteiner. Ettersom mengde SSP var lavere enn mengde WSP (presentert i Avsnitt 3.2.6), er løste myofibrillproteiner i større grad oksidert enn løste sarkoplasmaproteiner. Dannelse av karbonylgrupper som følge av oksidative reaksjoner i sidekjeden til aminosyrer, kan resultere i økt aggregering og dårligere løselighet Rowe et al. (2004). Økt aggregering som følge av proteinoksidasjon i de løste proteinene fra makrellfiletene kan dermed ha ført til dårligere proteinløselighet. Det ble funnet god korrelasjon mellom mengde løste proteiner og karbonylinnhold i nmol/g våtvekt for både WSP ($r = 0,955$) og SSP ($r = 0,902$).



Figur 3.32: Kvantifisering av karbonylgrupper i homogenat av vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner fra makrellfileter varmebehandlet i 10 minutter ved 60, 75 og 90°C, bestemt til nmol/mg protein. Karbonylinnholdet ble bestemt dag 1 etter varmebehandling. Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 3$).

Innhold av karbonylgrupper ble også bestemt i nmol/mg protein, og resultatene er gitt i Figur 3.32. Tallverdier er gitt i Tabell H.3 i Vedlegg H.2. Karbonylinnholdet i både WSP og SSP økte signifikant ($p < 0,05$) med økende prosesseringstemperatur. For WSP var karbonylinnholdet 5,5 ganger større ved 90°C (51,38 nmol/mg protein) enn 60°C (9,30 nmol/mg protein), mens karbonylinnholdet i SSP var 4,6 ganger større ved 90°C (90,53 nmol/mg protein) enn 60°C (19,84 nmol/mg protein). Makrellfileter fryselagret i én måned hadde til sammenligning et karbonylinnholdet på $1,66 \pm 0,13$ i WSP og $7,67 \pm 0,21$ i SSP. Varmebehandling resulterte dermed i dannelse av mye mer karbonylgrupper som følge av oksidasjon av proteiner per mg løst protein, sammenlignet med ved frysing. Det er god negativ korrelasjon mellom karbonylinnholdet i nmol/mg protein og mengde løste proteiner for både WSP ($r = -0,920$) og SSP ($r = -0,989$). God negativ korrasjon mellom mengde løste sarkoplasma- og myofibrillproteiner med karbonylinnhold er også tidligere funnet for varmebehandlet (41°C) av slaktekylling (Wang et al. 2009), noe som indikerer at det er en sammenheng mellom redusert løselighet til proteiner som følge av termisk behandling, og proteinoksidasjon. I tillegg fant Wang et al. (2009) god positiv korrelasjon mellom karbonylinnhold i WSP og SSP og væsketap. En slik sammenheng ble ikke funnet ved varmebehandling av makrellfileter. Korrelasjonskoeffisientene er presentert i Tabell 3.9.

Tabell 3.9: Korrelasjonskoeffisienter mellom karbonylinnhold i nmol/mg protein og nmol/g våtevekt og væsketap for vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner.

	WSP		SSP	
	Karbonyl [nmol/mg prot.]	Karbonyl [nmol/g vv]	Karbonyl [nmol/mg prot.]	Karbonyl [nmol/g vv]
Væsketap	0,092	0,632	0,038	0,528

3.3 Videre arbeid

Videre arbeid med kjølte og superkjølte makrellfileter bør inkludere bestemmelse av vann- og lipidinnhold. Ettersom makrell er en fet fisk, bør også lipidoksidasjon bestemmes siden det kan påvirke oksidasjon av proteiner. Makrellfiletene mistet evnen til å holde på vannet under lagring, og endring i vannbindingsevne gjennom lagringsperioden bør studeres ytterligere. Dannelsen av hvite flekker som ble observert på overflaten til superkjølte makrellfileter, er uheldig for utseende til filetene, og videre optimalisering av superkjølingsprosessen kan være nødvendig for å unngå disse flekkene. Siden superkjølingsprosessen resulterte i svært lav mengde saltløselige proteiner, kan det være aktuelt å utføre superkjølingsprosessen under mildere betingelser, for eksempel ved å redusere skallfrysingstiden.

Sous vide-prosesseringen i dette studiet var et pilotforsøk for utvikling av makrellprodukter. Ytterligere karakterisering og analysering vil være nødvendig for å kunne utvikle produkter med høy kvalitet og gode sensoriske egenskaper. I dette studiet ble frysede makrellfileter varmebehandlet, men ettersom frysing fører til redusert mengde løselige proteiner og endringer i tekstur, bør sous vide-behandling av kjølt og superkjølt makrell studeres. For videre utvikling av makrellprodukter, kan det tilsettes blant annet krydder og urter i vakuumpakkene før varmebehandling, og endring i kvalitetsparametre kan igjen studeres. Ettersom kvantifisering av karbonylgrupper kun ble gjort for dag 1 etter varmebehandling for makrellfileter varmet i 10 minutter, bør proteinoksidasjonsanalysen gjentas for å studere endring i karbonylinnhold gjennom lagringsperioden etter varmebehandling. Teksturmålinger kan også gjentas, for å måle hardhetsverdier. Sensoriske analyser vil også være nødvendig for videre utvikling av makrellprodukter.

Utseende til matprodukter er viktig for sensorisk kvalitet, og det gule stoffet som ble observert under skinnen til makrellfileter utover i lagringsperioden etter varmebehandling, kan påvirke utseende negativt. Videre arbeid kan inkludere karakterisering av stoffet for å finne årsaken, for så å optimalisere produktutviklingsprosessen for å unngå at det gule stoffet dannes. Dersom det viser seg at fargen kommer fra skinnen, kan prosessering av makrellfileter uten skinn være et alternativ.

4 Konklusjon

Målet med dette arbeidet var å optimalisere kjølelagring av makrell. Endring i kvalitet og biokjemiske egenskaper ble studert ved kjølelagring på is (4°C) i 7 dager og superkjølt lagring (-2°C) i 19 dager, og makrell fryselaget (-20°C) én måned ble brukt som referanse. Kjølte makrellfileter hadde akseptabelt antall bakterier til og med dag 5, mens superkjølte fileter var fortsatt akseptable på dag 19.

Under lagring mistet muskelproteinene evnen til å holde på vannet, og drypp ble tapt fra muskelen. Det er ønskelig å redusere drypptapet ettersom det er et godt vekstmedium for bakterier. Superkjølt lagring førte til lavest drypptap. Både drypptap og mengde cellevevsvæske økte signifikant under superkjølt lagring, mens kun drypptap økte signifikant gjennom kjølelagringsperioden. Superkjøling resulterte i lysere fileter enn kjølt lagring. Under kjølelagring ble makrellfiletene lysere og mykere, mens superkjølte fileter ble hardere og hadde nærmest konstant lyshet under lagring. Fryselaagrede fileter hadde høyest lyshet og var mykere enn superkjølte fileter. Ut ifra drypptap og teksturmålinger, viste superkjøling seg som den best egnede lagringsmetoden.

Mengde vannløselige proteiner ble signifikant redusert under superkjølt lagring, mens en ikke-signifikant reduksjon ble funnet for kjølte prøver. Denaturering av myofibrillproteiner førte til at mengde saltløselige proteiner ble redusert med 85 % utover i lagringsperioden av superkjølte makrellfileter, og dag 19 var mengden saltløselige proteiner under 2 % av våtvekt. Mengde saltløselige proteiner i makrellfileter fryst én måned tilsvarte mengden mellom dag 5 og 9 ved superkjølt lagring. Saltløselige proteiner hadde høyere karbonylinnhold og var dermed mer oksidert enn vannløselige proteiner. Karbonylinnhold i nmol/mg protein økte signifikant i myofibrillproteiner fra superkjølte makrellfileter under lagring.

Fryselagring resulterte i størst ødeleggelse av lysosomer og størst proteolytisk aktivitet av katepsin B+L-lignende enzymer i cellevevsvæske, mens størst total proteolytisk aktivitet ble funnet for superkjølte prøver fra dag 9. Total proteolytisk aktivitet økte ved kjølelagring og frem til dag 9 ved superkjølt lagring. Økningen kan skyldes at inhibitorer ble brutt ned. Proteolytisk aktivitet førte til økt total mengde frie aminosyrer gjennom lagringsperioden for både kjølte og superkjølte prøver, og det var god korrelasjon mellom mengde frie aminosyrer og katepsin B+L-lignende aktivitet i cellevevsvæske. For superkjølt makrell var det også god korrelasjon mellom mengde frie aminosyrer og mengde saltløselige proteiner som følge av nedbrytning av myofibrillproteiner. Aminosyren histidin dominerte i alle prøvene.

Et annet mål med dette arbeidet var å studere effekten av ulik varmebehandling og påfølgende lagring på endringer i ulike kvalitetsparametre. Vakuumpakkede makrellfileter ble varmebehandlet i vannbad ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter og lagret kjøling på is (4°C) i 1, 3 og 7 dager. Tid og temperatur under varmebehandlingen påvirket ikke vanninnholdet til makrellfiletene, og alle prøvene hadde god mikrobiell holdbarhet gjennom lagringsperioden. Væsketapet økte med økende temperatur og tid i vannbad, men gikk ned gjennom lagringsperioden etter som noe av væsken ble gjenabsorbent av muskelen.

Høyere temperatur under varmebehandling førte til lysere makrellfileter, og filetene ble ytterligere lysere gjennom lagringsperioden. Termisk denaturering av proteiner førte til lav proteinløselighet. Større mengde vann- og saltløselige proteiner ble målt for fileter varmet ved 60°C enn for 75 og 90°C, men mengde vannløselige proteiner var 1,45 % av våtvekt eller lavere og størst mengde saltløselige proteiner 0,63 % av våtvekt. Utover lagringsperioden gikk mengde vannløselige proteiner ned for filetene varmet ved 60°C, mens mengde saltløselige proteiner holdt seg mer konstant under lagring. Proteinoksidasjon ble kun målt dag 1, og karbonylinnholdet i både myofibrill- og sarkoplasmaproteiner økte signifikant med økende temperatur. Proteiner i løsning var mer oksidert etter varmebehandling. Varmebehandling ved 60°C resulterte i makrellfileter med høyere kvalitet enn prosessering ved høyere temperaturer, med tanke på denaturering av muskelproteiner, oksidasjon av proteiner og væsketap.

Bibliografi

- Alamdari, D., Kostidou, E., Paletas, K., Sarigianni, M., Konstas, A., Karapiperidou, A. & Koliakos, G. (2005), 'High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein', *Free Radical Biology and Medicine* **39**(10), 1362–1367.
- Alinasabhematabadi, L. (2015), Protein oxidation in Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) during chilled and frozen storage, Master, Norwegian Univeristy of Science and Technology, Trondheim.
- Andersen, U. B., Thomassen, M. S. & Rørå, A. M. B. (1997), 'Texture Properties of Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of Diet, Muscle Fat Content and Time of Storage on Ice', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**(3), 347–353.
- Anderson, M. L. & Ravesi, E. M. (1968), 'Relation between Protein Extractability and Free Fatty Acid Production in Cod Muscle Aged in Ice', *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **25**(10), 2059–2069.
- Aoki, T. & Ueno, R. (1997), 'Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle', *Food Research International* **30**(8), 585–591.
- Baron, C. P., Kjærsgård, I. V. H., Jessen, F. & Jacobsen, C. (2007), 'Protein and Lipid Oxidation during Frozen Storage of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(20), 8118–8125.
- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Langsrud, Ø., Sinnes, K., Veiseth, E., Ofstad, R. & Thomassen, M. (2008), 'Effects of -1.5°C Super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-rigor Fillets: Cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage', *Food Chemistry* **111**(2), 329–339.
- Baldwin, D. E. (2012), 'Sous vide cooking: A review', *International Journal of Gastronomy and Food Science* **1**(1), 15–30.
- Barrett, A. J. & Kirschke, H. (1981), Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L, in 'Methods in enzymology. Proteolytic enzymes', Academic Press, New York, chapter Part C 80, pp. 535–561.
- Bartlett, P. D. & Schaap, A. P. (1970), 'Stereospecific formation of 1, 2-dioxetanes from cis-and trans-diethoxyethylenes by singlet oxygen', *Journal of the American Chemical Society* **92**(10), 3223–3225.
- Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009a), Meat, in 'Food Chemistry', 4 edn, Springer, Berlin, chapter 12, pp. 563–614.

BIBLIOGRAFI

- Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009b), Fish, *in* 'Food Chemistry', 4th edn, Springer, Berlin, chapter 13, pp. 617–639.
- Bell, J. W., Farkas, B. E., Hale, S. A. & Lanier, T. C. (2001), 'Effect of Thermal Treatment on Moisture Transport during Steam Cooking of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*)', *Journal of Food Science* **66**(2), 307–313.
- Bello, R. A., Luft, J. H. & Pigott, G. M. (1982), 'Ultrastructural Study of Skeletal Fish Muscle After Freezing at Different Rates', *Journal of Food Science* **47**(5), 1389–1394.
- Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. (1997), 'Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress', *Journal of Biological Chemistry* **272**(33), 20313–20316.
- Bertram, H. C., Kristensen, M., Østdal, H., Baron, C. P., Young, J. F. & Andersen, H. J. (2007), 'Does Oxidation Affect the Water Functionality of Myofibrillar Proteins?', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(6), 2342–2348.
- Bhattacharya, S., Choudhury, G. S. & Studebaker, S. (1993), 'Hydrothermal Processing of Pacific Chum Salmon: Effects on Texture and In-vitro Digestibility', *Journal of Food Quality* **16**(4), 243–251.
- Bhattacharya, S., Choudhury, G. S. & Studebaker, S. (1994), 'Color Changes During Thermal Processing of Pacific Chum Salmon', *Journal of Aquatic Food Product Technology* **3**(1), 39–48.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959), 'A rapid method of total lipid extraction and purification', *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**(8), 911–917.
- Bradford, M. M. (1976), 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry* **72**(1-2), 248–254.
- Brown, W. D. (1986), Fish Muscle as Food, *in* P. J. Bechtel, ed., 'Muscle as Food', Academic Press, Inc, Orlando, chapter 10, pp. 405–451.
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. & Winterbourn, C. C. (1997), 'Protein Carbonyl Measurement by a Sensitive ELISA Method', *Free Radical Biology and Medicine* **23**(3), 361–366.
- Careche, M., García, M. L., Herrero, A., Solas, M. T. & Carmona, P. (2002), 'Structural Properties of Aggregates from Frozen Stored Hake Muscle Proteins', *Journal of Food Science* **67**(8), 2827–2832.
- Catalgol, B., Grimm, S. & Grune, T. (2011), Protein Carbonyl Measurement by Enzyme Linked Immunosorbent Assay, *in* D. Abele, J. P. Vázquez-Medina &

BIBLIOGRAFI

- T. Zenteno-Savin, eds, 'Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems', John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, chapter 33.
- Chang, H. D. & Tao, L. C. (1981), 'Correlations of Enthalpies of Food Systems', *Journal of Food Science* **46**(5), 1493–1497.
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M. & Verrez-Bagnis, V. (2007), 'Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles', *Food Chemistry* **101**(4), 1474–1479.
- Choe, E. & Min, D. B. (2005), 'Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods', *Journal of Food Science* **70**(9), R142–R159.
- Church, I. J. & Parsons, A. L. (2000), 'The sensory quality of chicken and potato products prepared using cook–chill and sous vide methods', *International Journal of Food Science & Technology* **35**(2), 155–162.
- Claussen, I. C. (2011), 'Superchilling Concepts Enabling Safe, High Quality and Long Term Storage of Foods', *Procedia Food Science* **1**, 1907–1909.
- Connell, J. J. (1961), 'The relative stabilities of the skeletal-muscle myosins of some animals', *Biochemical Journal* **80**(3), 503–509.
- Creed, P. G. (1995), 'The sensory and nutritional quality of 'sous vide' foods', *Food Control* **6**(1), 45–52.
- Dale, K. (2016), 'Etterlengtet løft av sildekvoten'. Nedlastet 12.05.2017 fra:
URL: <http://sjomatnorge.no/etterlengtet-loft-av-sildekvoten/>
- Davies, J. R., Bardsley, R. G., Ledward, D. A. & Poulter, R. G. (1988), 'Myosin thermal stability in fish muscle', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **45**(1), 61–68.
- Davies, K. J., Lin, S. W. & Pacifici, R. E. (1987), 'Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein.', *Journal of Biological Chemistry* **262**(20), 9914–9920.
- Davies, M. J. (2005), 'The oxidative environment and protein damage', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1703**(2), 93–109.
- Deng, J. C. (1981), 'Effect of Temperatures on Fish Alkaline Protease, Protein Interaction and Texture Quality', *Journal of Food Science* **46**(1), 62–65.
- Díaz, P., Garrido, M. D. & Bañón, S. (2010), 'Spoilage of Sous Vide Cooked Salmon (*Salmo salar*) Stored Under Refrigeration', *Food Science and Technology International* **17**(1), 31–37.

- Duun, A. & Rustad, T. (2007), 'Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets', *Food Chemistry* **105**(3), 1067–1075.
- Duun, A. & Rustad, T. (2008), 'Quality of superchilled vacuum packed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at -1.4 and -3.6°C', *Food Chemistry* **106**(1), 122–131.
- Duun, A. S. (2008), Superchilling of muscle food. Storage stability and quality aspects of salmon (*Salmo salar*), cod (*Gadus morhua*) and pork., Doktorgrad, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, NTNU.
- Einen, O., Guerin, T., Fjæra, S. O. & Skjervold, P. O. (2002), 'Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon', *Aquaculture* **212**(1-4), 129–140.
- Estévez, M. (2011), 'Protein carbonyls in meat systems: A review', *Meat Science* **89**(3), 259–279.
- Fennema, O. R. (1985), Water and ice, in 'Food Chemistry', Marcel Dekker Inc, New York.
- Fennema, O. R., Powrie, W. D. & Marth, E. H. (1973), *Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter*, Marcel Dekker Inc, New York.
- Fisheries (2012), 'Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*)'.
URL: http://www.fisheries.no/ecosystems-and-stocks/marine_stocks/fish_stocks/atlantic-mackerel/#.WRV0StKLTb1
- Foegeding, E. A. & Lanier, T. C. (1996), Characteristics of Edible Muscle Tissues, in O. R. Fennema, ed., 'Food chemistry', 3rd edn, Marcel Dekker Inc, New York, chapter 15, pp. 879–942.
- Franklin, C. E., Crockford, T., Johnston, I. A. & Kamunde, C. (1994), 'The thermostability of haemoglobins from the hot-spring fish, *Oreochromis alcalicus grahami*: Comparisons with antarctic and temperate species', *Journal of Thermal Biology* **19**(4), 277–280.
- Friestad, E. (2014), Superkjølt lam. Studier av proteolytiske enzymer, Master, Norges teknisk-vitenskapelige universitet, Trondheim.
- Gallart-Jornet, L., Rustad, T., Barat, J., Fito, P. & Escriche, I. (2007), 'Effect of superchilled storage on the freshness and salting behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets', *Food Chemistry* **103**(4), 1268–1281.
- García-Linares, M. C., Gonzalez-Fandos, E., García-Fernández, M. C. & García-Arias, M. T. (2004), 'Microbiological and Nutritional Quality of Sous Vide or

BIBLIOGRAFI

- Traditionally Processed Fish: Influence of Fat Content', *Journal of Food Quality* **27**(5), 371–387.
- Gobantes, I., Choubert, G. & Gómez, R. (1998), 'Quality of Pigmented (Astaxanthin and Canthaxanthin) Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fillets Stored under Vacuum Packaging during Chilled Storage', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(10), 4358–4362.
- Godfisk (2017), 'Makrell'. Nedlastet 12.05.2017 fra:
URL: <http://www.godfisk.no/Sjømatskolen/Fakta-om-fisk-og-skalldyr/Makrell>
- Godsalve, E., Davis, E. A., Gordon, J. & Davis, H. T. (1977), 'Water Loss Rates and Temperature Profiles of Dry Cooked Bovine Muscle', *Journal of Food Science* **42**(4), 1038–1045.
- Goll, D. E., Otsuka, Y., Nagainis, P. A., Shannon, J. D., Sathe, S. K. & Muguruma, M. (1983), 'Role of Muscle Proteinases in Maintenance of Muscle Integrity and Mass', *Journal of Food Biochemistry* **7**(3), 137–177.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G. & Ouali, A. (1998), 'The calpain system and skeletal muscle growth', *Canadian Journal of Animal Science* **78**, 503–512.
- Goll, D., Thompson, V., Taylor, R. & Christiansen, J. (1992), 'Role of the calpain system in muscle growth', *Biochimie* **74**(3), 225–237.
- Gómez-Guillén, M. C., Montero, P., Hurtado, O. & Borderías, A. J. (2000), 'Biological Characteristics Affect the Quality of Farmed Atlantic Salmon and Smoked Muscle', *Journal of Food Science* **65**(1), 53–60.
- González-Fandos, M., García-Linares, M. C., Villarino-Rodríguez, A., García-Arias, M. T. & García-Fernández, M. C. (2004), 'Evaluation of the microbiological safety and sensory quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by the sous vide method', *Food Microbiology* **21**(2), 193–201.
- Graham, J., Johnston, W. A. & Nicholson, F. J. (1992), *Ice in fisheries*, Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Haard, N. F. (1992), 'Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish', *Food Research International* **25**(4), 289–307.
- Hardin, J., Bertoni, G. & Kleinsmith, L. J. (2012a), Cellular Movement: Motility and Contractility, in 'Becker's World of the Cell', 8 edn, Pearson, Boston, chapter 16, pp. 460–470.
- Hardin, J., Bertoni, G. & Kleinsmith, L. J. (2012b), Beyond the Cell: Cell Ad-

BIBLIOGRAFI

- hesions, Cell Junctions, and Extracellular Structures, *in* 'Becker's World of the Cell', 8th edn, Pearson, Boston, chapter 17, pp. 477–504.
- Harris, S. E., Huff-Lonergan, E., Lonergan, S. M., Jones, W. R. & Rankins, D. (2001), 'Antioxidant status affects color stability and tenderness of calcium chloride-injected beef.', *Journal of animal science* **79**, 666–677.
- Hauge, J. G. (2009), 'Proteolytiske enzymer'. Nedlastet 23.05.2017 fra:.
URL: https://snl.no/proteolytiske_enzymmer
- Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Boudjellal, A. & Ouali, A. (2006), 'Meat ageing: Reconsideration of the current concept', *Trends in Food Science & Technology* **17**(8), 394–405.
- Hjermann, D. Ø. & Sælen, O. H. (2015), 'Pelagisk'. Nedlastet 12.05.2017 fra:.
URL: <https://snl.no/pelagisk>
- Honikel, K. O. (1989), The meat aspects of Water and Food Quality, *in* T. M. Hardman, ed., 'Water and Food Quality', Elsevier Applied Science, Barking, chapter 8, pp. 277–304.
- Howgate, P. F. & Ahmed, S. F. (1972), 'Chemical and bacteriological changes in fish muscle during heating and drying at 30 °C', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **23**(5), 615–627.
- Huang, L., Xiong, Y. L., Kong, B., Huang, X. & Li, J. (2013), 'Influence of storage temperature and duration on lipid and protein oxidation and flavour changes in frozen pork dumpling filler', *Meat Science* **95**(2), 295–301.
- Huff-Lonergan, E. & Lonergan, S. M. (2005), 'Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes', *Meat Science* **71**(1), 194–204.
- Hultmann, L. (2003), Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins and texture, Doctoral thesis, Norwegian University of Science and Technology (NTNU).
- Hultmann, L., Bencze Rørå, A. M., Steinsland, I., Skåra, T. & Rustad, T. (2004), 'Proteolytic activity and properties of proteins in smoked salmon (*Salmo salar*)—effects of smoking temperature', *Food Chemistry* **85**(3), 377–387.
- Hultmann, L. & Rustad, T. (2002), 'Textural Changes During Iced Storage of Salmon (*Salmo salar*) and Cod (*Gadus morhua*)', *Journal of Aquatic Food Product Technology* **11**(3-4), 105–123.
- Hultmann, L. & Rustad, T. (2004), 'Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*) –

BIBLIOGRAFI

- effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture', *Food Chemistry* **87**(1), 31–41.
- Huss, H. H. (1995), Quality and quality changes in fresh fish, *in* 'FAO Fisheries Technical paper - 348', Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), Rome, chapter 5. Postmor.
- ICMSF (1986), Sampling plans for fish and shellfish, *in* 'FOOD, I. C. O. M. S. F. Microorganisms in foods', 2nd edn, Blackwell Scientific Publications.
- Jiang, S. T. & Lee, T. C. (1985), 'Changes in free amino acids and protein denaturation of fish muscle during frozen storage', *Journal of agricultural and food chemistry* **33**(5), 839–844.
- Johansen, T. (2013), Superchilling of Salmon (*Salmo salar*), Master, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim.
- Kazemi, S., Ngadi, M. O. & Gariépy, C. (2011), 'Protein Denaturation in Pork Longissimus Muscle of Different Quality Groups', *Food and Bioprocess Technology* **4**(1), 102–106.
- Keay, J. N. (2001), 'Handling and Processing Mackerel'. Nedlastet 12.05.2017 fra.:
URL: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5938e/x5938e00.htm#Contents>
- Kolodziejaska, I. & Sirorski, Z. E. (1996), 'Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates. A review', *Journal of Food Biochemistry* **20**(3), 349–364.
- Kong, F., Tang, J., Rasco, B. & Crapo, C. (2007), 'Kinetics of salmon quality changes during thermal processing', *Journal of Food Engineering* **83**(4), 510–520.
- Koohmaraie, M. (1996), 'Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat', *Meat Science* **43**, 193–201.
- Koohmaraie, M., Kent, M. P., Shackelford, S. D., Veiseth, E. & Wheeler, T. L. (2002), 'Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship?', *Meat Science* **62**(3), 345–352.
- Lawson, M. A. (2004), 'The role of integrin degradation in post-mortem drip loss in pork', *Meat Science* **68**(4), 559–566.
- Le Denois, E. (1920), *Nouvelle méthode de frigorification du poisson*, French Patent No. 506.296, France.
- Lee, C. M. & Toledo, R. T. (1984), 'Comparison of Shelf Life and Quality of Mullet

- Stored at Zero and Subzero Temperature', *Journal of Food Science* **49**(2), 317–322.
- Leu, S.-S., Jhaveri, S. N., Karakoltsidis, P. A. & Constantinides, S. M. (1981), 'Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*, L): Seasonal Variation in Proximate Composition and Distribution of Chemical Nutrients', *Journal of Food Science* **46**(6), 1635–1638.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P. & Shacter, E. (1994), 'Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins', *Methods Enzymol* **233**, 346–357.
- Licciardello, J. J., Ravesi, E. M., Lundstrom, R. C., Wilhelm, K. A., Correia, F. F. & Allsup, M. G. (1982), 'Time-temperature tolerance and physical-chemical quality tests for red hake', *Journal of Food Quality* **5**(3), 215–234.
- Lu, H., Luo, Y., Zhou, Z., Bao, Y. & Feng, L. (2014), 'The Quality Changes of Songpu Mirror Carp (*Cyprinus carpio*) during Partial Freezing and Chilled Storage', *Journal of Food Processing and Preservation* **38**(3), 948–954.
- Lund, K. E. & Nielsen, H. H. (2001), 'Proteolysis in salmon (*Salmo salar*) during cold storage; Effects of storage time and smoking process', *Journal of Food Biochemistry* **25**(5), 379–395.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P. & Estévez, M. (2011), 'Protein oxidation in muscle foods: A review', *Molecular Nutrition & Food Research* **55**(1), 83–95.
- Lund, M. N., Hviid, M. S. & Skibsted, L. H. (2007b), 'The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage', *Meat Science* **76**(2), 226–233.
- Lund, M. N., Lametsch, R., Hviid, M. S., Jensen, O. N. & Skibsted, L. H. (2007), 'High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage', *Meat Science* **77**(3), 295–303.
- Martinaud, A., Mercier, Y., Marinova, P., Tassy, C., Gatellier, P. & Renerre, M. (1997), 'Comparison of Oxidative Processes on Myofibrillar Proteins from Beef during Maturation and by Different Model Oxidation Systems', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**(7), 2481–2487.
- Martinez, I., Jakobsen Friis, T. & Careche, M. (2001), 'Post mortem muscle protein degradation during ice-storage of Arctic (*Pandalus borealis*) and tropical (*Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*) shrimps: a comparative electrophoretic and immunological study', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**(12), 1199–1208.

BIBLIOGRAFI

- Martino, M. N. & Zaritzky, N. E. (1988), 'Ice Crystal Size Modifications during Frozen Beef Storage', *Journal of Food Science* **53**(6), 1631–1637.
- Mathieu-Costello, O. (1993), 'Comparative Aspects of Muscle Capillary Supply', *Annual Review of Physiology* **55**(1), 503–525.
- Mazur, S. & Foote, C. S. (1970), 'Chemistry of singlet oxygen. IX. Stable dioxetane from photooxygenation of tetramethoxyethylene', *Journal of the American Chemical Society* **92**(10), 3225–3226.
- Molina-García, A. D., Otero, L., Martino, M. N., Zaritzky, N. E., Arabas, J., Szczepek, J. & Sanz, P. D. (2004), 'Ice VI freezing of meat: supercooling and ultrastructural studies', *Meat Science* **66**(3), 709–718.
- Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. & Borderias, A. J. (2003), 'Influence of Salmon Provenance and Smoking Process on Muscle Functional Characteristics', *Journal of Food Science* **68**(4), 1155–1160.
- Mørkøre, T., Hansen, A. Å., Unander, E. & Einen, O. (2002), 'Composition, Liquid Leakage, and Mechanical Properties of Farmed Rainbow Trout: Variation Between Fillet Sections and the Impact of Ice and Frozen Storage', *Journal of Food Science* **67**(5), 1933–1938.
- Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renner, M. & Laville, E. (2006), 'Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins', *Meat Science* **73**(3), 536–543.
- Murray, J. & Burt, J. R. (2001), 'The Composition of Fish'. Nedlastet 13.05.2017 fra:
URL: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e00.htm#Contents>
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2013a), The Three-Dimensional Structure of Proteins, in 'Lehninger Principles of Biochemistry', 6th edn, W. H. Freeman and Company, New York, chapter 4, pp. 115–156.
- NIFES (2015), 'Makrell'. Nedlastet 12.05.2017 fra:
URL: <https://www.nifes.no/forskningstema/trygg-sjomat/overvakning-av-sjomat/makrell-2/>
- Nilsson, K. & Ekstrand, B. (1993), 'The effect of storage on ice and various freezing treatments on enzyme leakage in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **197**(1), 3–7.
- Nilsson, K. & Ekstrand, B. (1994), 'Refreezing Rate after Glazing Affects Cod and Rainbow Trout Muscle Tissue', *Journal of Food Science* **59**(4), 797–798.

- Njinkoué, J.-M., Barnathan, G., Miralles, J., Gaydou, E.-M. & Samb, A. (2002), 'Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **131**(3), 395–402.
- Norges sjømatråd (2016), 'Sterk makrelleksport i november'.
URL: <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sterk-makrelleksport-i-november/>
- Nowlan, S. S., Dyer, W. J. & Keith, R. A. (1975), 'Temperature and Deteriorative Changes in Postrigor Cod Muscle Stored up to 14 Days in the Superchill Range, -1 to -4°C', *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **32**(9), 1595–1605.
- Offer, G., Knight, P., Jeacocke, R., Almond, R., Cousins, T., Elsey, J., Parsons, N., Sharp, A., Starr, R. & Purslow, P. (1989), 'The Structural Basis of the Water-Holding, Appearance and Toughness of Meat and Meat Products', *Food Structure* **Vol. 8**(No. 1, Article 17).
- Ofstad, R., Kidman, S. & Hermansson, A.-M. (1996), 'Ultramicroscopical Structures and Liquid Loss in Heated Cod (*Gadus morhua*L) and Salmon (*Salmo salar*) Muscle', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **72**(3), 337–347.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R. & Hermansson, A.-M. (1993), 'Liquid Holding Capacity and Structural Changes During Heating of Fish Muscle: Cod (*Gadus morhua* L.) and Salmon (*Salmo salar*)', *Food Structure* **12**(2).
- Ohshima, T., Fujita, Y. & Koizumi, C. (1993), 'Oxidative stability of sardine and mackerel lipids with reference to synergism between phospholipids and α -tocopherol', *Journal of the American Oil Chemists' Society* **70**(3), 269–276.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S. & Stadtman, E. R. (1987), 'Age-related changes in oxidized proteins.', *Journal of Biological Chemistry* **262**(12), 5488–5491.
- Olsson, G. B., Ofstad, R., Lødemel, J. B. & Olsen, R. L. (2003), 'Changes in water-holding capacity of halibut muscle during cold storage', *LWT - Food Science and Technology* **36**(8), 771–778.
- Olsson, G. B., Seppola, M. A. & Olsen, R. L. (2007), 'Water-holding capacity of wild and farmed cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) muscle during ice storage', *LWT - Food Science and Technology* **40**(5), 793–799.
- Ooizumi, T. & Xiong, Y. L. (2004), 'Biochemical Susceptibility of Myosin in Chicken Myofibrils Subjected to Hydroxyl Radical Oxidizing Systems', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(13), 4303–4307.

- Osnes, K. K. & Mohr, V. (1985), 'Peptide hydrolases of Antarctic krill, *Euphausia superba*', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **82**(4), 599–606.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. & Sentandreu, M. A. (2006), 'Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms', *Meat Science* **74**(1), 44–58.
- Ouali, A. & Talmant, A. (1990), 'Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles', *Meat Science* **28**(4), 331–348.
- Palka, K. & Daun, H. (1999), 'Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine M. semitendinosus during heating', *Meat Science* **51**(3), 237–243.
- Passi, S., Cataudella, S., Tiano, L. & Littarru, G. P. (2005), 'Dynamics of lipid oxidation and antioxidant depletion in Mediterranean fish stored at different temperatures', *BioFactors* **25**(1-4), 241–254.
- Pearce, K. L., Rosenvold, K., Andersen, H. J. & Hopkins, D. L. (2011), 'Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes — A review', *Meat Science* **89**(2), 111–124.
- Pedersen, B. (2016a), 'Oksidant'. Nedlastet 25.05.2017 fra:
URL: <https://snl.no/oksidant>
- Pedersen, B. (2016b), 'Frie Radikaler'. Nedlastet 25.05.2017 fra:
URL: https://snl.no/frie_radikaler
- Pelagia (2017), 'About Us'. Nedlastet 19.05.2017 fra:
URL: <http://pelagia.com/about/>
- Popova, T., Marinova, P., Vasileva, V., Gorinov, Y. & Lidji, K. (2009), 'Oxidative changes in lipids and proteins in beef during storage', *Archiva Zootechnica* **12**(3), 30–38.
- Poulter, R. G., Ledward, D. A., Godber, S., Hall, G. & Rowlands, B. (1985), 'Heat stability of fish muscle proteins', *International Journal of Food Science & Technology* **20**(2), 203–217.
- Power, H. E., Morton, M. L. & Sinclair, R. E. (1969), The chemical and physical characteristics of cod stored at superchill temperatures, *in* R. Kreuzer, ed., 'Freezing and irradiation of fish', Fishing News (Book), London, pp. 104–113.
- Rahman, M. S. & Driscoll, R. H. (1994), 'Freezing points of selected seafoods

- (invertebrates)', *International Journal of Food Science & Technology* **29**(1), 51–61.
- Rasmussen, R. S. (2001), 'Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics', *Aquaculture Research* **32**(10), 767–786.
- Regost, C., Jakobsen, J. V. & Rørå, A. M. B. (2004), 'Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage', *Food Research International* **37**(3), 259–271.
- Rezaei, M. & Hosseini, S. F. (2008), 'Quality Assessment of Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Chilled Storage', *Journal of Food Science* **73**(6), H93–H96.
- Rodríguez, Ó., Barros-Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J. M. & Aubourg, S. P. (2006), 'Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*)', *Food Chemistry* **95**(2), 270–278.
- Rosnes, J. T., Skåra, T. & Skipnes, D. (2011), 'Recent Advances in Minimal Heat Processing of Fish: Effects on Microbiological Activity and Safety', *Food and Bioprocess Technology* **4**(6), 833–848.
- Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M. & Huff-Lonergan, E. (2004), 'Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality¹', *Journal of Animal Science* **82**, 785–793.
- Rustad, T. (2005), *Muskelvevet i kjøtt og fisk*, 2nd edn, Institutt for bioteknologi, NTNU, Trondheim.
- Saeed, S. & Howell, N. K. (2002), 'Effect of lipid oxidation and frozen storage on muscle proteins of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*)', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**(5), 579–586.
- Saha, A., Mandal, P. & Bhattacharyya, S. (1995), 'Radiation-induced inactivation of enzymes? A review', *Radiation Physics and Chemistry* **46**(1), 123–145.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Aubry, L. & Gatellier, P. (2008), 'Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility', *Meat Science* **79**(4), 777–783.
- Scheffler, T. & Gerrard, D. (2007), 'Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism', *Meat Science* **77**(1), 7–16.

BIBLIOGRAFI

- Schellekens, M. (1996), 'New research issues in sous-vide cooking', *Trends in Food Science & Technology* **7**(8), 256–262.
- Sentandreu, M., Coulis, G. & Ouali, A. (2002), 'Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness', *Trends in Food Science & Technology* **13**(12), 400–421.
- Shen, S., Jiang, Y., Liu, X., Luo, Y. & Gao, L. (2015), 'Quality assessment of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during super chilling and chilled storage', *Journal of Food Science and Technology* **52**(8), 5204–5211.
- Siddaiah, D., Sagar Reddy, G., Raju, C. & Chandrasekhar, T. (2001), 'Changes in lipids, proteins and kamaboko forming ability of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) mince during frozen storage', *Food Research International* **34**(1), 47–53.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T. S. & Seland, A. (1997), 'Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (*Salmo Salar*)', *Journal of Food Science* **62**(4), 898–905.
- Sigurgisladottir, S., ØTorrissen, O., Lie, Ø., Thomassen, M. & Hafsteinsson, H. (1997), 'Salmon quality: Methods to determine the quality parameters', *Reviews in Fisheries Science* **5**(3), 223–252.
- Sikorski, Z. (1978), 'Protein changes in muscle foods due to freezing and frozen storage', *International Journal of Refrigeration* **1**(3), 173–180.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J. T. & Kleiberg, G. H. (2003), 'Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the Microbial and Sensory Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets', *Journal of Food Science* **68**(4), 1467–1472.
- Skipnes, D., Johnsen, S. O., Skåra, T., Sivertsvik, M. & Lekang, O. (2011), 'Optimization of Heat Processing of Farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Muscle with Respect to Cook Loss, Water Holding Capacity, Color, and Texture', *Journal of Aquatic Food Product Technology* **20**(3), 331–340.
- Skipnes, D., Van der Plancken, I., Van Loey, A. & Hendrickx, M. E. (2008), 'Kinetics of heat denaturation of proteins from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*)', *Journal of Food Engineering* **85**(1), 51–58.
- Skjervold, P. O., Fj?ra, S. O., ?stby, P. B., Isaksson, T., Einen, O. & Taylor, R. (2001), 'Properties of salmon flesh from different locations on pre- and post-rigor fillets', *Aquaculture* **201**(1-2), 91–106.

- Song, Y., Luo, Y., You, J., Shen, H. & Hu, S. (2012), 'Biochemical, sensory and microbiological attributes of bream (*Megalobrama amblycephala*) during partial freezing and chilled storage', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**(1), 197–202.
- Sotelo, C. G., Aubourg, S. P., Perez-Martin, R. I. & Gallardo, J. M. (1994), 'Protein denaturation in frozen stored hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle: The role of formaldehyde', *Food Chemistry* **50**(3), 267–275.
- Sotelo, C. G., Franco, J. M., Aubourg, S. P. & Gallardo, J. M. (1995), 'Changes in free amino acids of hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle during frozen storage/Cambios producidos en los aminoácidos libres del músculo de merluza (*Merluccius merluccius* L.) durante su conservación en estado congelado', *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos* **1**(1), 19–24.
- Srinivasan, S., Xiong, Y. L. & Decker, E. A. (1996), 'Inhibition of Protein and Lipid Oxidation in Beef Heart Surimi-like Material by Antioxidants and Combinations of pH, NaCl, and Buffer Type in the Washing Media', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(1), 119–125.
- Standal, I. B., Mozuraityte, R., Rustad, T., Alinasabhematabadi, L., Carlsson, N.-G. & Undeland, I. (n.d.), 'Quality changes in Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) during fresh and frozen storage: stability of lipids, vitamin D, proteins and low molecular weight metabolites, and formation of biogenic amines', *Food and Beverage Chemistry/Biochemistry*. Ikke publisert.
- Stoknes, I. & Rustad, T. (1995), 'Proteolytic Activity in Muscle from Atlantic Salmon (*Salmo salar*)', *Journal of Food Science* **60**(4), 711–714.
- Stormo, S. K., Skipnes, D., Sone, I., Skuland, A., Heia, K. & Skåra, T. (2017), 'Modeling-assisted minimal heat processing of Atlantic cod (*Gadus morhua*)', *Journal of Food Process Engineering* pp. e12555–n/a.
- Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M. & Goll, D. E. (1995), 'Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization?', *Journal of animal science* **73**, 1351–1367.
- Tejada, M., Careche, M., Torrejón, P., del Mazo, M. L., Solas, M. T., García, M. L. & Barba, C. (1996), 'Protein Extracts and Aggregates Forming in Minced Cod (*Gadus morhua*) during Frozen Storage', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(10), 3308–3314.
- Thorkelsson, G., Slizyte, R., Gildberg, A. & Kristinsson, H. G. (2009), Fish proteins and peptide product: processing methods, quality and functional proper-

BIBLIOGRAFI

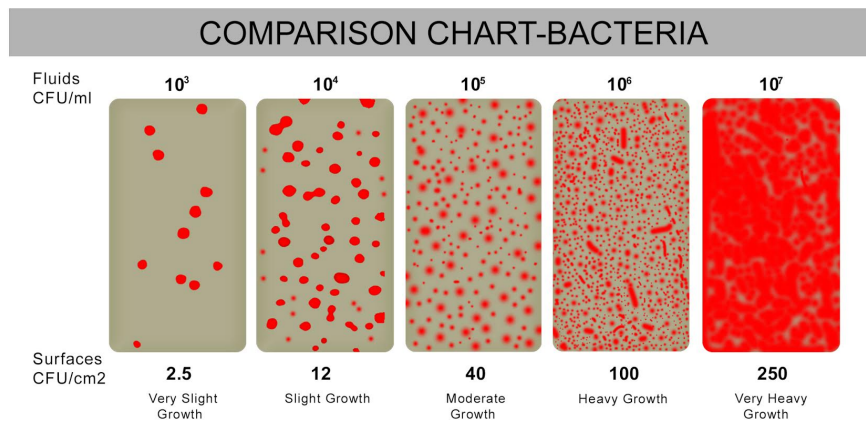
- ties, *in* 'Marine functional food', Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 115–133.
- Tokur, B. & Polat, A. (2010), 'Myofibrillar and Sarcoplasmic Protein Oxidation and Degradation og Thin-lipped Gray Mullet (*Liza ramada*) During Refrigerated Storage (4C)', *Journal of Muscle Foods* **21**(1), 102–118.
- Toldrá, F. & Reig, M. (2006), Biochemistry of Raw Meat and Poultry, *in* Y. Hui, W.-K. Nip, L. M. L. Nollet, G. Paliyath & B. K. Simpson, eds, 'Food Biochemistry & Food Processing', 1st edn, Blackwell Publishing, Iowa, chapter 13, pp. 293–314.
- Traore, S., Aubry, L., Gatellier, P., Przybylski, W., Jaworska, D., Kajak-Siemaszko, K. & Santé-Lhoutellier, V. (2012), 'Higher drip loss is associated with protein oxidation', *Meat Science* **90**(4), 917–924.
- Van der Plancken, I., Van Loey, A. & Hendrickx, M. E. (2006), 'Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: A kinetic study', *Journal of Food Engineering* **75**(3), 316–326.
- Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M. & Heinonen, M. (2005), 'Effect of Plant Phenolics on Protein and Lipid Oxidation in Cooked Pork Meat Patties', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(22), 8492–8497.
- Wang, H., Luo, Y. & Shen, H. (2013), 'Effect of frozen storage on thermal stability of sarcoplasmic protein and myofibrillar protein from common carp (*Cyprinus carpio*) muscle', *International Journal of Food Science & Technology* **48**(9), 1962–1969.
- Wang, R. R., Pan, X. J. & Peng, Z. Q. (2009), 'Effects of heat exposure on muscle oxidation and protein functionalities of pectoralis majors in broilers', *Poultry Science* **88**(5), 1078–1084.
- Wolff, S. P. & Dean, R. T. (1986), 'Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis', *Biochemical Journal* **234**(2), 399 LP – 403.
- Xiong, Y. L. (2000), Protein Oxidation and Implications for Muscle Food Quality, *in* E. Decker, C. Faustman & C. J. Lopez-Bote, eds, 'Antioxidants in Muscle Foods', 1st edn, John Wiley & Sons, Inc, New York, chapter 4, pp. 85–111.
- Yamashita, M. & Konagaya, S. (1990), 'Participation of Cathepsin L into Extensive Softening of the Muscle of Chum Salmon Caught during Spawning Migration', *Nippon Suisan Gakkaishi* **56**(8), 1271–1277.

BIBLIOGRAFI

Yamashita, M. & Konagaya, S. (1991), 'Hydrolytic Action of Salmon Cathepsins B and L to Muscle Structural Proteins in Respect of Muscle Softening', *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**(10), 1917–1922.

A LABOLYTIC dyrkningsslide

Diagrammet benyttet til bestemmelse av mikrobiell status er gitt i Figur A.1. Mikrobiell status ble bestemt ved å sammenlignet dyrkningsssidene med diagrammet, og ble bestemt til CFU/cm².



Figur A.1: Diagram for bestemmelse av mikrobiell status. Fra et analysesett utviklet av LABOLYTIC.

B Drypptap

B.1 Drypptap lagringsforsøk

I tabell B.1 er drypptapet i % bestemt for kjølte, superkjølte og fryste makrellfileter. Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdier \pm standardavvik ($n = 3$). Drypptap er plottet i Figur 3.1. Drypptap ble bestemt av Janna Crobotova.

Tabell B.1: Gjennomsnittsverdier av drypptap \pm standardavvik (SD) ($n=3$) (K0: $n=4$) for kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) prøver for alle uttaksdagene. Verdiene er plottet i Figur 3.1.

Prøve	Uttaks- dag	Drypp \pm SD [%]
K0	0	$3,65 \pm 0,52$
K2	2	$6,09 \pm 0,95$
K5	5	$7,36 \pm 0,69$
K7	7	$7,71 \pm 0,54$
S2	2	$4,77 \pm 0,42$
S5	5	$4,95 \pm 0,67$
S9	9	$5,98 \pm 0,59$
S14	14	$5,65 \pm 0,22$
S19	19	$6,45 \pm 0,63$
F1	33	$7,35 \pm 1,27$

B.2 Væsketap sous vide

Verdier for væsketapet fra makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter er gitt i Tabell B.2. Væsketapet inkluderer både koketap fra varmebehandling og drypptap fra lagring. Væsketapet for sous vide er presentert i Figur 3.22, 3.23 og 3.24. Væsketapet ble kun bestemt i én parallell for hver prøve.

B DRYPPTAP

Tabell B.2: Væsketap for vakuumpakkede makrellfileter varmebehandlet i 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Analysene ble gjort 1, 3 og 7 dager etter varmebehandling. Kontrollprøven er før varmebehandling, dag 0. Væsketapet er gitt i g/g våtvekt og %.

Prøver	Uttaks- dag	Væsketap [g/g vv]	Væsketap [%]
Kontroll	-	0,09	8,54
60-10-1	1	0,08	8,00
60-10-3	3	0,08	8,18
60-10-7	7	0,07	6,55
60-15-1	1	0,09	8,66
60-15-3	3	0,07	7,20
60-15-7	7	0,07	7,38
60-20-1	1	0,10	9,96
60-20-3	3	0,09	8,89
60-20-7	7	0,07	6,76
75-10-1	1	0,10	10,29
75-10-3	3	0,11	10,90
75-10-7	7	0,07	7,33
75-15-1	1	0,11	11,01
75-15-3	3	0,11	11,26
75-15-7	7	0,08	8,43
75-20-1	1	0,13	13,25
75-20-3	3	0,07	7,13
75-20-7	7	0,08	8,38
90-10-1	1	0,08	8,31
90-10-3	3	0,08	7,51
90-10-7	7	0,08	7,57
90-15-1	1	0,11	10,52
90-15-3	3	0,09	9,48
90-15-7	7	0,10	10,13
90-20-1	1	0,13	12,87
90-20-3	3	0,11	11,28
90-20-7	7	0,08	8,11

C Mengde CTF

Gjennomsnittsverdier \pm SD for mengde CTF for hver uttaksdag er gitt i Tabell C.1. Verdiene er fremstilt i Figur 3.2.

Tabell C.1: Gjennomsnittsverdier av mengde cellevevsvæske (CTF) \pm SD (n=4) (K7: n=3) for kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) prøver for alle uttaksdagene. Verdiene er plottet i Figur 3.2.

Prøve	Uttaks- dag	CTF \pm SD [g/g vv]	CTF \pm SD [%]
K1	1	0,072 \pm 0,014	7,21 \pm 1,37
K5	5	0,061 \pm 0,015	6,14 \pm 1,52
K7	7	0,075 \pm 0,042	9,24 \pm 2,65
S1	1	0,092 \pm 0,013	9,22 \pm 1,26
S5	5	0,120 \pm 0,043	12,04 \pm 4,31
S9	9	0,131 \pm 0,023	13,09 \pm 2,29
S14	14	0,141 \pm 0,018	14,08 \pm 1,80
S19	19	0,165 \pm 0,026	16,54 \pm 2,62
F1	33	0,163 \pm 0,017	16,26 \pm 1,68

Rådata for mengde makrell veid ut (våtvekt makrell) og veid mengde CTF, samt beregnet mengde CTF i g/g våtvekt og % av våtvekt er gitt i Tabell C.2. Prøver inkluderer kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter, mens prøvekode er koden hver enkelt pakke med makrellfileter hadde, og for hver prøvekode var det fire fileter nummerert 1-4. For eksempel: K1 tilsvarer kjølte makreller dag 1, og har prøvekode U. Makrellfiletene i pakke U er igjen nummerert U-1 til U-4.

C MENGDE CTF

Tabell C.2: Våtvekt makrell, vekt CTF og mengde CTF for alle kjølte, superkjølte og fryste makrellfileter.

Prøve	Prøve- kode	Våtvekt makrell [g]	Vekt CTF [g]	Mengde CTF	
				[g/g vv]	[%]
K1	U-1	25,2941	1,8041	0,07	7,13
	U-2	23,2640	1,4845	0,06	6,38
	U-3	25,1017	2,3040	0,09	9,18
	U-4	24,8439	1,5323	0,06	6,17
K5	K-1	20,4308	1,5721	0,08	7,69
	K-2	20,7724	1,2008	0,06	5,78
	K-3	20,6042	1,4204	0,07	6,89
	K-4	17,0153	0,7126	0,04	4,19
K7	K08-1	15,2524	0,9685	0,06	6,35
	K08-2	15,0684	1,4793	0,10	9,82
	K08-3	14,9137	0,3125	0,02	2,10
	K08-4	15,1514	1,7495	0,12	11,55
S1	TO1-1	10,1268	0,8091	0,08	7,99
	TO1-2	10,0145	0,8385	0,08	8,37
	TO1-3	10,2150	1,0902	0,11	10,67
	TO1-4	10,1054	0,9957	0,10	9,85
S5	S12-1	15,6543	1,9419	0,12	12,40
	S12-2	15,1348	2,6947	0,18	17,80
	S12-3	15,0998	1,1544	0,08	7,65
	S12-4	15,2041	1,5694	0,10	10,32
S9	S11-1	15,023	1,7023	0,11	11,33
	S11-2	15,1878	2,1525	0,14	14,17
	S11-3	15,1845	2,3984	0,16	15,80
	S11-4	15,1030	1,6689	0,11	11,05
S14	S16-1	14,6122	2,0003	0,14	13,69
	S16-2	14,3409	1,9522	0,14	13,61
	S16-3	15,3654	2,5561	0,17	16,64
	S16-4	15,0083	1,8614	0,12	12,40
S19	S-1	15,1253	1,9951	0,13	13,19
	S-2	15,3184	2,8857	0,19	18,84
	S-3	14,6856	2,3106	0,16	15,73
	S-4	14,8258	2,7270	0,18	18,39
F1	F07-1	15,2261	2,1598	0,14	14,18
	F07-2	14,7565	2,6571	0,18	18,01
	F07-3	15,3160	2,6266	0,17	17,15
	F07-4	14,2048	2,2307	0,16	15,70

D Mikrobiell status

D.1 Mikrobiell status lagringsforsøk

I Tabell D.1 er antall telte kolonier med standardavvik, og omtrentlig CFU/cm² grad av vekst gitt for kjøle (K) og superkjølte (S) makrellfileter, samt for fileter fryst én måned. Antall (#) kolonier er gjennomsnittsverdier fra tre pakker med makrellfileter og to sider av hver dyrkningslide per pakke (n = 6). Antall kolonidannede enheter (CFU) /cm² og grad av vekst ble bestemt ved å sammenligne dyrkningslidene med diagrammet gitt i Figur A.1. For kjølte prøver fra dag 5 og superkjølte prøver fra dag 14 var antall bakteriekolonier for mange til å telles.

Tabell D.1: Mikrobiell vekst på overflaten av kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter. Antall telte kolonier (# kolonier) er gitt som gjennomsnittsverdi \pm standardavvik (SD) (n=6). Omtrentlig CFU/cm² ble bestemt ved å sammenlignet tettheten av kolonier med sammenligningsdiagrammet gitt i Vedlegg A. Det var umulig å telle koloniene utover i lagringsperioden, det er derfor ikke oppgitt noe tall for enkelte prøver.

Prøve	Uttaksdag	# kolonier \pm SD	CFU/cm ²	Vekst
K0	0	48,8 \pm 12,7	2,5	Meget liten
K2	2	66,2 \pm 18,7	12	Liten
K5	5	-	40	Moderat
K7	7	-	100	Kraftig
S2	2	24,3 \pm 3,1	2,5	Meget liten
S5	5	23,8 \pm 11,1	2,5	Meget liten
S9	9	55,5 \pm 22,6	12	Liten
S14	14	-	40	Moderat
S19	19	-	40	Moderat
F1	33	5,7 \pm 2,9	2,5	Meget liten

D.2 Mikrobiell status sous vide

Antall (#) telte kolonier, omtrentlig CFU/cm² og grad av vekst for varmebehandlede makrellfileter er gitt i Tabell D.2. Gjennomsnittsverdiene av antall kolonier er basert på begge sider av en dyrkningslide per vakuumpakke med makrellfileter (n = 2), og CFU/cm² ble bestemt ved å sammenligne dyrkningsliden med diagrammet

D MIKROBIELL STATUS

gitt i Figur A.1. Antall kolonidannede enheter (CFU) /cm² og grad av vekst er presentert i Tabell 3.4.

Tabell D.2: Mikrobiell vekst i varmebehandlede prøver. Antall kolonier (# kolonier) telt er gitt som gjennomsnittsverdi (n=2) og standardavvik (SD) . Omtrentlig CFU/cm² ble bestemt ved å sammenligne tettheten av kolonier med sammenligningsdiagrammet gitt i Vedlegg A.

Prøver	Uttaks- dag	# kolonier ± SD	CFU/cm ²	Vekst
Kontroll	-	4,5 ± 2,1	2,5	Meget liten
60-10-1	1	44 ± 24,0	12	Liten
60-10-3	3	2 ± 1,4	2,5	Meget liten
60-10-7	7	0,5 ± 0,7	2,5	Meget liten
60-15-1	1	0 0	-	Ingen
60-15-3	3	11 ± 8,5	2,5	Meget liten
60-15-7	7	0	-	Ingen
60-20-1	1	4 ± 1,4	2,5	Meget liten
60-20-3	3	30 ± 32,5	2,5	Liten
60-20-7	7	0,5 ± 0,7	2,5	Meget liten
75-10-1	1	0	-	Ingen
75-10-3	3	6 ± 0	-	Ingen
75-10-7	7	0,5 ± 0,7	2,5	Meget liten
75-15-1	1	0	-	Ingen
75-15-3	3	0	-	Ingen
75-15-7	7	0	-	Ingen
75-20-1	1	3 ± 4,2	2,5	Meget liten
75-20-3	3	0	-	Ingen
75-20-7	7	1 ± 1,4	2,5	Meget liten
90-10-1	1	0,5 ± 0,7	2,5	Meget liten
90-10-3	3	1 ± 0	2,5	Meget liten
90-10-7	7	0	-	Ingen
90-15-1	1	0	-	Ingen
90-15-3	3	0	-	Ingen
90-15-7	7	0	-	Ingen
90-20-1	1	0	-	Ingen
90-20-3	3	0	-	Ingen
90-20-7	7	0	-	Ingen

E Fargeparametre sous vide

Fargeparametrene lyshet (L^*), rødhet (a^*) og gulhet (b^*) for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter er gitt i Tabell E.1.

Tabell E.1: Fargeparametrene lyshet (L^*), rødhet (a^*) og gulhet (b^*) for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Fargemåling ble utført 1, 3 og 7 dager etter varmebehandling.

Prøver	Uttaks- dag	L^*	a^*	b^*
Kontroll	-	59,18 ± 3,89	2,46 ± 0,69	8,48 ± 1,14
60-10-1	1	72,29 ± 1,91	2,66 ± 1,47	11,83 ± 1,05
60-10-3	3	72,49 ± 2,58	2,28 ± 1,15	11,99 ± 0,83
60-10-7	7	72,75 ± 1,15	0,99 ± 0,87	12,08 ± 0,69
60-15-1	1	72,40 ± 3,39	2,30 ± 0,46	11,66 ± 0,78
60-15-3	3	73,39 ± 2,36	2,28 ± 0,72	12,14 ± 0,58
60-15-7	7	75,37 ± 2,51	1,33 ± 1,02	13,34 ± 0,53
60-20-1	1	72,78 ± 1,94	2,30 ± 0,30	12,64 ± 0,85
60-20-3	3	73,09 ± 3,04	2,29 ± 0,97	13,30 ± 0,97
60-20-7	7	75,94 ± 1,70	1,77 ± 0,59	13,38 ± 0,33
75-10-1	1	75,31 ± 1,90	2,30 ± 0,98	11,10 ± 1,02
75-10-3	3	75,32 ± 2,87	2,39 ± 0,58	11,94 ± 0,48
75-10-7	7	75,71 ± 1,80	2,62 ± 0,54	14,23 ± 0,83
75-15-1	1	75,53 ± 2,19	2,16 ± 0,62	11,37 ± 0,49
75-15-3	3	75,50 ± 3,77	2,45 ± 0,62	12,10 ± 0,83
75-15-7	7	76,81 ± 2,12	1,85 ± 0,31	13,28 ± 0,38
75-20-1	1	75,62 ± 3,91	1,95 ± 0,73	12,12 ± 0,82
75-20-3	3	76,45 ± 1,99	2,49 ± 0,96	12,61 ± 0,70
75-20-7	7	76,81 ± 2,89	2,16 ± 0,32	13,08 ± 0,39
90-10-1	1	77,95 ± 1,41	1,43 ± 0,37	12,41 ± 0,61
90-10-3	3	78,96 ± 0,72	1,95 ± 0,89	12,36 ± 0,79
90-10-7	7	81,17 ± 1,40	2,55 ± 0,50	12,20 ± 0,57
90-15-1	1	77,93 ± 1,23	1,52 ± 0,82	12,60 ± 0,98
90-15-3	3	80,01 ± 1,02	2,37 ± 0,73	13,25 ± 0,44
90-15-7	7	82,10 ± 1,08	2,60 ± 0,19	13,20 ± 0,74
90-20-1	1	78,19 ± 1,54	1,72 ± 0,43	12,97 ± 0,86
90-20-3	3	80,06 ± 0,91	1,77 ± 0,43	13,66 ± 0,44
90-20-7	7	83,71 ± 1,04	2,72 ± 0,43	13,42 ± 0,84

F Proteinløselighet

F.1 Proteinløselighet lagringsforsøk

I Tabell F.1 er mengde vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner for kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter gitt. Mengde løste proteiner er gitt som gjennomsnittsverdier \pm SEM ($n = 12$). Verdiene er plottet i Figur 3.8 og 3.9. Data og flere beregninger er gitt i Excelark, se Vedlegg L.

Tabell F.1: Mengde vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner i kjølte (K) og superkjølte (S) prøver, samt prøver fryst én måned (F). Mengde WSP og SSP er gitt i % av våtvekt og er presenter som gjennomsnittsverdi per uttaksdag \pm SEM ($n = 12$). Verdiene er plottet i Figur 3.8 og 3.9.

Prøve	Uttaks- dag	WSP \pm SEM [%]	SSP \pm SEM [%]
K1	1	9,18 \pm 0,46	11,71 \pm 0,31
K5	5	7,96 \pm 0,16	9,31 \pm 0,63
K7	7	8,34 \pm 0,16	9,59 \pm 0,18
S1	1	8,39 \pm 0,22	10,68 \pm 0,30
S5	5	9,23 \pm 0,11	7,56 \pm 0,40
S9	9	8,18 \pm 0,11	3,82 \pm 0,23
S14	14	7,35 \pm 0,23	2,98 \pm 0,25
S19	19	6,55 \pm 0,21	1,58 \pm 0,11
F1	33	7,49 \pm 0,15	5,66 \pm 0,42

For bestemmelse av proteinløselighet ble innhold av løste proteiner bestemt ved BioRad-metoden. Ulike konsentrasjoner av bovin gamma globulin (BGG) ble brukt som standard og proteininnhold ble bestemt etter lingingen ($y = ax + b$) funnet ved lineær regresjon. y er absorbansverdi målt for hver prøve og x er tilhørende proteinkonsentrasjon [mg/mL]. Verdiene a og b ble bestemt ved å måle absorban- sen til gitte konsentrasjoner av BGG hver uttaksdag av lagrede makrellfileter, og er gitt i Tabell F.2. Proteinkonsentrasjonen til prøvene ble bestemt etter Ligning (F.1).

$$[\text{Protein}] = \frac{abs - b}{a} \quad (\text{F.1})$$

Tabell F.2: Standardkurve funnet ved lineær regresjon for bestemmelse av proteinløselighet i lagrede makrellfileter ved BioRad-metoden. Ulike konsentrasjoner av bovin gamma globulin (BGG) ble brukt som standard. $y = ax + b$, der y er absorbansverdi og x er proteinkonsentrasjon [mg/mL]. R^2 er regresjonskoeffisienten.

Uttaksdag	a	b	R^2
1	0,5000	0,0417	0,9968
5	0,4730	0,0061	0,9969
7	0,5368	0,0170	0,9977
9	0,5509	0,0198	0,9950
14	0,5391	0,0666	0,9993
19	0,5394	0,0274	0,9982
33	0,5813	0,0359	0,9978

Målte absorbansverdier og beregnet proteinkonsentrasjon, samt våtvekt makrell veid ut og fortynning for alle lagrede makrellfileter er gitt for vannløselige proteiner (WSP) fra kjølte og superkjølte makrellfileter er gitt i henholdsvis Tabell F.3 og F.4. Data for fryste prøver er også gitt i Tabell F.3. Proteinkonsentrasjon i mg/mL ble bestemt i 100 mL homogenat av vannløselige proteiner for alle prøvene. Prøvekoder er koder på makrellpakkene og hver filet er nummerert fra 1-4. Proteinkonsentrasjon i hvert rør ble bestemt etter Ligning (F.1), mens proteinkonsentrasjon i prøven ble funnet ved å gange opp konsentrasjonen i hvert rør med fortynningen.

Målte absorbansverdier og beregnet proteinkonsentrasjon, samt våtvekt makrell veid ut og fortynning for alle lagrede makrellfileter er gitt for saltløselige proteiner (SSP) fra kjølte og superkjølte makrellfileter er gitt i henholdsvis Tabell F.5 og F.6. Data for fryste prøver er også gitt i Tabell F.3. Proteinkonsentrasjon i mg/mL ble bestemt i 100 mL homogenat av saltløselige proteiner for alle prøvene. Prøvekoder er koder på makrellpakkene og hver filet er nummerert fra 1-4. Proteinkonsentrasjon i hvert rør ble bestemt etter Ligning (F.1), mens proteinkonsentrasjon i prøven ble funnet ved å gange opp konsentrasjonen i hvert rør med fortynningen. Mengde WSP og mengde SSP i % av våtvekt ble beregnet etter Ligning (F.2). Volum homogenat var 100 mL for alle prøvene.

$$\text{Protein [\% av våtvekt]} = \frac{\text{Prot.kons [mg/mL]} \cdot 100 \text{ mL}}{1000 \text{ [mg/g]} \cdot \text{Våtvekt [g]}} \cdot 100 \% \quad (\text{F.2})$$

Tabell F.3: Rådata for bestemmelse av konsentrasjon av vannløselige proteiner (WSP) i kjølte (K) og fryste (F) makrellfileter. Våtvekt makrell [g], fortynning ved BioRad, absorpsjonsmålinger (Abs), protein i rør [mg/mL] og proteinkonsentrasjon i hver prøve. Proteinkonsentrasjon ble beregnet ut fra lineær regresjon av absorpsjons til BGG med kjente konsentrasjoner, gitt i Tabell F.2.

Prøve	Prøvekode	Våtvekt [g]	Fortynning	Abs			Protein i rør [mg/mL]			Prot.kons. [mg/mL]	
				#1	#2	#3	#1	#2	#3		Gj.snitt
K1	U-1	4,4200	5	0,388	0,404	0,374	0,693	0,725	0,665	0,694	3,469
	U-2	4,5260	5	0,508	0,518	0,541	0,933	0,953	0,999	0,961	4,806
	U-3	4,5552	5	0,510	0,529	0,521	0,937	0,975	0,959	0,957	4,783
	U-4	4,3264	5	0,373	0,377	0,382	0,663	0,671	0,681	0,671	3,356
K5	K-1	4,1714	5	0,315	0,299	0,325	0,653	0,619	0,674	0,649	3,244
	K-2	4,3383	5	0,325	0,348	0,322	0,674	0,723	0,668	0,688	3,442
	K-3	4,4345	5	0,361	0,364	0,388	0,750	0,757	0,807	0,771	3,857
	K-4	4,1628	5	0,304	0,303	0,288	0,630	0,628	0,596	0,618	3,089
K7	K08-1	4,6838	5	0,448	0,491	0,457	0,803	0,883	0,820	0,835	4,176
	K08-2	4,6209	5	0,428	0,435	0,445	0,766	0,779	0,797	0,781	3,903
	K08-3	4,4190	5	0,399	0,427	0,421	0,712	0,764	0,753	0,743	3,713
F1	K08-4	4,7522	5	0,386	0,424	0,406	0,687	0,758	0,725	0,723	3,617
	F07-1	4,5097	5	0,424	0,450	0,484	0,668	0,712	0,771	0,717	3,585
	F07-2	4,3560	5	0,411	0,424	0,435	0,645	0,668	0,687	0,666	3,332
	F07-3	4,4117	5	0,377	0,390	0,375	0,587	0,609	0,583	0,593	2,965
F07-4	4,5146	5	0,416	0,452	0,443	0,654	0,716	0,700	0,690	3,450	

F PROTEINLØSELIGHET

Tabell F.4: Rådata for bestemmelse av konsentrasjon av vannløselige proteiner (WSP) i superkjølte (S) makrellfileter. Våttvekt makrell [g], fortynning ved BioRad, absorpsjonsmålinger (Abs), protein i rør [mg/mL] og proteinkonsentrasjon i hver prøve. Protein konsentrasjon ble beregnet ut fra lineær regresjon av absorpsjons til BGG med kjente konsentrasjoner, gitt i Tabell F.2.

Uttaks- dag	Prøve- kode	Våttvekt [g]	Fortynning	Abs			Protein i rør [mg/mL]			Prot.kons. [mg/mL]	
				#1	#2	#3	#1	#2	#3		Gj.snitt
S1	T01-1	4,0140	5	0,371	0,421	0,397	0,659	0,759	0,711	0,709	3,546
	T01-2	4,4462	5	0,365	0,368	0,392	0,647	0,653	0,701	0,667	3,333
	T01-3	4,2411	5	0,409	0,453	0,432	0,735	0,823	0,781	0,779	3,896
	T01-4	4,2220	5	0,362	0,360	0,421	0,641	0,637	0,759	0,679	3,393
S5	S12-1	4,3142	5	0,353	0,393	0,366	0,733	0,818	0,761	0,771	3,854
	S12-2	4,2350	5	0,364	0,373	0,366	0,757	0,776	0,761	0,764	3,822
	S12-3	4,0171	5	0,342	0,333	0,459	0,710	0,691	0,958	0,786	3,931
	S12-4	4,1175	5	0,350	0,358	0,381	0,727	0,744	0,793	0,755	3,773
S9	S11-1	4,2982	5	0,366	0,398	0,419	0,628	0,687	0,725	0,680	3,399
	S11-2	4,1103	5	0,414	0,402	0,416	0,716	0,694	0,719	0,710	3,548
	S11-3	4,8290	5	0,444	0,475	0,468	0,770	0,826	0,814	0,803	4,017
	S11-4	4,4842	5	0,378	0,420	0,425	0,650	0,726	0,736	0,704	3,520
S14	S16-1	4,7860	5	0,450	0,506	0,508	0,711	0,815	0,819	0,782	3,908
	S16-2	4,8073	5	0,363	0,417	0,388	0,550	0,650	0,596	0,599	2,993
	S16-3	4,7197	5	0,431	0,455	0,463	0,676	0,720	0,735	0,711	3,553
	S16-4	4,1834	5	0,388	0,424	0,399	0,596	0,663	0,617	0,625	3,126
S19	S-1	4,1938	5	0,281	0,287	0,285	0,470	0,481	0,478	0,476	2,382
	S-2	4,9210	5	0,359	0,378	0,365	0,615	0,650	0,626	0,630	3,151
	S-3	4,2232	5	0,326	0,316	0,347	0,554	0,535	0,593	0,560	2,802
	S-4	4,6614	5	0,393	0,386	0,430	0,678	0,665	0,746	0,696	3,482

Tabell F.5: Rådata for bestemmelse av konsentrasjon av saltløselige proteiner (SSP) i kjølte (K) og fryste (F) makrellfileter. Våtvekt makrell [g], fortynning ved BioRad, absorbanmålinger (Abs), protein i rør [mg/mL] og proteinkonsentrasjon i hver prøve. Proteinkonsentrasjon ble beregnet ut fra lineær regresjon av absorbens til BGG med kjente konsentrasjoner, gitt i Tabell F.2.

Prøve	Prøve- kode	Våtvekt [g]	Fortynning	Abs			Protein i rør [mg/mL]			Prot.kons. [mg/mL]	
				#1	#2	#3	#1	#2	#3		Gj.snitt
K1	U-1	4,4200	5	0,513	0,520	0,477	0,943	0,957	0,871	0,923	4,616
	U-2	4,5260	5	0,591	0,637	0,618	1,099	1,191	1,153	1,147	5,736
	U-3	4,5552	5	0,597	0,604	0,637	1,111	1,125	1,191	1,142	5,709
	U-4	4,3264	5	0,496	0,550	0,532	0,909	1,017	0,981	0,969	4,843
K5	K-1	4,1714	5	0,413	0,359	0,149	0,860	0,746	0,302	0,636	3,181
	K-2	4,3383	5	0,310	0,290	0,329	0,642	0,600	0,683	0,642	3,209
	K-3	4,4345	5	0,468	0,471	0,579	0,977	0,983	1,211	1,057	5,284
	K-4	4,1628	5	0,344	0,402	0,490	0,714	0,837	1,023	0,858	4,291
K7	K08-1	4,6838	5	0,521	0,542	0,532	0,939	0,978	0,959	0,959	4,794
	K08-2	4,6209	5	0,469	0,479	0,452	0,842	0,861	0,810	0,838	4,188
	K08-3	4,4190	5	0,512	0,431	0,530	0,922	0,771	0,956	0,883	4,415
	K08-4	4,7522	5	0,481	0,475	0,484	0,864	0,853	0,870	0,862	4,312
F1	F07-1	4,5097	5	0,381	0,428	0,377	0,594	0,674	0,587	0,618	3,091
	F07-2	4,3560	5	0,353	0,360	0,400	0,545	0,558	0,626	0,576	2,882
	F07-3	4,4117	5	0,331	0,317	0,311	0,508	0,484	0,473	0,488	2,441
	F07-4	4,5146	5	0,209	0,250	0,224	0,298	0,368	0,324	0,330	1,649

F PROTEINLØSELIGHET

Tabell F.6: Rådata for bestemmelse av konsentrasjon av saltløselige proteiner (SSP) i superkjølte (S) makrellfleter. Våtvekt makrell [g], fortynning ved BioRad, absorpsjonsmålinger (Abs), protein i rør [mg/mL] og proteinkonsentrasjon i hver prøve. Protein konsentrasjon ble beregnet ut fra lineær regresjon av absorpsjons til BGG med kjente konsentrasjoner, gitt i Tabell F.2.

Uttaks- dag	Prøve- kode	Våtvekt [g]	Fortynning	Abs			Protein i rør [mg/mL]			Prot.kons. [mg/mL]	
				#1	#2	#3	#1	#2	#3		Gj.snitt
S1	T01-1	4,0140	5	0,487	0,486	0,466	0,891	0,889	0,849	0,876	4,379
	T01-2	4,4462	5	0,463	0,481	0,455	0,843	0,879	0,827	0,849	4,246
	T01-3	4,2411	5	0,535	0,555	0,558	0,987	1,027	1,033	1,015	5,076
	T01-4	4,2220	5	0,451	0,493	0,486	0,819	0,903	0,889	0,870	4,349
S5	S12-1	4,3142	5	0,256	0,256	0,552	0,528	0,528	1,154	0,737	3,685
	S12-2	4,2350	5	0,253	0,260	0,488	0,522	0,537	1,019	0,693	3,463
	S12-3	4,0171	5	0,112	0,107	0,425	0,224	0,213	0,886	0,441	2,205
	S12-4	4,1175	5	0,260	0,248	0,448	0,537	0,511	0,934	0,661	3,304
S9	S11-1	4,2982	5	0,167	0,178	0,183	0,267	0,287	0,296	0,284	1,418
	S11-2	4,1103	5	0,188	0,168	0,191	0,305	0,269	0,311	0,295	1,475
	S11-3	4,8290	5	0,297	0,282	0,283	0,503	0,476	0,478	0,486	2,428
	S11-4	4,4842	5	0,194	0,175	0,191	0,316	0,282	0,311	0,303	1,515
S14	S16-1	4,7860	2	0,541	0,603	0,515	0,880	0,995	0,832	0,902	1,804
	S16-2	4,8073	2	0,366	0,390	0,364	0,555	0,600	0,552	0,569	1,138
	S16-3	4,7197	2	0,323	0,347	0,340	0,476	0,520	0,507	0,501	1,002
	S16-4	4,1834	2	0,484	0,484	0,475	0,774	0,774	0,758	0,769	1,537
S19	S-1	4,1938	1	0,268	0,275	0,262	0,446	0,459	0,435	0,447	0,447
	S-2	4,9210	2	0,233	0,230	0,268	0,381	0,376	0,446	0,401	0,802
	S-3	4,2232	2	0,199	0,202	0,220	0,318	0,324	0,357	0,333	0,666
	S-4	4,6614	2	0,278	0,293	0,278	0,465	0,492	0,465	0,474	0,948

F.2 Proteinløselighet sous vide

I Tabell F.8 er mengde vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter med påfølgende kjølelagring 1, 3 og 7 dager gitt. Mengde løste proteiner er gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD ($n = 3$). Verdiene er plottet i Figur 3.29 og 3.30. Data og flere beregninger er gitt i Excelark, se Vedlegg L.

For bestemmelse av proteinløselighet ble innhold av løste proteiner bestemt ved BioRad-metoden. Ulike konsentrasjoner av bovin gamma globulin (BGG) ble brukt som standard og proteininnhold ble bestemt etter lingen ($y = ax + b$) funnet ved lineær regresjon. y er absorbansverdi målt for hver prøve og x er tilhørende proteinkonsentrasjon [mg/mL]. Verdiene a og b ble bestemt ved å måle absorbansen til gitte konsentrasjoner av BGG hver uttaksdag for varmebehandlede prøver, er gitt i Tabell F.7. Proteinkonsentrasjonen til prøvene ble bestemt etter Ligning (F.3).

$$[\text{Protein}] = \frac{abs - b}{a} \quad (\text{F.3})$$

Tabell F.7: Standardkurve funnet ved lineær regresjon for bestemmelse av proteinløselighet i varmebehandlede makrellfileter ved BioRad-metoden. Ulike konsentrasjoner av bovin gamma globulin (BGG) ble brukt som standard. $y = ax + b$, der y er absorbansverdi og x er proteinkonsentrasjon [mg/mL]. R^2 er regresjonskoeffisienten.

Uttaksdag	a	b	R^2
60 og 70°C			
1	0,5377	0,0295	0,9981
3	0,5173	0,0439	0,9996
7	0,5290	0,0314	0,9964
90°C			
1	0,5409	0,0637	0,9960
3	0,5443	0,0623	0,9976
7	0,4859	0,0521	0,9963

Tabell F.8: Mengde vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner i makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter. Varmebehandlede fileter ble analysert etter 1, 3 og 7 dager på is på kjølerom. Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdi \pm SD ($n = 3$).

Prøve	Uttaks- dag	WSP \pm SD [%]	SSP \pm SD [%]
60-10-1	1	1,45 \pm 0,04	0,63 \pm 0,02
60-10-3	3	1,07 \pm 0,01	0,71 \pm 0,02
60-10-7	7	0,76 \pm 0,03	0,73 \pm 0,06
60-15-1	1	1,04 \pm 0,03	0,62 \pm 0,04
60-15-3	3	0,84 \pm 0,04	0,53 \pm 0,04
60-15-7	7	0,69 \pm 0,01	0,51 \pm 0,04
60-20-1	1	0,97 \pm 0,06	0,41 \pm 0,04
60-20-3	3	0,86 \pm 0,04	0,48 \pm 0,03
60-20-7	7	0,69 \pm 0,05	0,57 \pm 0,07
75-10-1	1	0,38 \pm 0,01	0,49 \pm 0,01
75-10-3	3	0,35 \pm 0,01	0,28 \pm 0,03
75-10-7	7	0,37 \pm 0,07	0,24 \pm 0,04
75-15-1	1	0,32 \pm 0,02	0,20 \pm 0,05
75-15-3	3	0,31 \pm 0,02	0,18 \pm 0,00
75-15-7	7	0,24 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02
75-20-1	1	0,35 \pm 0,05	0,25 \pm 0,05
75-20-3	3	0,28 \pm 0,05	0,22 \pm 0,04
75-20-7	7	0,18 \pm 0,02	0,28 \pm 0,09
90-10-1	1	0,17 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
90-10-3	3	0,19 \pm 0,00	0,18 \pm 0,01
90-10-7	7	0,17 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01
90-15-1	1	0,20 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00
90-15-3	3	0,16 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02
90-15-7	7	0,24 \pm 0,02	0,19 \pm 0,00
90-20-1	1	0,17 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
90-20-3	3	0,15 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01
90-20-7	7	0,22 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01

Målte absorbanverdier og beregnet proteinkonsentrasjon, samt våtvekt makrell veid ut og fortynning for alle lagrede makrellfileter er gitt for vannløselige proteiner (WSP) fra makrellfileter varmebehandlet ved 60 og 75 °C er gitt i Tabell F.9, mens konsentrasjon av WSP for 90°C-prøvene er gitt i Tabell F.10. Prøve 60-10-1* og 75-10-1* ble benyttet til bestemmelse av karbonylinnhold, og er ikke inkludert i mengde WSP i Tabell F.8. Proteinkonsentrasjon i mg/mL ble bestemt i 100 mL homogenat av vannløselige proteiner for alle prøvene. Proteinkonsentrasjon i hvert rør ble bestemt etter Ligning (F.3), mens proteinkonsentrasjon i prøven ble funnet ved å gange opp konsentrasjonen i hvert rør med fortynningen.

Målte absorbanverdier og beregnet proteinkonsentrasjon, samt våtvekt makrell veid ut og fortynning for alle lagrede makrellfileter er gitt for saltløselige proteiner (SSP) fra makrellfileter varmebehandlet ved 60 og 75 °C er gitt i Tabell F.11, mens konsentrasjon av WSP for 90°C-prøvene er gitt i Tabell F.12. Prøve 60-10-1* og 75-10-1* ble benyttet til bestemmelse av karbonylinnhold, og er ikke inkludert i mengde SSP i Tabell F.8. Proteinkonsentrasjon i mg/mL ble bestemt i 100 mL homogenat av saltløselige proteiner for alle prøvene. Proteinkonsentrasjon i hvert rør ble bestemt etter Ligning (F.3), mens proteinkonsentrasjon i prøven ble funnet ved å gange opp konsentrasjonen i hvert rør med fortynningen. Mengde WSP og mengde SSP i % av våtvekt ble beregnet etter Ligning (F.4). Volum homogenat var 100 mL for alle prøvene.

$$\text{Protein [\% av våtvekt]} = \frac{\text{Prot.kons [mg/mL]} \cdot 100 \text{ mL}}{1000 \text{ [mg/g]} \cdot \text{Våtvekt [g]}} \cdot 100 \% \quad (\text{F.4})$$

Tabell F.9: Rådata for bestemmelse av konsentrasjon av vannløselige proteiner (WSP) i makrellfleter varmebehandlet ved 60 og 75°C i 10, 15 og 20 minutter med prøventrak etter 1, 3 og 7 dager kjølelagring. Våtvekt makrell [g], fortynning ved BioRad, absorbanmålinger (Abs), protein i rør [mg/mL] og proteinkonsentrasjon i hver prøve. Protein konsentrasjon ble beregnet ut fra lineær regresjon av absorban til BGG med kjente konsentrasjoner, gitt i Tabell F.7.

Prøve	Våtvekt [g]	Fortynning	Abs			Protein i rør [mg/mL]			Prot.kons. [mg/mL]	
			#1	#2	#3	#1	#2	#3		
60-10-1	4,0775	1	0,353	0,336	0,352	0,602	0,570	0,600	0,590	0,590
60-15-1	4,1609	1	0,267	0,268	0,254	0,442	0,444	0,417	0,434	0,434
60-20-1	4,2466	1	0,253	0,236	0,263	0,416	0,384	0,434	0,411	0,411
75-10-1	4,4341	1	0,123	0,120	0,119	0,174	0,168	0,166	0,169	0,169
75-15-1	4,1595	1	0,103	0,098	0,105	0,137	0,127	0,140	0,135	0,135
75-20-1	4,1986	1	0,097	0,115	0,117	0,125	0,159	0,163	0,149	0,149
60-10-3	8,1138	1	0,487	0,496	0,498	0,857	0,874	0,878	0,869	0,869
60-15-3	8,1056	1	0,411	0,401	0,382	0,710	0,690	0,654	0,684	0,684
60-20-3	8,0514	1	0,387	0,398	0,421	0,663	0,684	0,729	0,692	0,692
75-10-3	10,0409	1	0,227	0,217	0,226	0,354	0,335	0,352	0,347	0,347
75-15-3	10,2913	1	0,197	0,215	0,210	0,296	0,331	0,321	0,316	0,316
75-20-3	10,1386	1	0,165	0,197	0,218	0,234	0,296	0,337	0,289	0,289
60-10-7	10,9831	1	0,495	0,470	0,456	0,876	0,829	0,803	0,836	0,836
60-15-7	10,4207	1	0,418	0,414	0,410	0,731	0,723	0,716	0,723	0,723
60-20-7	10,5869	1	0,426	0,385	0,436	0,746	0,668	0,765	0,726	0,726
75-10-7	11,3501	1	0,256	0,216	0,296	0,425	0,349	0,500	0,425	0,425
75-15-7	11,2938	1	0,188	0,184	0,157	0,296	0,288	0,237	0,274	0,274
75-20-7	11,3258	1	0,138	0,150	0,130	0,201	0,224	0,186	0,204	0,204

Tabell F.10: Rådata for bestemmelse av konsentrasjon av vannløselige proteiner (WSP) i makrellfileter varmebehandlet ved 90°C i 10, 15 og 20 minutter med prøvettak etter 1, 3 og 7 dager kjølelagring. Prøvene 60-10-1* og 70-10-1* ble benyttet til bestemmelse av karbonylinnhold (Vedlegg H.2), og er ikke inkludert i mengde WSP fra dag 1. Våtvekt makrell [g], fortykning ved BioRad, absorpsjonsmålinger (Abs), protein i rør [mg/mL] og proteinkonsentrasjon i hver prøve. Proteinkonsentrasjon ble beregnet ut fra lineær regresjon av absorpsjon til BGG med kjente konsentrasjoner, gitt i Tabell F.7.

Prøve	Våtvekt [g]	Fortynning	Abs			Protein i rør [mg/mL]			Gj.snitt [mg/mL]	Prot.kons. [mg/mL]
			#1	#2	#3	#1	#2	#3		
60-10-1*	15,1872	2	0,611	0,584	0,566	1,012	0,962	0,929	0,967	1,935
75-10-1*	15,3784	1	0,303	0,300	0,275	0,442	0,437	0,391	0,423	0,423
90-10-1	25,3914	1	0,303	0,296	0,284	0,442	0,429	0,407	0,426	0,426
90-15-1	25,4622	1	0,365	0,336	0,332	0,557	0,503	0,496	0,519	0,519
90-20-1	25,2819	1	0,318	0,288	0,287	0,470	0,415	0,413	0,433	0,433
90-10-3	29,9959	1	0,370	0,374	0,376	0,565	0,573	0,576	0,571	0,571
90-15-3	30,3399	1	0,301	0,334	0,336	0,438	0,499	0,503	0,480	0,480
90-20-3	30,5890	1	0,366	0,287	0,308	0,558	0,413	0,451	0,474	0,474
90-10-7	33,7745	1	0,322	0,339	0,328	0,555	0,590	0,568	0,571	0,571
90-15-7	30,6418	1	0,437	0,405	0,380	0,792	0,726	0,675	0,731	0,731
90-20-7	30,8153	1	0,383	0,383	0,361	0,681	0,681	0,636	0,666	0,666

F PROTEINLØSELIGHET

Tabell F.11: Rådata for bestemmelse av konsentrasjon av vannløselige proteiner (WSP) i makrellfleter varmebehandlet ved 60 og 75°C i 10, 15 og 20 minutter med prøventak etter 1, 3 og 7 dager kjølelagring. Våtvekt makrell [g], fortynning ved BioRad, absorbanmålinger (Abs), protein i rør [mg/mL] og proteinkonsentrasjon i hver prøve. Protein konsentrasjon ble beregnet ut fra lineær regresjon av absorban til BGG med kjente konsentrasjoner, gitt i Tabell F.7.

Prøve	Våtvekt [g]	Fortynning	Abs			Protein i rør [mg/mL]			Prot.kons. [mg/mL]	
			#1	#2	#3	#1	#2	#3		Gj.snitt
60-10-1	4,0775	1	0,165	0,166	0,173	0,252	0,254	0,267	0,258	0,258
60-15-1	4,1609	1	0,168	0,160	0,178	0,258	0,243	0,276	0,259	0,259
60-20-1	4,2466	1	0,113	0,131	0,123	0,155	0,189	0,174	0,173	0,173
75-10-1	4,4341	1	0,146	0,144	0,147	0,217	0,213	0,218	0,216	0,216
75-15-1	4,1595	1	0,066	0,086	0,074	0,068	0,105	0,083	0,085	0,085
75-20-1	4,1986	1	0,076	0,082	0,097	0,086	0,098	0,125	0,103	0,103
60-10-3	8,1138	1	0,331	0,342	0,347	0,555	0,576	0,586	0,572	0,572
60-15-3	8,1056	1	0,253	0,284	0,263	0,404	0,464	0,424	0,431	0,431
60-20-3	8,0514	1	0,228	0,252	0,250	0,356	0,402	0,398	0,386	0,386
75-10-3	10,0409	1	0,180	0,177	0,205	0,263	0,257	0,311	0,277	0,277
75-15-3	10,2913	1	0,138	0,138	0,137	0,182	0,182	0,180	0,181	0,181
75-20-3	10,1386	1	0,146	0,150	0,185	0,197	0,205	0,273	0,225	0,225
60-10-7	10,9831	1	0,492	0,444	0,425	0,871	0,780	0,744	0,798	0,798
60-15-7	10,4207	1	0,288	0,320	0,333	0,485	0,545	0,570	0,534	0,534
60-20-7	10,5869	1	0,344	0,318	0,390	0,591	0,542	0,678	0,603	0,603
75-10-7	11,3501	1	0,188	0,191	0,152	0,296	0,302	0,228	0,275	0,275
75-15-7	11,2938	1	0,154	0,149	0,171	0,232	0,222	0,264	0,239	0,239
75-20-7	11,3258	1	0,136	0,234	0,223	0,198	0,383	0,362	0,314	0,314

Tabell F.12: Rådata for bestemmelse av konsentrasjon av saltløselige proteiner (SSP) i makrellfileter varmebehandlet ved 90°C i 10, 15 og 20 minutter med prøveuttak etter 1, 3 og 7 dager kjølelagring. Prøvene 60-10-1* og 70-10-1* ble benyttet til bestemmelse av karbonylinnhold (Vedlegg H.2), og er ikke inkludert i mengde SSP fra dag 1. Våtvekt makrell [g], fortynning ved BioRad, absorpsjonsmålinger (Abs), protein i rør [mg/mL] og protein-konsentrasjon i hver prøve. Proteinkonsentrasjon ble beregnet ut fra lineær regresjon av absorpsjon til BGG med kjente konsentrasjoner, gitt i Tabell F.7.

Prøve	Våtvekt [g]	Fortynning			Abs			Protein i rør [mg/mL]			Prot.kons. [mg/mL]
		#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	
60-10-1*	15,1872	1	0,600	0,658	0,659	0,992	1,099	1,101	1,064	1,064	1,064
75-10-1*	15,3784	1	0,291	0,286	0,313	0,420	0,411	0,461	0,431	0,431	0,431
90-10-1	25,3914	1	0,279	0,271	0,258	0,398	0,383	0,359	0,380	0,380	0,380
90-15-1	25,4622	1	0,275	0,277	0,278	0,391	0,394	0,396	0,394	0,394	0,394
90-20-1	25,2819	1	0,277	0,270	0,263	0,394	0,381	0,368	0,381	0,381	0,381
90-10-3	29,9959	1	0,371	0,351	0,364	0,567	0,530	0,554	0,551	0,551	0,551
90-15-3	30,3399	1	0,287	0,285	0,330	0,413	0,409	0,492	0,438	0,438	0,438
90-20-3	30,5890	1	0,284	0,301	0,292	0,407	0,438	0,422	0,423	0,423	0,423
90-10-7	33,7745	1	0,340	0,292	0,321	0,592	0,494	0,553	0,546	0,546	0,546
90-15-7	30,6418	1	0,342	0,340	0,337	0,597	0,592	0,586	0,592	0,592	0,592
90-20-7	30,8153	1	0,339	0,368	0,342	0,590	0,650	0,597	0,612	0,612	0,612

G Katepsin B+L-lignende aktivitet

G.1 Enzymaktivitet i homogenat

I Tabell G.1 er økning i intensitet ($\Delta\text{int.}$), $\Delta\text{int.}/(\text{mg protein} \cdot \text{min})$ og $\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt} \cdot \text{min})$ gitt som standardverdier \pm SEM ($n = 12, 11, 9$) for homogenat av vannløselige proteiner fra kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter. $\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt} \cdot \text{min})$ for kjølte og superkjølte makrellfileter er plottet i Figur 3.13, og $\Delta\text{int.}/(\text{mg protein} \cdot \text{min})$ er plottet i Figur G.1. Data og flere beregninger er gitt i Excelark, se Vedlegg L.

Tabell G.1: Økning i intensitet ($\Delta\text{int.}$), økning i intensitet per mg protein og minutt inkubasjonstid ($\Delta\text{int.}/(\text{mg prot.} \cdot \text{min})$) og økning i intensitet per g våtvekt og minutter ($\Delta\text{int.}/(\text{g vv} \cdot \text{min})$) for vannløselig homogenat av kjølte (K), superkjølte (S) makrellfileter, samt prøver fryst én måned (F). Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdi \pm SEM ($n=12$, S14: $n=11$, F1: $n=9$).

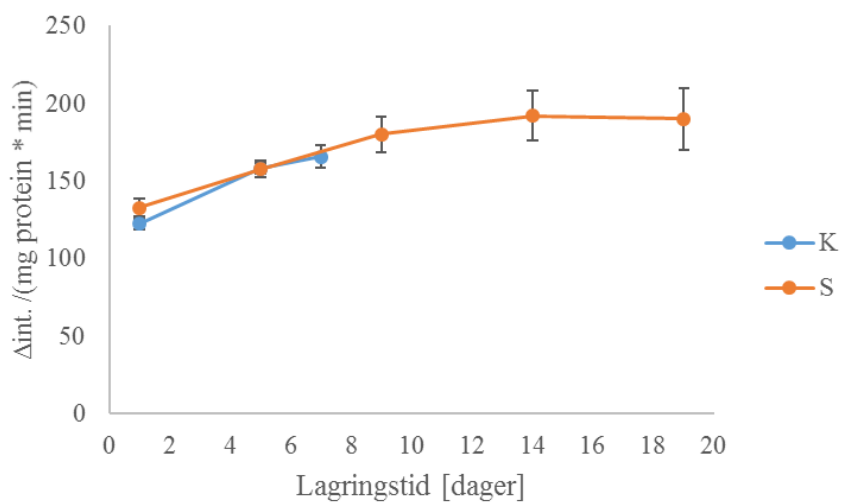
Prøve	Uttaks- dag	$\Delta\text{int.}$	\pm SEM	$\Delta\text{int.}/$ (mg prot.*min)	\pm SEM	$\Delta\text{int.}/$ (g vv*min)	\pm SEM
K1	1	736	± 14	122	± 3	11003	± 195
K5	5	804	± 14	158	± 3	12527	± 208
K7	7	950	± 37	166	± 7	13662	± 481
S1	1	709	± 42	133	± 6	11186	± 672
S5	5	908	± 28	158	± 5	14531	± 503
S9	9	986	± 79	180	± 11	14823	± 1110
S14	14	957	± 56	192	± 16	13779	± 703
S19	19	811	± 46	190	± 20	12158	± 899
F1	33	711	± 36	146	± 12	10724	± 572

$\Delta\text{int.}$, $\Delta\text{int.}/(\text{mg protein} \cdot \text{min})$ og $\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt} \cdot \text{min})$ ble beregnet etter henholdsvis Ligning (G.1), (G.2) og (G.3) for alle prøvene, og gjennomsnittsverdiene er gitt i Tabell G.1. Int. er målt intensitet til prøven, $\text{Int}_{\text{blank}}$ er intensitet til blankprøven, proteinkonsentrasjon er konsentrasjonen bestemt ved BioRad-metoden, V_{kyvette} er volum kyvette, $t_{\text{ink.}}$ er inkuberingstid med substrat og $V_{\text{hom.}}$ er volum homogenat. Proteinkonsentrasjon og våtvekt makrell for hver prøve er gitt i Tabell F.3, F.4, F.5 og F.6. Volum homogenat var 100 mL for alle prøvene.

$$\Delta\text{int.} = (\text{Int.} - \text{Int}_{\text{blank}}) \cdot \text{Fortynning} \quad (\text{G.1})$$

$$\frac{\Delta \text{int.}}{\text{mg prot.} \cdot \text{min}} = \frac{\Delta \text{int.}}{\text{Prot.kons.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] \cdot V_{\text{kyvette}} [\text{mL}] \cdot t_{\text{ink.}} [\text{min}]} \quad (\text{G.2})$$

$$\frac{\Delta \text{int.}}{\text{g vv} \cdot \text{min}} = \frac{\Delta \text{int.} \cdot V_{\text{hom.}} [\text{mL}]}{V_{\text{tvekt}} [\text{g}] \cdot V_{\text{kyvette}} [\text{mL}] \cdot t_{\text{ink.}} [\text{min}]} \quad (\text{G.3})$$



Figur G.1: Enzymaktivitet gitt som økning i intensitet per mg protein og per minutt reaksjonstid for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter. Gjennomsnittsverdier \pm SEM (n = 12, S14: n = 11).

G.2 Enzymaktivitet i CTF

I Tabell G.1 er økning i intensitet ($\Delta\text{int.}$), $\Delta\text{int.}/(\text{mg protein}\cdot\text{min})$ og $\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt}\cdot\text{min})$ gitt som standardverdier \pm SEM ($n = 12, 11, 9$) for CTF fra kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter. $\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt}\cdot\text{min})$ for kjølte og superkjølte makrellfileter er plottet i Figur 3.15, og $\Delta\text{int.}/(\text{mg protein}\cdot\text{min})$ er plottet i Figur G.1. Data og flere beregninger er gitt i Excelark, se Vedlegg L.

Tabell G.2: Økning i intensitet ($\Delta\text{int.}$), og økning i intensitet per g våtvekt og minutter inkubasjonstid ($\Delta\text{int.}/(\text{g vv}\cdot\text{min})$) i CTF fra kjølte (K), superkjølte (S) makrellfileter, samt prøver fryst én måned (F). Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdi \pm SEM ($n=12$, S9 og S19: $n=11$, F1: $n=9$).

Prøve	Uttaks- dag	$\Delta\text{int.}$	\pm SEM	$\Delta\text{int.}/$	\pm SEM
				(g vv \cdot min)	
K1	1	4376	\pm 352	216	\pm 27
K5	5	4402	\pm 85	181	\pm 16
K7	7	4425	\pm 543	255	\pm 47
S1	1	3029	\pm 213	189	\pm 18
S5	5	7039	\pm 696	547	\pm 66
S9	9	9178	\pm 823	817	\pm 97
S14	14	9380	\pm 942	900	\pm 117
S19	19	7800	\pm 523	851	\pm 60
F1	33	9071	\pm 1111	973	\pm 126

$\Delta\text{int.}$ og $\Delta\text{int.}/(\text{g våtvekt}\cdot\text{min})$ i CTF ble beregnet etter henholdsvis Ligning (G.4) og (G.5) for alle prøvene. Int. er målt intensitet til prøven, $\text{Int}_{\text{blank}}$ er intensitet til blankprøven, V_{kyvette} er volum kyvette, $t_{\text{ink.}}$ er inkuberingstid med substrat og V_{CTF} er volum CTF. Ved å anta at tettheten til CTF er 1 mg/mL, blir V_{CTF} [mL] = mengde CTF [g]. Våtvekt makrell veid ut til bestemmelse av CTF og mengde CTF er gitt i Tabell C.2 for alle prøvene.

$$\Delta\text{int.} = (\text{Int.} - \text{Int}_{\text{blank}}) \cdot \text{Fortynning} \quad (\text{G.4})$$

$$\frac{\Delta\text{int.}}{\text{g vv}\cdot\text{min}} = \frac{\Delta\text{int.} \cdot V_{\text{CTF}} [\text{mL}]}{\text{Våtvekt} [\text{g}] \cdot V_{\text{kyvette}} [\text{mL}] \cdot t_{\text{ink.}} [\text{min}]} \quad (\text{G.5})$$

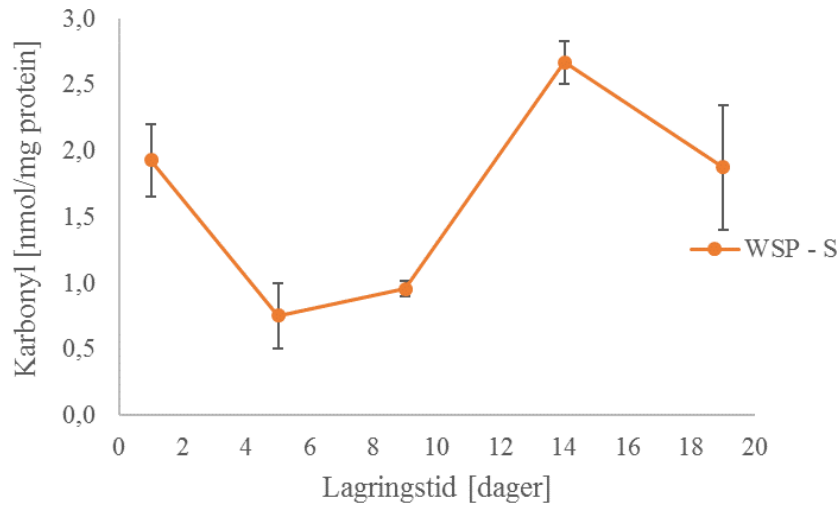
H Proteinkarbonylgrupper

H.1 Proteinkarbonyl lagringsforsøk

Gjennomsnittsverdier for innhold av karbonylgrupper i homogenat av vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner i nmol/mg protein og nmol/g våtvekt for kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) prøver er gitt i Tabell H.1. Verdiene er plottet Figur 3.17, 3.18, 3.19 og H.1. Data og flere beregninger er gitt i Excelark, se Vedlegg L.

Tabell H.1: Bestemmelse av proteinkarbonyl i nmol/mg protein og i nmol/g våtvekt for homogenater av vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner fra kjølte (K) og superkjølte (S) markrellfileter, samt filter fryst én måned (F). Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdier \pm SEM. Antall paralleller (#) er gitt for hver prøve.

Prøve	Uttaks- dag	Karbonyl \pm SEM [nmol/mg prot.]	Karbonyl \pm SEM [nmol/g vv]	#
WSP - K1	1	6,15 \pm 1,83	570,23 \pm 197,98	n=8
WSP - K5	5	-0,17 \pm 0,25	-15,10 \pm 21,05	n=8
WSP - K7	7	-0,38 \pm 0,16	-30,07 \pm 12,85	n=12
WSP - S1	1	1,93 \pm 0,27	158,50 \pm 19,04	n=8
WSP - S5	5	0,75 \pm 0,25	68,41 \pm 22,63	n=6
WSP - S9	9	0,96 \pm 0,06	77,98 \pm 4,05	n=12
WSP - S14	14	2,67 \pm 0,16	199,12 \pm 17,88	n=12
WSP - S19	19	1,87 \pm 0,47	133,49 \pm 24,50	n=11
WSP - F1	33	1,66 \pm 0,13	123,85 \pm 10,14	n=12
SSP - K1	1	3,83 \pm 0,22	448,14 \pm 29,20	n=8
SSP - K5	5	2,76 \pm 0,55	248,13 \pm 46,69	n=8
SSP - K7	7	3,77 \pm 0,21	361,62 \pm 21,56	n=12
SSP - S1	1	3,72 \pm 0,36	396,43 \pm 38,82	n=8
SSP - S5	5	3,39 \pm 0,20	252,47 \pm 16,19	n=7
SSP - S9	9	6,83 \pm 0,20	261,17 \pm 17,34	n=12
SSP - S14	14	10,38 \pm 0,11	308,02 \pm 23,61	n=12
SSP - S19	19	9,39 \pm 0,25	148,18 \pm 11,59	n=12
SSP - F1	33	7,67 \pm 0,21	429,84 \pm 28,43	n=12



Figur H.1: Proteinkarbonylinnhold [nmol/mg protein] i homogenat av vannløselige proteiner (WSP) for superkjølte (S) makrellfileter, gitt som gjennomsnittsverdi \pm SEM (S1 og S5: n=8, S9-S19: n=12).

Kvantifisering av karbonylgrupper gjennom ELISA-metoden (Avsnitt 1.6.5) ble gjort ved hjelp av reduser bovin serum albumin (BSA) med bestemte konsentrasjoner som standard. Standardkurver ble funnet hver uttaksdag ved lineær regresjon, og innholdet av karbonylgrupper i prøvene ble bestemt etter ligningen $y = ax + b$. y er absorbansverdi målt for hver prøve x er tilhørende karbonylkonsentrasjon [nmol/mg protein]. Verdiene a og b ble bestemt ut ifra absorbansmålinger av BSA hver uttaksdag av lagrede makrellfileter, og er gitt i Tabell H.2. Karbonylinnhold [nmol/mg protein] ble bestemt for hver prøve etter Ligning (H.1), og karbonylinnhold [nmol/g våtvekt] ble bestemt etter Ligning (H.2). Abs er absorbansmålinger til prøven, a og b er funnet hver uttaksdag og gitt i Tabell H.2, Prot.kons er proteinkonsentrasjonen av WSP og SSP funnet ved BioRad, $V_{hom.}$ er volum homogenat (100 mL for alle prøver) og våtvekt er utveid makrell. Proteinkonsentrasjon og våtvekt er gitt i Tabell F.3-F.6.

$$\text{Karbonyl} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mg prot.}} \right] = \frac{abs - b}{a} \quad (\text{H.1})$$

$$\text{Karbonyl} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{g vv}} \right] = \frac{\text{Karbonyl} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mg prot.}} \right] \cdot \text{Prot.kons} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] \cdot V_{\text{hom.}} [\text{mL}]}{\text{Våtvekt} [\text{g}]} \quad (\text{H.2})$$

Tabell H.2: Standardkurve funnet ved lineær regresjon for bestemmelse av proteinkarbonylinnhold i lagrede makrellfileter ved ELISA-metoden. Ulike konsentrasjoner av redusert bovin serum albumin (BSA) ble brukt som standard. $y = ax + b$, der y er absorbansverdi og x er karbonylinnhold [nmol/mg protein]. R^2 er regresjonskoeffisienten.

Uttaksdag	a	b	R^2
1	0,0966	0,3566	0,9617
5	0,0836	0,3925	0,9922
7	0,0680	0,2883	0,9769
9	0,0820	0,1941	0,9776
14	0,0256	0,1638	0,9422
19	0,0547	0,2051	0,9219
33	0,0799	0,2288	0,9961

H.2 Proteinkarbonyl sous vide

Gjennomsnittsverdier for innhold av karbonylgrupper i homogenat av vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner i nmol/mg protein og nmol/g våtvekt for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10 minutter og kjølelagret i 1 dag, er gitt i Tabell H.3. Verdiene er plottet i Figur 3.31 og 3.32. Data og flere beregninger er gitt i Excelark, se Vedlegg L.

Tabell H.3: Bestemmelse av proteinkarbonyl i nmol/mg protein og i nmol/g våtvekt for homogenater av vann- (WSP) og saltløselige (SSP) proteiner for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90 °C i 10 minutter og kjølelagret 1 dag. Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdier \pm SD (n = 3).

Prøve	Karbonyl \pm SD [nmol/ mg prot.]	Karbonyl \pm SD [nmol/ g vv]
WSP 60-10	9,30 \pm 1,16	118,46 \pm 14,72
WSP 75-10	29,15 \pm 6,97	80,23 \pm 19,19
WSP 90-10	51,38 \pm 2,23	86,28 \pm 3,75
SSP 60-10	19,84 \pm 1,23	138,95 \pm 8,64
SSP 75-10	49,86 \pm 4,05	139,64 \pm 11,34
SSP 90-10	90,53 \pm 2,92	135,55 \pm 4,37

I Bestemmelse av frie aminosyrer

Gjennomsnittsverdier for total mengde frie aminosyrer (FAA) for kjølte (K), superkjølte (S) og fryste (F) makrellfileter for hver uttaksdag er gitt i Tabell I.1. Verdiene er plottet i Figur 3.20. Data og flere beregninger er gitt i Excelark, se Vedlegg L.

Tabell I.1: Totalt mengde frie aminosyrer (FAA) i mg/g våtvekt for kjølte (K) og superkjølte (S) makrellfileter, samt fileter fryse-lagret én måned (F1). Gitt som gjennomsnittsverdier \pm SEM (n = 12, S5 og F1: n = 11).

Dag	Prøve	FAA \pm SEM [mg/g vv]
1	K1	4,340 \pm 0,179
5	K5	4,034 \pm 0,108
7	K7	5,104 \pm 0,218
1	S1	3,802 \pm 0,126
5	S5	4,452 \pm 0,092
9	S9	4,715 \pm 0,106
14	S14	4,707 \pm 0,136
19	S19	5,040 \pm 0,249
33	F1	4,582 \pm 0,188

Mengde FAA for hver prøve ble målt i $\mu\text{mol/l}$ i HPLC-analysen, og ble beregnet til mengde FAA i mg/g vv som vist i Ligning (I.1) for hver aminosyre for alle prøvene. FAA [$\mu\text{mol/L}$] er mengde FAA målt ved HPLC, M_w er molekylmassen til hver aminosyre i bundet protein, $V_{\text{Hom.}}$ er volum homogenat (100 mL), Fort. er fortynning før HPLC, og våtvekt makrell veid ut før tillaging av homogenat (gitt i Tabell F.3-F.6). Faktoren 1,25 er en omregningsfaktor og 1000 er for å få riktig benevning.

$$\text{FAA} \left[\frac{\text{mg}}{\text{g vv}} \right] = \frac{\text{FAA} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right] \cdot M_w \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \cdot 1,25 \cdot V_{\text{Hom.}} \cdot \text{Fort.}}{1000 \cdot 1000 \cdot \text{Våtvekt} [\text{g}]} \quad (\text{I.1})$$

J Vanninnhold Sous vide

Gjennomsnittsverdier for vanninnhold for makrellfileter varmebehandlet ved 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter for uttak 1, 3 og 7 dager med kjølelagring er gitt i Tabell J.1. Verdiene er fremstilt i Figur 3.21. Data og flere beregninger er gitt i Excelark, se Vedlegg L.

Tabell J.1: Vanninnhold og endring i vanninnhold i forhold til kontrollprøven (Δ vanninnhold) i prosent for varmebehandlede makrellfileter. Prøvene ble varmet til 60, 75 og 90°C i 10, 15 og 20 minutter, og uttak ble gjort etter 1, 3 og 7 dager. Kontrollprøven er ikke varmebehandlet. Verdiene er gitt som gjennomsnittsverdi \pm SD (n=3).

Prøver	Uttaks- dag	Vanninnhold \pm SD [%]	Δ Vanninnhold [%]
Kontroll	-	69,33 \pm 0,43	-
60-10-1	1	61,3 \pm 2,46	-11,51
60-10-3	3	67,71 \pm 0,68	-2,34
60-10-7	7	67,21 \pm 0,74	-3,06
60-15-1	1	67,32 \pm 1,40	-2,89
60-15-3	3	64,15 \pm 0,13	-7,46
60-15-7	7	64,53 \pm 1,61	-6,92
60-20-1	1	61,73 \pm 1,70	-10,95
60-20-3	3	65,37 \pm 3,78	-5,70
60-20-7	7	68,05 \pm 1,63	-1,85
75-10-1	1	64,11 \pm 1,88	-7,53
75-10-3	3	58,04 \pm 0,98	-16,28
75-10-7	7	65,11 \pm 3,79	-6,08
75-15-1	1	55,22 \pm 1,50	-20,34
75-15-3	3	65,11 \pm 2,74	-6,08
75-15-7	7	64,91 \pm 0,49	-6,37
75-20-1	1	60,39 \pm 1,45	-12,88
75-20-3	3	63,45 \pm 0,99	-8,47
75-20-7	7	62,21 \pm 1,19	-10,27
90-10-1	1	56,71 \pm 0,91	-18,20
90-10-3	3	69,90 \pm 0,95	0,84
90-10-7	7	58,61 \pm 3,15	-15,46
90-15-1	1	66,88 \pm 2,04	-3,53
90-15-3	3	57,66 \pm 1,29	-16,82
90-15-7	7	61,86 \pm 2,80	-10,78
90-20-1	1	63,57 \pm 1,18	-8,30
90-20-3	3	61,23 \pm 2,25	-11,67
90-20-7	7	66,01 \pm 0,55	-4,78

K Korrelasjon

Korrelasjonskoeffisienter for analyser utført på kjølte makrellfileter er gitt i Tabell K.1, og for superkjølte makrellfileter er gitt i Tabell K.2. Ettersom uttaksdagene varierte for noen av analysene, er ikke alle korrelasjonskoeffisient funnet mellom alle resultater. Korrelasjonskoeffisienter for resultater fra analysene mengde vann- (WSP) og saltløselige proteiner (SSP), proteolytisk aktivitet i homogenat og CTF, mengde karbonylgrupper for WSP (nmol/g våtvekt) og SSP (nmol/mg protein og nmol/g våtvekt) og total mengde frie aminosyrer (FAA) er gitt i Tabell K.1a og K.2a. Korrelasjonskoeffisienter for mellom resultater fra analysene drypptap, mikrobiell status, tekstur (bruddstyrke og hardhet) og fargeparametrene lyshet (L^*), rødhet (a^*) og gulhet (b^*) er gitt i Tabell K.1b og K.2b.

Tabell K.1: Korrelasjonskoeffisient for kjølte prøver.

(a) Analyser dag 1, 5 og 7.

Analyser	WSP		Mengde		Enz.akt.		Enz.akt.		Prot.oks.		FAA
	SSP	CTF	CTF	homogenat	CTF	CTF	SSP /g vv	SSP /mg prot.			
WSP	1	0,979	0,139	-0,729	0,278	0,959	0,773	0,072			
SSP		1	-0,068	-0,855	0,074	0,880	0,626	-0,135			
Mengde CTF			1	0,576	0,990	0,414	0,736	0,998			
Enz.akt. Hom.				1	0,454	-0,506	-0,130	0,630			
Enz.akt. CTF					1	0,539	0,824	0,978			
Prot.oks. SSP /g vv						1	0,921	0,351			
Prot.oks. SSP /mg prot.							1	0,688			
FAA								1			

(b) Analyser dag 0, 2, 5 og 7.

Analyser	Drypptap		Mikrobiell		Tekstur		Farge	
	status	Bruddpunkt	Bruddpunkt	Hardhet	L*	a*	b*	
Drypptap	1	0,782	-0,981	-0,996	0,996	-0,994	0,948	
Mikrobiell status		1	-0,875	-0,727	0,728	-0,817	0,831	
Bruddpunkt			1	0,963	-0,962	0,994	-0,930	
Hardhet				1	-1,000	0,985	-0,933	
L*					1	-0,983	0,938	
a*						1	-0,925	
b*							1	

Tabell K.2: Korrelasjonskoeffisient for superkjøltrekjølte prøver.

(a) Analyser dag 1, 5, 9, 14 og 19.

Analyser	WSP				Prot. oks.				FAA
	WSP	SSP	Mengde	Enz. akt.	Enz. akt.	WSP /g vv	SSP /g vv	SSP /mg prot.	
WSP	1	0,755	-0,769	0,359	-0,597	-0,471	0,332	-0,879	-0,630
SSP		1	-0,957	-0,330	-0,969	-0,041	0,664	-0,890	-0,966
Mengde CTF			1	0,203	0,888	-0,050	-0,804	0,816	0,970
Enz. akt. hom.				1	0,532	-0,482	-0,328	0,056	0,422
Enz. akt. CTF					1	0,005	-0,613	0,843	0,944
Oks. WSP						1	0,596	0,492	-0,191
Oks. SSP /g vv							1	-0,313	-0,826
Oks. SSP /mg prot.								1	0,756
FAA									1

(b) Analyser dag 2, 5, 9, 14 og 19

Analyser	Drypptap		Mikrobiell status		Tekstur				Farge		
	Drypptap	Mikrobiell status	Bruddpunkt	Hardhet	L*	a*	b*	L*	a*	b*	
Drypptap	1	0,754	0,764	0,777	-0,754	-0,944	-0,012				
Mikrobiell status		1	0,997	0,961	-0,846	-0,880	-0,241				
Bruddpunkt			1	0,979	-0,854	-0,881	-0,210				
Hardhet				1	-0,872	-0,857	-0,087				
L*					1	0,715	-0,305				
a*						1	0,295				
b*							1				

L Excelark

I tillegg til Vedlegg B-J, er data og beregninger gitt i ulike Microsoft excelark, navngitt etter de aktuelle analysene.