

## **Superkjølt lam**

Studier av proteolytiske enzymer

**Elisabeth Friestad**

Industriell kjemi og bioteknologi

Innlevert: juni 2014

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for bioteknologi



## Forord

Denne masteroppgaven har vært en del av masterutdanningen innen industriell kjemi- og bioteknologi (MTKJ) ved NTNU. Oppgaven er tilknyttet samarbeidsprosjektet BIP OptiLam mellom Fatland AS, SINTEF Energi AS og NTNU Bioteknologi. Arbeidet presentert i denne oppgaven ble gjort ved næringsmiddelkjemilaboratoriet ved institutt for bioteknologi ved NTNU. Masteroppgaven er en utvidelse av prosjektarbeidet ”Superkjøling av lam” utført av undertegnede høsten 2013.

For all uunnværlig hjelp og veiledning ønsker jeg å takke min hovedveileder, Professor Turid Rustad. Din entusiasme for faget smitter, og din omsorg for dine studenter, samt alle lærerike og sosiale gruppemøter du har arrangert, bidrar til et trivelig miljø på laboratoriet.

En stor takk rettes til avdelingsingeniør Trude Johansen for alle gode råd og samtaler, samt for all hjelp jeg har fått når jeg har trengt det. Takk til ingeniør Siri Stavrum ved institutt for bioteknologi for HPLC-analyser av frie aminosyrer, og til senioringeniør Per E. Gullsvåg og resten av gruppen ved SINTEF Energi AS for forsyningen av lammelår.

Jeg ønsker også å takke praktikant Caroline D. Høyen for analyser av syreløselige peptider, samt for at du alltid har et smittende godt humør som gjør laboratoriearbeidet mye hyggeligere. Alle medstudenter og venner takkes også for alle gode minner fra årene som student.

En varm takk rettes til mine foreldre og min søster for at dere har tro på meg og for at dere alltid stiller opp. Til slutt vil jeg takke Tor Erik Nordskag for at du alltid er der for meg, og for din endeløse tålmodighet med meg.

Trondheim, juni 2014

Elisabeth Friestad



## Sammendrag

Ferskt lammekjøtt er et sesongprodukt med en kort omsetningsperiode. Målet med denne oppgaven var å finne ut hvordan lagringsmetoden superkjøling påvirker lammekjøtt i forhold til vanlig kjøleromsoppbevaring og frysing av kjøttet. Superkjøling innebærer oppbevaring av kjøtt ved temperaturer mellom temperaturen der det først begynner å dannes is i produktet og 1-2 °C under dette punktet. Tidligere forsøk har vist at holdbarhetstiden til andre typer kjøtt har blitt over dobbelt så lang som ved kjølelagring ved bruk av denne lagringsmetoden.

Det ble utført forsøk på både lamme- og svinekjøtt, der lammekjøttet ble mottatt både i 2013 og i 2014, mens svinekjøttet ble kjøpt i 2014. Lammekjøttet stammet fra Fatland AS' slakterier på Jæren, og ble oppbevart ferskt ved en kjøleromstemperatur på rundt 4 °C, skallfrost ved -38 °C med videre lagring ved rundt -1,6 °C (superkjølt), samt fryst, alt ved SINTEF Energi AS. Ferskt kjøtt i 2014 ble imidlertid oppbevart ved NTNU Bioteknologi og overført til lynlåsposer 7 dager etter slakt før videre oppbevaring. Lagringsperioden var 41 dager etter slakt for superkjølt kjøtt i 2013, og 30 dager for ferskt kjøtt. I 2014 var lagringsperioden på 21 dager etter slakt for ferskt og superkjølt kjøtt, og på 27 dager for fryst kjøtt.

Mørning av kjøtt skjer hovedsakelig på grunn av enzymatisk aktivitet. Kalpainer og katepsiner er de viktigste enzymgruppene som forårsaker mørning. Det ble utført innledende forsøk på kalpain-lignende aktivitet i homogenater (supernatant etter sentrifugering av mekanisk ødelagt kjøtt i ekstraksjonsvæske) av lammekjøtt fra 2013 samt av svinekjøtt fra 2014. Aktiviteten var imidlertid lav eller ikke målbar for alle prøver, og videre forsøk på kalpainaktiviteter ble ikke utført.

Fryse/tine-ødeleggelse fører til at proteiner og andre stoffer lekker ut av cellene i vevet. En spesifikk indikator på fryseødeleggelse er aktiviteten av den lysosomale proteasen katepsin B i cellevevsvæske (CTF, væske i ekstracellulær matriks som kan separeres ut ved hjelp av sentrifugering). Aktiviteten i CTF sees i forhold til den totale aktiviteten i kjøttet, som måles i homogenat, og dette gir et mål på grad av membranødeleggelse i kjøttet.

Målinger av mengde CTF, mengde vannløselige protein i CTF og forholdet mellom katepsin B-aktivitet i CTF og i homogenat tydet på mindre fryse/tine-ødeleggelse i det superkjølte kjøttet enn i det fryste kjøttet. Ødeleggelsene var imidlertid større enn i det ferske kjøttet. Katepsin B-aktivitet ble også målt i løsninger med salt og ved ulike temperaturer, siden tradisjonsproduktet fenalår lages ved å salte lammelår og la dem modne over tid ved temperaturer høyere enn vanlig kjøling. Katepsin B-aktivitet ble hemmet av tilsatt salt og senket temperatur, men ved senkede temperaturer var ikke forskjellen like stor mellom aktivitet med og uten tilsatt salt som ved høyere temperaturer.

Frie aminosyrer og syreløselige peptider økte totalt sett i alle prøver fra 2013. Dette tyder på at både endo- og eksopeptidaser var aktive under både kjølt, superkjølt og fryst lagring av lammekjøtt. Lavere mengder i superkjølte og fryste prøver (med unntak av frie aminosyrer i superkjølt ytterkant) kan tyde på mindre proteolytisk aktivitet under oppbevaring av disse prøvene. Målingene av katepsin B-aktivitet viste dermed at lekkasje av enzymer fra lysosomer i superkjølte og fryste prøver vil føre til økt mørning kun dersom prøvene lagres ved høyere temperaturer etter superkjølt eller fryst mellomlagring.

Denne oppgaven viser at superkjøling fører til noe fryse/tine-ødeleggelse av lammekjøtt i forhold til i kjølt kjøtt, men at ødeleggelsene er mindre enn i fryst kjøtt. Ved bruk av superkjølt kjøtt til tillaging av fenalår, vil det dermed forventes at saltetiden til kjøttet må ligge et sted i området mellom saltetidene for fryst og ferskt kjøtt. Fryst kjøtt tint sakte ved 4 °C hadde større membranødeleggelse enn fryst kjøtt tint raskere i rennende vann. Det ville derfor være interessant å utføre forsøk på superkjølt kjøtt tint raskt for å se om dette ville føre til mindre membranødeleggelse enn ved sakte tining av superkjølt kjøtt.

Det ble ikke foretatt noen sensorisk analyse av lammekjøttet i denne oppgaven, og det må derfor gjøres videre undersøkelser for å finne ut hvordan kjøtt lagret ved de ulike lagringsmetodene vil oppleves av forbrukere. Det ville også være interessant å studere endringer i enzymaktivitet under tillaging av fenalår ved bruk av lammelår oppbevart ved ulike temperaturer, samt hvordan de ulike lagringsmetodene vil påvirke smaken av produktet.

## Abstract

Fresh meat of lamb is a seasonal product with a short period of commerce. The goal of this thesis was to find out how the method of storage called superchilling affects lamb meat compared to conventional cold and frozen storage. Superchilling means storage of meat between the temperature where ice first starts forming in the product and 1-2 °C below this point. Former studies have shown prolonged shelf life in other types of meat using this storage method.

Experiments were conducted on both lamb and pork meat. The lamb meat was received both in 2013 and in 2014, while the pork meat was purchased in 2014. The lamb meat came from Fatland AS' slaughterhouse at Jæren, and was stored fresh at a refrigerating temperature of around 4 °C, shell frozen at -38 °C with further storage at around -1.6 °C (superchilled), and frozen, all at SINTEF Energy Research. Fresh meat in 2014 was, however, kept at NTNU Biotechnology and transferred to self-seal bags 7 days after the slaughter day, before further storage. The storage period was 41 days after slaughter for superchilled meat in 2013, and 30 days for fresh meat. In 2014, the storage period was 21 days after slaughter for fresh and superchilled meat, and 27 days for frozen meat.

Tenderization of meat occurs mainly due to enzymatic activity. Calpains and cathepsins are the major enzyme groups that cause the tenderization. Initial experiments were conducted on calpain-like activity in homogenates (supernatant after centrifugation of mechanically damaged meat in an extraction liquid) of lamb meat from 2013, and of pork meat from 2014. Activity was low or undetectable for all samples, and further experiments on calpain-activities were not performed.

Freezing and thawing causes leakage of proteins and other substances from the cells in the tissue. One specific indicator of freeze damage is the activity of the lysosomal protease cathepsin B in cell tissue fluid (CTF, fluid in the extracellular matrix that can be separated by means of centrifugation). Activity in the CTF can be seen in relation to the total activity in the meat, which is measured in the homogenate, and this gives a measure of the degree of membrane damage in the meat.

Measurements of the amount of CTF, amount of water-soluble proteins in the CTF and the ratio of activity of cathepsin B in CTF and in homogenate indicated less freeze/thaw damage in the superchilled meat than in the frozen meat. The damage was, however, greater than in the fresh meat. Cathepsin B activity was also measured in solutions with added salt and at different temperatures, since the traditional dry-cured meat product “fenalår” is made by salting legs of lamb and then letting them mature over time at temperatures higher than with normal cold storage. Cathepsin B activity was inhibited by the addition of salt and lowering of temperature, but at lowered temperatures, the difference between the activity with and without added salt was lower than at higher temperatures.

Free amino acids and acid soluble peptides increased overall in all samples from 2013, suggesting that both endo- and exopeptidases were active during both chilled, superchilled and frozen storage of lamb. Lower amounts in superchilled and frozen samples (excluding amount of free amino acids in the outer edge in superchilled meat) may indicate less proteolytic activity during storage of these samples. The measurement of cathepsin B activity thus shows that leakage of enzymes from lysosomes in superchilled and frozen samples will increase the degree of tenderization only if the samples are stored at higher temperatures after superchilled or frozen storage.

This thesis shows that the superchilling leads to some freeze/thaw damage of lamb compared to conventionally chilled meat, but the damage is less than in frozen meat. It will therefore be expected that the salting time of superchilled lamb meat will lie between the salting time of frozen meat and the salting time of chilled meat when making cured leg of mutton. Frozen meat thawed slowly at 4 °C had a greater degree of membrane damage than frozen meat thawed quickly under running water. It would therefore be interesting to perform experiments on superchilled meat thawed quickly to see if this would lead to less membrane damage than in slow thawing of superchilled meat.

No sensory analysis was performed in this thesis. Further research must therefore be done to find out how meat stored with different storage methods will be experienced by consumers. It would also be interesting to study changes in enzyme activity during the preparation of cured leg of mutton using lamb stored at different temperatures, as well as how the various storage methods will affect the taste of the product.



## Innhold

Forord .....	i
Sammendrag .....	iii
Abstract .....	v
1 Innledning.....	1
1.1 Muskelanatomi .....	2
1.2 Muskelkontraksjon .....	5
1.3 Post mortem muskel .....	8
1.4 Farge i kjøtt .....	10
1.5 Mørning av kjøtt.....	11
1.6 Proteolytiske enzymer .....	13
1.7 Oppbevaring av kjøtt.....	14
1.8 Superkjøling .....	16
1.9 Fenalår .....	18
1.10 Bakgrunn for metoder .....	19
2 Materialer og metoder .....	21
2.1 Lammekjøtt høsten 2013 .....	21
2.2 Svinekjøtt .....	22
2.3 Lammekjøtt våren 2014 .....	22
2.4 Superkjøling .....	23
2.5 Tillaging av homogenat og CTF .....	23
2.6 Aktivitet av proteolytiske enzymer .....	24
Aktivitet av kalpain-lignende enzymer .....	25
Aktivitet av katepsin B-lignende enzymer .....	26
2.8 Frie aminosyrer .....	27
2.9 Syreløselige peptider .....	28

3 Resultater og diskusjon .....	29
3.1 Vevsvæske.....	29
3.2 Vannløselige proteiner .....	32
3.3 Målinger av kalpain-lignende aktivitet.....	38
3.4 Målinger av aktivitet av katepsin B-lignende enzymer.....	45
3.5 Frie aminosyrer .....	63
3.6 Syreløselige peptider .....	64
3.7 Kjøttets utseende og lukt .....	65
3.8 Videre arbeid .....	67
4 Konklusjon .....	69
Referanser: .....	71
Vedlegg A: Cellevevsvæske.....	I
Vedlegg B: Mengde vannløselig protein med Biorad-metoden.....	V
Vedlegg C: Aktivitet av kalpain-lignende enzymer .....	XXI
Vedlegg D: Aktivitet av katepsin B-lignende enzymer.....	XXXVII
Vedlegg E: Frie aminosyrer .....	LI
Vedlegg F: Syreløselige peptider .....	LXXIII

## 1 Innledning

Lammekjøtt er et produkt som har lange tradisjoner i Norge, med tradisjonsretter som fårrikål, pinnekjøtt og fenalår. Omsetningsperioden for ferskt lam varer imidlertid kun fra slutten av august til midten av november (Forskningsrådet, 2011). Det er blitt en større etterspørsel etter ferskt lammekjøtt utenfor sesongen (desember – september), hovedsakelig på grunn av et økt antall etniske forbrukere (Mushi et al., 2008). Bare søyelam blir slaktet i denne perioden. Dette er fordi det i Norge ikke er lov å kastre værlam, og værlammene må derfor slaktes i september i en alder av 4-5 måneder for å unngå bismak og bilukt i kjøttet.

Av det kontrollerte slaktet i 2013 utgjorde sauekjøtt 23 000 tonn av totalt 339 300 tonn kjøtt produsert, og utgjorde dermed 6,8 % av total kjøttproduksjon (Statistisk sentralbyrå, 2014). Nordmenn spiser i gjennomsnitt rundt 3,5 kg lammekjøtt per år (Matprat.no, 2014a). Det er derfor ønskelig å utvide omsetningsperioden for lammekjøtt.

Kvalitetstap i kjøttet skjer hovedsakelig på grunn av mikrobiell vekst og enzymatiske reaksjoner, og for å øke holdbarhetstiden, er den viktigste faktoren temperatur (Kaale et al., 2011). En aktuell kjølemetode for å opprettholde lave temperaturer gjennom hele distribusjonskjeden av kjøtt, er mellomlagring med skallfrysing og påfølgende superkjøling (Hemmingsen, 2002). Skallfrysing og superkjøling er beskrevet nærmere i avsnitt 1.8.

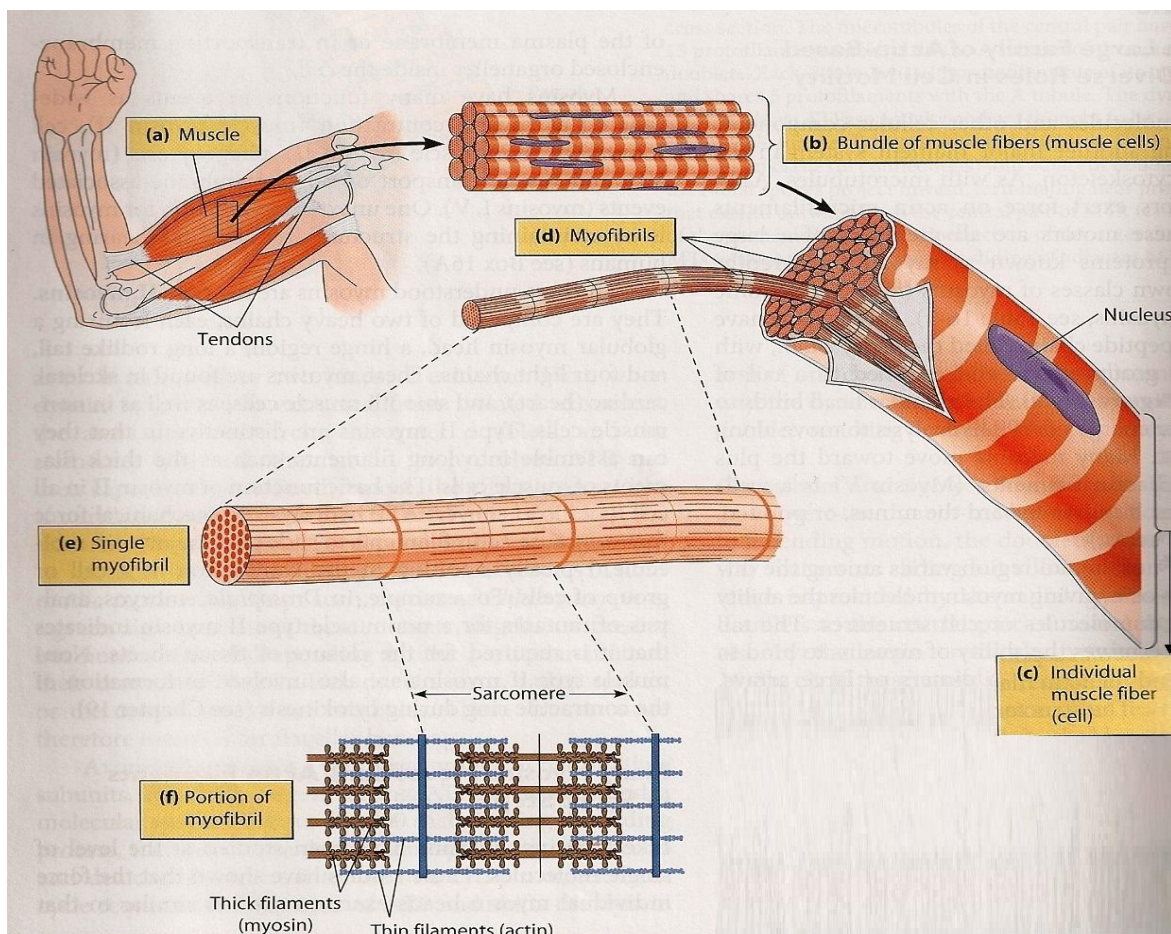
Mørhet i kjøtt er en egenskap som er viktig for kvaliteten. Proteolyse av viktige myofibrillproteiner er hovedårsaken til mørning av kjøtt (Koochmaraie et al., 2002). Denne oppgaven tar for seg hvordan enzymaktivitet og andre egenskaper ved kjøtt påvirkes av ulike oppbevaringsmetoder; kjøling i kjølerom, superkjøling, og ved frysing/tining. I tillegg vil det bli sett på hvordan enzymaktiviteten påvirkes av salt, da tradisjonsretten fenalår lages ved salting og videre modning over tid. De følgende avsnittene vil ta for seg oppbyggingen av kjøtt, dets farge, mørning, proteolytiske enzymer, oppbevaring av kjøtt, samt fenalår og dets tillaging. Det vil også bli gitt en kort oversikt over prinsippene for metoder brukt ved analyse.

## 1.1 Muskelanatomi

For å forstå hvilke prosesser som skjer ved oppbevaring av kjøtt, må en se på oppbygningen av kjøttet. Kjøtt kan defineres som ”skjelettmuskulatur av pattedyr og fugler med eller uten naturlig tilhørende fett, bein og bindevev” (Kjøttindustriens fellesforening, 1996).

Hovedbestanddelene i kjøtt er protein, vann, fett, mineraler og vannløselige organiske stoffer (Hemmer, 1997). Kjøttet består av ca. 20 % proteiner, fett og vann utgjør til sammen rundt 80 %, mineralene utgjør 1-2 % og de vannløselige organiske stoffene utgjør rundt 1 %.

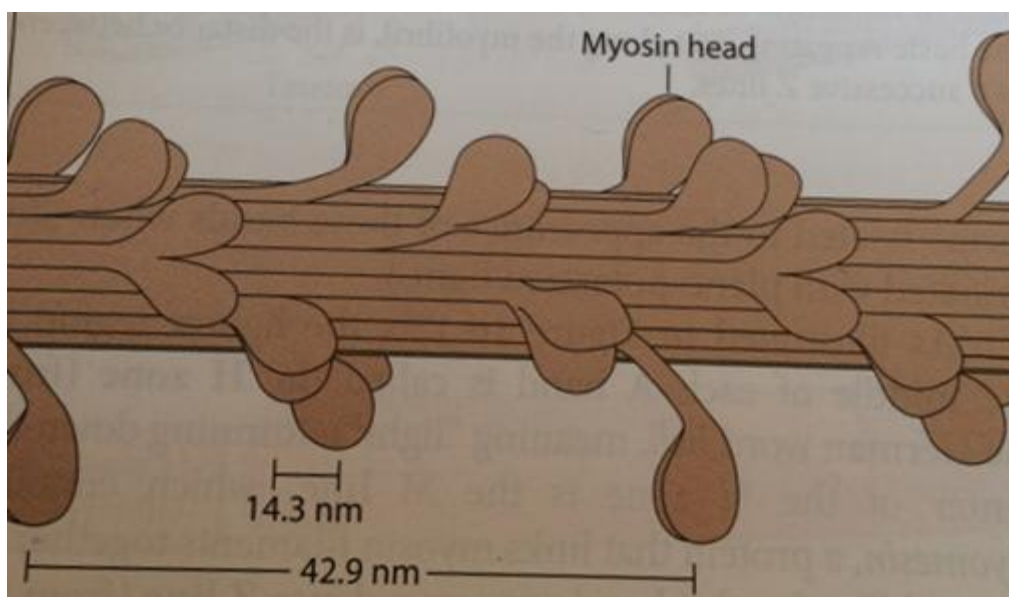
Skjelettmuskulatur er bygd opp som vist i figur 1.1.1. Skjelettmuskulaturen består av fiberbunter som er omkranset av et kollagennettverk kalt perimysium (Honikel, 1989). Fibrene er muskelceller med diametre mellom 20 og 100 $\mu$ m og lengder på mellom noen få millimeter opp til flere centimeter. Cellene er omkranset av et bindevevslag kalt endomysium, samt cellemembranen (sarkolemma), som separerer intracellulære og ekstracellulære rom.



**Figur 1.1.1:** Oppbygging av skjelettmuskulatur (Hardin et al., 2012).

Inne i cellen er myofibriller med diametre på mellom 1-2 $\mu$ m arrangert parallelt langs lengden til cellen (Honikel, 1989). Myofibrillene befinner seg i sarkoplasma, som er muskelcellenes cytosol. Hver myofibrill er omkranset av flate, membranbundne vesikler kalt sarkoplasmatiske retikulum (Nelson et al., 2008), som er del av et ekstensivt nettverk av spesialisert endoplasmatiske retikulum som akkumulerer kalsiumioner og frigjør dem i respons til nervesignaler (Hardin et al., 2012). I lengderetningen er myofibriller delt i repeterende enheter kalt sarkomerer. Sarkomerene er de fundamentale enhetene for kontraksjon i cellen. Hver sarkomer i myofibrillene inneholder bunter av tykke og tynne filamenter.

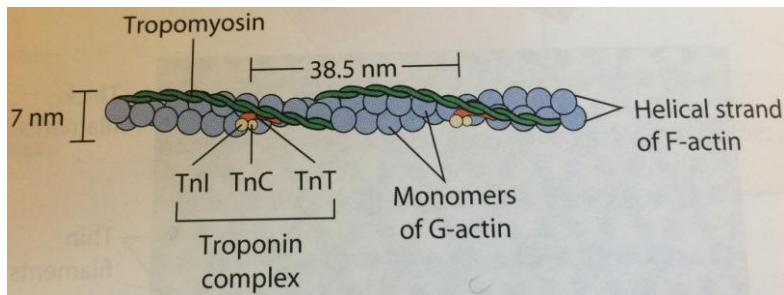
De tykke filamentene består hovedsakelig av proteinet myosin, som utgjør rundt 45 % av myofibrillproteinene (Honikel, 1989). Myosinmolekylene er organisert slik at myosinhodene vender ut fra sentrum av de tykke filamentene (figur 1.1.2) (Hardin et al., 2012). De tykke filamentenes myosinhoder kan forme kryssbindinger mellom tykke og tynne filamenter, noe som er essensielt for muskelkontraksjon.



**Figur 1.1.2:** Tykt filament fra skjelettmuskler (Hardin et al., 2012).

De tynne filamentene består hovedsakelig av aktin, som utgjør rundt 20 % av myofibrillproteinene, men også troponin og tropomyosin, som utgjør rundt 5 % hver (Honikel, 1989). Aktin er F-aktin som består av monomerer av G-aktin, som er formet slik at polymeren danner en dobbelheliks, som vist i figur 1.1.3 (Hardin et al., 2012). Troponin er et kompleks av tre polypeptidkjeder: troponin T (TnT), troponin C (TnC) og troponin I (TnI).

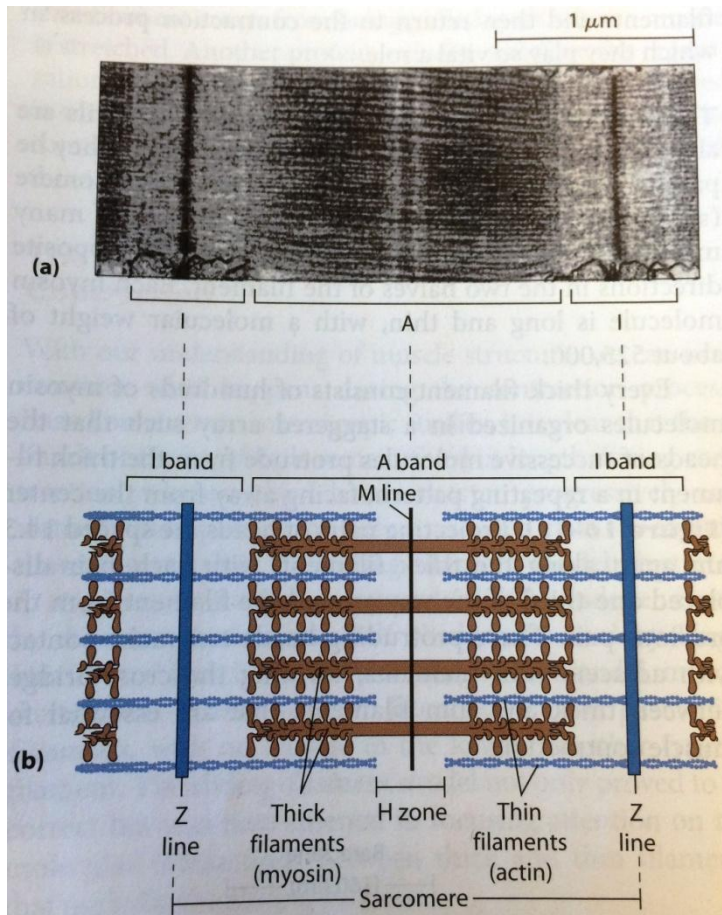
TnT binder tropomyosin, TnC binder kalsiumioner og TnI binder aktin. De tynne filamentene er arrangert rundt de tykke filamentene i et heksagonalt mønster.



**Figur 1.1.3:** Tynt filament fra skjelettmuskler (Hardin et al., 2012). Tn står for troponin, I for "inhibitory", C står for "calcium" og T står for "tropomyosin".

Siden filamentene i skjelettmuskler er arrangert i et alternerende mønster av lyse og mørke bånd, kalles de gjerne "tverrstripet" (Hardin et al., 2012). Figur 1.1.4(a) viser et bilde av en enkelt sarkomer tatt med et transmisjonselektronmikroskop. Figur 1.1.4(b) viser et skjematisk diagram av sarkomeren. De lyse båndene kalles I-bånd, mens de mørke kalles A-bånd. A-båndet har også en lysere region, som kalles H-sonen. I midten av denne sonen er M-linjen, som inneholder proteinet myomesin. Dette proteinet binder tykke filamenter sammen. I midten av I-båndet er Z-linjen, og enkelt-sarkomerer blir definert fra en Z-linje til den neste. Sarkomerene er rundt 2,5-3,0  $\mu\text{m}$  lange i avslappet tilstand, men forkortes når muskelen trekker seg sammen. Hvert I-bånd består av to sett med tynne filamenter, som er festet på hver sin side av Z-linjen.





**Figur 1.1.4:** Sarkomer (Hardin et al., 2012). (a) Et bilde av en enkelt sarkomer tatt med et transmisjonselektronmikroskop. (b) Skjematisk diagram av en sarkomer.

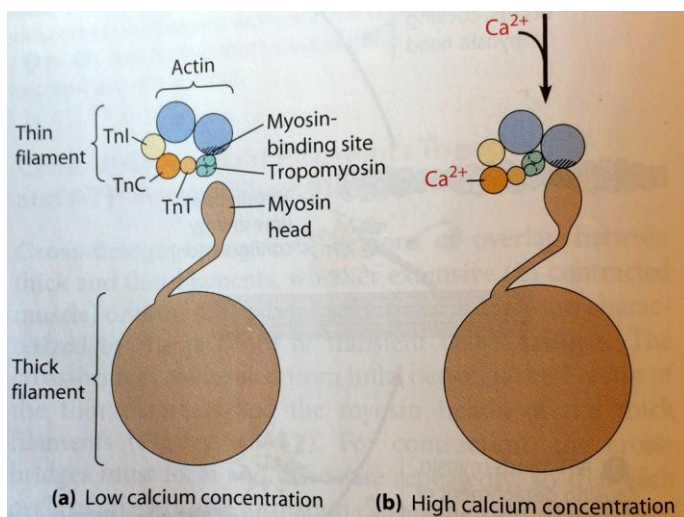
Også andre proteiner tar del i sarkomerstrukturen, blant andre proteinet titin, som utgjør rundt 10 % av totalvekten til myofibrillene (Honikel, 1989). Titin ligger parallelt med de tykke og de tynne filamentene. Proteinene strekker seg fra Z-linjen til M-linjen og regulerer lengden til sarkomeren, noe som hindrer at musklene strekkes for langt (Nelson et al., 2008). I tillegg sørger titin for at tykke filamenter er i korrekt posisjon for kontraksjon relativt til tynne filamenter (Hardin et al., 2012).

## 1.2 Muskelkontraksjon

Skjelettmusklenes hovedfunksjon er å trekke seg sammen for at kroppen skal kunne bevege seg. Muskelkontraksjon induseres ved at en elektrisk impuls fra en nervecelle sendes til muskelen (Hardin et al., 2012). Nervecellen ender i aksonterminaler som inneholder forbindelsen acetylkolin, som virker som en nerveimpulsoverfører. Acetylkolinreseptorer i sarkolemma åpner porer i plasmamembranen når de bindes til acetylkolin. Dette fører til at

natriumioner flyter inn i muskelcellen, noe som igjen fører til en depolarisering av membranen. T-tubuli, et system av folder av sarkolemma inn i muskelcellen, viderefører aksjonspotensialet inn i muskelcellen. T-tubuli-foldene er i kontakt med sarkoplasmatiske retikulum. Når aksjonspotensialet spres gjennom foldene, åpnes kalsiumkanaler som er i tilknytning til ryanodinreseptorer i terminale cisterner i sarkoplasmatiske retikulum. Når reseptorkanalene åpnes, flommer kalsium inn i sarkoplasma like i nærheten av myofibrillene.

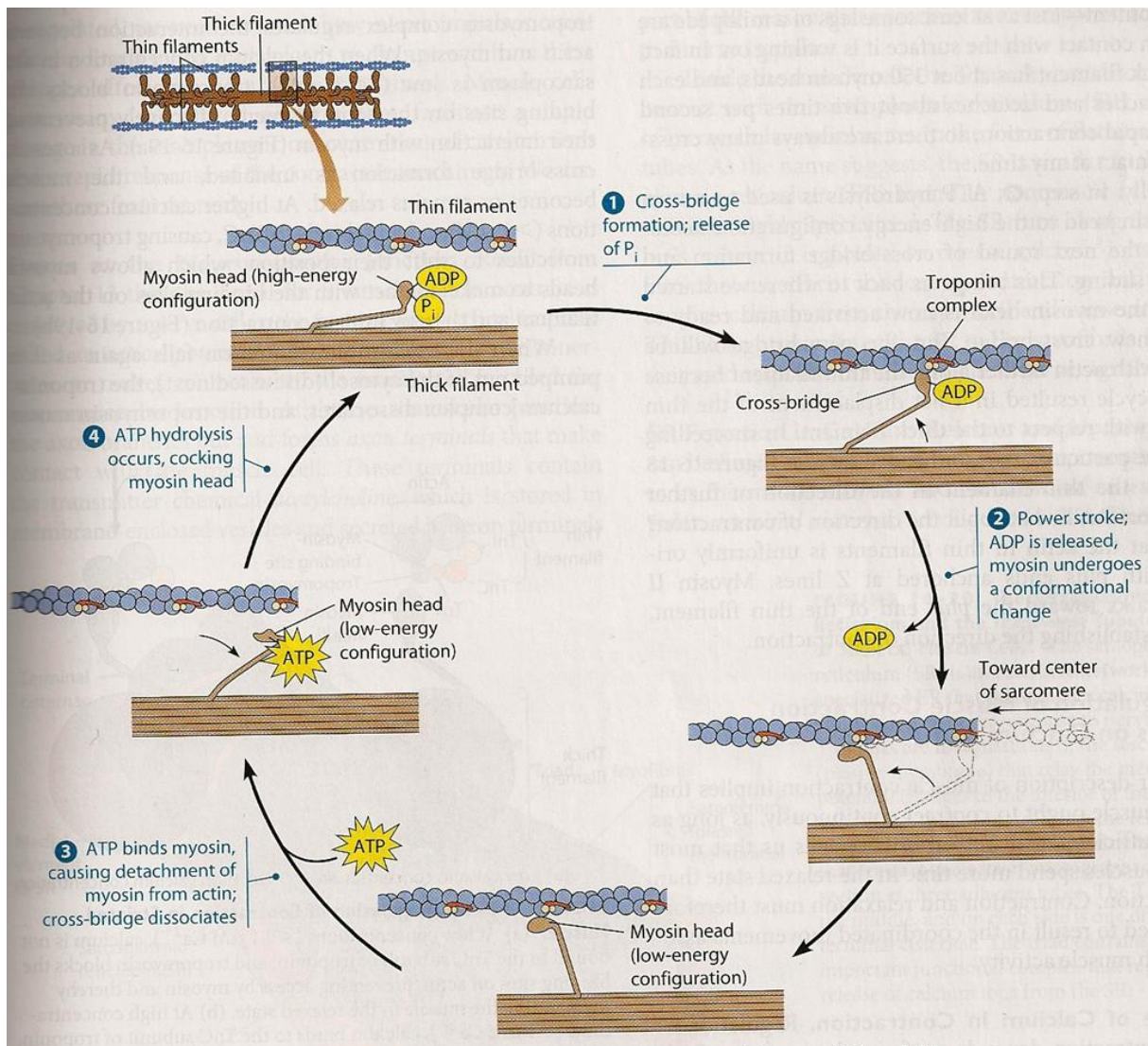
Kontraksjon av muskler kan skje fordi det dannes midlertidige bindinger mellom myosin og aktin. Vanligvis er de myosin-bindende setene i aktin blokkert av tropomyosin, som vist i figur 1.2.1(a) (Hardin et al., 2012). Når et kalsiumion bindes til troponin C (TnC), undergår TnC en konformasjonsendring slik at tropomyosinmolekylet flyttes fra det myosin-bindende setet, som vist i figur 1.2.1(b). Setet blir dermed tilgjengelig for myosinhoder, og kontraksjonen kan skje.



**Figur 1.2.1:** Effekt av kalsium på tynnfilamentet (Hardin et al., 2012). (a) Tynn- og tykkfilament ved kalsiumkonsentrasjoner under  $0,1 \mu\text{M}$ . (b) Tynn- og tykkfilament ved kalsiumkonsentrasjoner over  $0,1 \mu\text{M}$ .

Kontraksjonen skjer i fire steg, som vist i figur 1.2.2 (Hardin et al., 2012). Myosinhodet er i utgangspunktet bundet til ADP og et  $\text{P}_i$ -molekyl. I det første steget av kontraksjonen blir  $\text{P}_i$ -molekylet frigjort, og myosinhodet binder seg til aktinfilamentet. Når ADP deretter frigjøres i neste steg, forandrer myosin konformasjon slik at det tykke filamentet drar i det tynne filamentet. Det tynne filamentet forflytter seg da i forhold til det tykke filamentet.





**Figur 1.2.2:** Muskelkontraksjon som en syklisk prosess (Hardin et al., 2012). Stegene er forklart i hovedteksten.

ATP bindes deretter til myosinhodet, som igjen endrer konformasjon slik at bindingen til aktin svekkes, og kryssbindingen dissosieres i slutten av steg 3. ATP-hydrolyse brukes deretter til å returnere myosinhodet til høyenergikonfigurasjonen som det hadde da kontraksjonssirkelen startet. Hvert tykkfilament har rundt 350 myosinhoder, og siden hvert hode festes og frigjøres rundt fem ganger i sekundet under rask kontraksjon er det hele tiden mange kryssbindinger mellom myosin og aktin. Etter at nervestimulus stopper, vil ATP-pumper pumpe kalsiumionene inn i sarkoplasmatiske retikulum igjen. Dette gjør at bindingsstet til myosin på aktin ikke lenger er tilgjengelig, og kontraksjon opphører.

### 1.3 Post mortem muskel

Etter døden vil tilførsel av glukose og oksygen til muskelen, samt fjerning av stoffskifteprodukter, opphøre, siden blodtilførselen stopper (Hemmer, 1997). Muskelen vil likevel fortsette å gjendanne ATP fra energireservene i muskelen.

Det vil finnes noe oksymyoglobin i muskelen, som fungerer som en oksygenreserve en kort stund (Hemmer, 1997). Oksymyoglobin er omtalt nærmere i avsnitt 1.4. Etter at dette lageret er tømt vil karbohydrater spaltes anaerobt, slik at den resulterende melkesyren vil hope seg opp i muskelen og føre til et pH-fall. pH faller normalt til en verdi mellom 5,3 og 5,8 (Honikel, 1989). Dette er avhengig av type dyr og muskel. Noen av enzymene som katalyserer glykolysen vil inaktiveres ved lav pH, noe som vil føre til at glykolysen stopper dersom pH faller for mye (Hemmer, 1997). I tillegg kan glykolysen stoppe som følge av at glykogenreservene i musklene brukes opp. ATP-utbyttet fra anaerob spalting av karbohydrater er lavere enn ved aerob spalting, kun 2 mol per mol glukose i forhold til 36 mol per mol glukose (Rustad, 1998, revidert 2005).

Den lettest tilgjengelige energireserven er kreatinfosfat (Hemmer, 1997). Når det spaltes kan ATP gjendannes fra ADP. I tillegg vil ATP kunne gjendannes fra ADP ved hjelp av enzymet myokinase, som omdanner ADP til ATP og AMP.

Nedbrytningen av ATP fortsetter selv om gjendannelsen opphører, og innholdet av ATP synker (Hemmer, 1997). Kalsiumpumpen som pumper kalsiumioner tilbake til sarkoplasmatiske retikulum er avhengig av ATP, som nevnt i avsnitt 1.2, og muskelen vil dermed trekke seg sammen kontinuerlig når kalsiumionene ikke lenger fjernes. Når lageret av ATP er oppbrukt, vil heller ikke myosinhodet som er bundet til aktin lenger kunne forandre konformasjon for at kryssbindingen mellom aktin og myosin skal frigjøres (Hardin et al., 2012). Dette resulterer i *rigor mortis*, der muskelen låser seg i sammentrukket tilstand. Kryssbindingene mellom aktin og myosin akkumulerer i konformasjonen i slutten av andre steg i figur 1.2.2. Rigor inntreffer etter rundt 24-36 timer i storfe (Hemmer, 1997). Akselerasjon av rigor-prosessen vil bli beskrevet i avsnitt 1.5.

Myofilamentene i muskelcellene vil krympe på grunn av pH-fallet post mortem (Rustad, 1998, revidert 2005). Dette er fordi proteinene i myofilamentene har isoelektrisk punkt (pH

der proteinmolekylene ikke har noen elektrisk nettoladning) ved pH 5,3. Protein-protein interaksjonene er høye siden antall negative og positive sidegrupper er like, og tiltrekningskreftene er maksimale (Honikel, 1989). Vann i muskler kan forekomme bundet til myofibrillproteinene, eller det kan ligge i åpninger mellom proteinkjedene (Hemmer, 1997). Når myofilamentene krymper, vil plassen mellom og i myofilamentene også være mindre, noe som fører til at mindre vann kan immobiliseres i dette området (Honikel, 1989). Vannet vil forflyttes til sarkoplasma, og vil videre lekke ut i ekstracellulære rom før det ender opp på kjøttets overflate. Endring i pH forandrer altså kjøttets vannbindingsevne, dets evne til å holde på væske (Hemmer, 1997). Denne evnen er med på å bestemme hvor saftig kjøttet blir. Væsketap fra kjøttet kalles drypptap. Drypptapet kan få kjøttet til å se uappetittlig ut, og dårlig vannbindingsevne fører til både dårlig utbytte og kvalitet på produktet. I tillegg vil væsken være en god grobunn for bakterier.

Vannbindingsevnen i muskler endres også med tilsats av salt (Hemmer, 1997). Dersom natriumklorid tilsettes i kjøtt, øker vannbindingsevnen på grunn av at klorionene bindes til positive grupper på proteiner. Dette gjør at antall negative ladninger i forhold til positive ladninger på proteinene øker, og ladningene i proteinene frastøter hverandre. Det blir mer plass mellom myofibriller og filamenter igjen, og vannmolekyler forflyttes tilbake hit (Honikel, 1989). Maksimal svelling oppnås ved rundt 0,85 M (5 %) NaCl. Dersom kjøttet tilsettes for mye salt, vil vannbindingsevnen synke, da dette vil føre til at vann trekkes ut av produktet (Hemmer, 1997). Proteolytiske enzymer bidrar også til at vannbindingsevnen i muskelen synker ved at de degraderer proteinene. Det står mer om proteolytiske enzymer i avsnitt 1.6.

Etter slakt vil det også skje endringer i fett i kjøttet. Triglyserider er hovedbestanddelen i fettdepotene i kroppen, og fettsyrene som danner glyseridene har fra 14 til 18 karbonatomer og 0 til 3 dobbeltbindinger (Hemmer, 1997). Umettet fett er mer utsatt for oksidativ harskning enn mettet fett, og har et lavere smeltepunkt. Lipidoksidasjon induseres av oksygen i nærvær av varme, frie radikaler, lys og metallioner (Laguette et al., 2007). En av de viktigste prooksidantene i kjøtt er jern, som finnes i store mengder i myoglobin og hemoglobin, som inneholder hemgrupper som kan bindes til jernioner (Hemmer, 1997). Både jernionene og hemgruppene i myoglobin og hemoglobin kan virke som prooksidanter, hemgruppene ved at de danner komplekser med fett. Dette skjer imidlertid ikke dersom myoglobin er intakt,

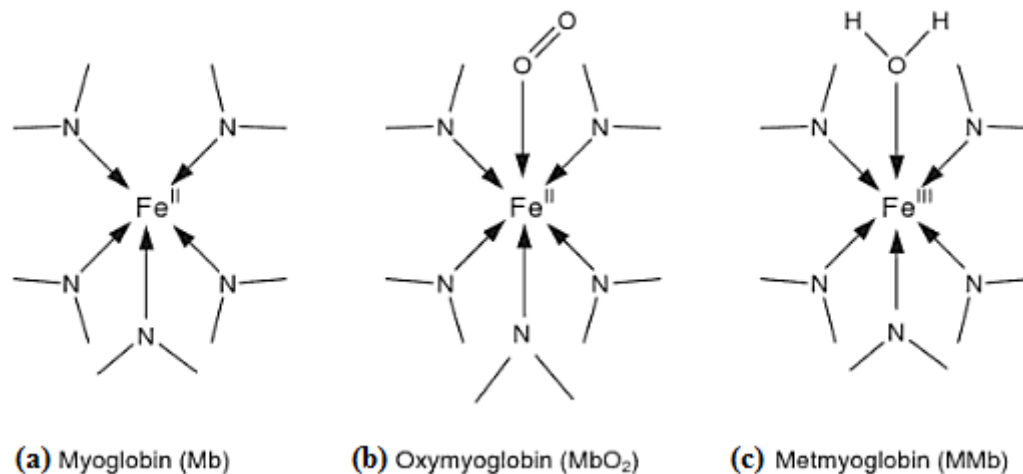
siden hemgruppen her er gjemt inne i en lomme i molekylet. Ved varmebehandling kan hemgruppen frigjøres ved at globinet denatureres. Myoglobin er nærmere omtalt i avsnitt 1.4.

Oksidasjon av fett gir i tillegg til alifatiske reaksjonsprodukter som aldehyder, ketoner, syrer og estere sykliske forbindelser som furaner og laktoner (Hemmer, 1997). Forbindelsene bidrar til kjøttaromaen, både positivt og negativt. Aromastoffene i sau finnes hovedsakelig i fett, som er svært mettet i gjennomsnitt. Det finnes likevel umettede fettsyrer i membraner i fettvevet og i muskelvevet, og disse fettsyrene kan lett oksideres. Det vil ikke bli gjort analyser av fett i denne oppgaven.

## 1.4 Farge i kjøtt

Noe av det første en forbruker bedømmer ved kjøp av kjøtt, er fargen kjøttet har. Hemoglobin er et av pigmentene som forårsaker kjøttets rødfarge, men når kjøttet er godt utblødd, utgjør forbindelsen bare 10 % av kjøttets totale pigmentmengde (Rustad, 1998, revidert 2005). Den viktigste forbindelsen som bidrar til kjøttets farge er myoglobin. Myoglobin er et protein som transporterer oksygen i muskler ved hjelp av hemgrupper, og som finnes i varierende mengde i ulike muskeltyper (Coulter, 2009). Hemgruppen i myoglobin inneholder et jernion som kan danne en midlertidig binding med et oksygenmolekyl. Myoglobin er rødfarget, og fargen avhenger av dyrets alder, art, muskeltype, samt jernionets tilstand. Når myoglobin (Mb) er i sin normale tilstand, er jernionet i dets reduserte form,  $Fe^{2+}$ , og fargen er mørk rød med en lilla tone. Når oksygen er bundet til proteinet i levende muskel, blir den resulterende forbindelsen kalt oksymyoglobin ( $MbO_2$ ). Jernionet endrer ikke tilstand, men oksymyoglobin har nå en klar rødfarge.

I post mortem muskel vil myoglobin på overflaten av kjøttet bli konvertert til oksymyoglobin på grunn av diffusjon av oksygen inn i overflaten, slik at kjøttet blir klart rødt i de øverste få millimeterne på overflaten og mørkt lillarødt inne i kjøttet (Coulter, 2009). Etter en stund vil imidlertid jernet i myoglobin bli oksidert ved grensesnittet mellom  $MbO_2$ - og Mb-lagene, der oksygennivået er noe under det som kreves for å danne  $MbO_2$ . Resultatet er at en ny forbindelse, metmyoglobin (MMb), som er brunfarget, dannes i grensesnittet mellom  $MbO_2$  og Mb. Over tid vil dette brunfargede laget utvide seg, og tilslutt vil overflaten også bli brun. Metmyoglobin er den mest stabile formen av myoglobin, og kjøttet holder seg derfor brunt etter dannelse av MMb (Hemmer, 1997). De ulike formene av myoglobin er vist i figur 1.4.1.



**Figur 1.4.1:** De tre tilstandene til jern i myoglobin. (a) Jern i vanlig myoglobin, i tilstanden  $Fe^{2+}$ . (b) Jern i oksymyoglobin, i tilstanden  $Fe^{2+}$ , bundet til oksygen. (c) Jern i metmyoglobin, i tilstanden  $Fe^{3+}$ , bundet til vann.

I muskel som kun brukes eksplosivt og som bryter ned glukose anaerobt istedenfor aerobt, er myoglobinnivået lavt, og musklene har en lys farge (Coulter, 2009). Et eksempel er musklene som brukes til flyging i fugler. Muskler som brukes mer eller mindre kontinuerlig vil derimot bryte ned glukose aerobt, og trenger derfor høyere nivåer av myoglobin for å få nok oksygen.

### 1.5 Mørning av kjøtt

Konsistens, altså om kjøttet er mørt eller seigt, er en viktig kvalitetsegenskap som varierer mye mellom ulike kjøttprodukter, samt mellom produkter som er oppbevart på ulik måte. Seighet i kjøtt kan skyldes flere faktorer. Den såkalte "bakgrunnsseigheten" er bestemt av hvor mye bindevev det finnes i kjøttet (Kjøttindustriens fellesforening, 1996). Kollagen er det bindevevsproteinene som det finnes mest av i kroppen, og det består av sammenflettede proteinkjeder (Hemmer, 1997). Antall tverrbindinger som finnes mellom kjedene i kollagen, samt styrken til bindingene, øker med dyrets alder. Ved oppvarming av kjøtt vil bindevev til en viss grad løses opp, men når dyret blir eldre vil bindevevet bli seigere og mer varmestabilt på grunn av det økte antallet kryssbindinger mellom kollagenfibrene. Bakgrunnsseigheten avhenger av type muskel og varierer for hvert enkelt dyr (Kjøttindustriens fellesforening, 1996). Totalt bindevev (i form av kollagen) i ytrefilet av storfe, lam og svin i mg/g våtvekt er

henholdsvis 3,0, 2,6 og 2,3 (Hildrum, 2010). Tallene er imidlertid basert på gjennomsnittstall og skjønnsmessige vurderinger.

Seighet kan også skyldes myofibrillproteinene, som kan trekke seg kraftig sammen dersom slaktet behandles feil, for eksempel ved kuldeforkorting som følge av for rask nedkjøling (Etherington, 1984). I avsnitt 1.2 ble det nevnt at kalsiumioner katalyserer muskelsammentrekning ved at de muliggjør at aktin og myosin kan danne kryssbindinger, og at kryssbindingene løses når kalsium fjernes. For at kalsiumioner skal kunne diffundere ut og inn av muskelcellene, må membranene være myke og bevegelige. Ved temperaturer under 10 °C vil lipider i membranene stivne, slik at membranene blir stive (Hemmer, 1997). Dette fører til at kalsiumionene ikke fjernes lett fra muskelen dersom kjøttet nedkjøles raskt, og muskelen trekkes ekstra kraftig sammen i det som kalles kuldeforkorting. Best kvalitet oppnås når slaktet kjøles sakte og får henge over lengre tid (Etherington, 1984). Sakte kjøling fører imidlertid til at faren for bakterievekst er større, samt at vekttapet under avkjølingen blir større (Hemmer, 1997).

Rigor-prosessen kan akselereres ved bruk av elektrisk stimulering. Ved elektrisk stimulering etterligner elektriske strømpulser nerveimpulsene i levende muskel som fører til muskelkontraksjon (Hemmer, 1997). Når musklene trekker seg sammen som følge av de elektriske strømpulsene, blir ATP og andre energirike forbindelser raskt oppbrukt, pH faller raskt og rigor mortis fremskyndes slik at den inntre før muskelen er helt kald. Under elektrisk stimulering vil også lysosomer ødelegges, og mørningsenzymmer vil dermed frigjøres på et tidlig tidspunkt etter slakt. Mørningsenzymmer er nærmere omtalt i avsnitt 1.6. Elektrisk stimulering av slakt brukes kun på storfe i Norge, men i New Zealand er elektrisk stimulering av sau- og lammeslakt rutine, og det er vist at elektrisk stimulering gjør sauekjøtt mørere.

12 til 24 timer etter rigor mortis inntre, begynner muskelen gradvis å mykne (Etherington, 1984). Dette skyldes ikke at kryssbindingene oppløses, men at de tynne filamentenes fester i Z-linjene ødelegges. Svekkelse av myofibrillene skyldes at proteolytiske enzymmer i muskelcellene forblir aktive etter døden, og det er noen av disse enzymene som skal studeres i denne oppgaven.

## 1.6 Proteolytiske enzymer

Tilgjengelig dokumentasjon tyder på at proteolyse av viktige myofibrillproteiner er hovedårsaken til mørning av kjøtt (Koochmaraie et al., 2002). Funksjonen til disse proteinene er å opprettholde strukturintegriteten til myofibriller. Proteolytisk degradering av disse vil dermed føre til svakere myofibriller, og igjen til mørning.

Proteolytiske enzymer kan deles inn i lysosomale og ikke-lysosomale enzymer (Etherington, 1984). Lysosomene er membranomgitte organeller i cellene, og enzymene her har optimal pH rundt 5 (Stahl et al., 2012). De ikke-lysosomale enzymene er aktive nær nøytral pH (Etherington, 1984).

Kalpainsystemet er ikke-lysosomalt, en av hovedregulatorene i proteindegradering i muskel og en nøkkelregulator i post mortem proteolyse (Koochmaraie et al., 2002). Kalpainsystemet befinner seg i sarkoplasma i muskelcellene, og består av de nøytrale endopeptidasene kalpainer, samt deres inhibitorprotein, kalpastatin (Hultmann, 2003). Kalpainene består av to subenheter, og aktiveres av kalsiumioner. Flere ulike former med ulike kalsiumbehov er identifisert, men de mest studerte er  $\mu$ -kalpain og m-kalpain, som har fått sine navn etter hvor mye kalsium de trenger for å aktiveres.  $\mu$ -kalpain trenger kun en konsentrasjon av  $\text{Ca}^{2+}$ -ioner på 50 til 100  $\mu\text{M}$  (Warriss, 2010), mens m-kalpain trenger en konsentrasjon på 1-2 mM (Etherington, 1984). *Post mortem* konsentrasjoner av frie  $\text{Ca}^{2+}$ -ioner kan øke til mengder som er nok til å aktivere både  $\mu$ - og m-kalpain (Hultmann, 2003).

Myofibrillnettverket brytes ned til myofilamenter, som brytes videre ned til polypeptider og endelig til frie aminosyrer (Koochmaraie et al., 2002). Kalpainsystemet er den beste kandidaten til å starte fjerning av myofilamenter fra overflaten av myofibriller. Dette er fordi pH rett etter slakt er tilnærmet nøytral, og kalpainene er aktiv ved denne pHen. I tillegg er systemet det eneste som kan lage spesifikke spaltninger som trengs for å frigjøre myofilamenter. Når myofilamentene er frigjort, degraderes disse til enkeltproteiner, som ved hjelp av lysosomale katepsiner og andre peptidaser degraderes til mindre peptider og frie aminosyrer.

Katepsinene er de viktigste lysosomale proteasene (Etherington, 1984), og de viktigste katepsinene som er involvert i mørning av kjøtt, er katepsinene B, L, H og D (Cheret et al.,



2007). Det er valgt å studere katepsin B-lignende enzymer i denne oppgaven, et enzym som er hovedsakelig proteolytisk aktiv i pH-området 3,0-6,0 (Etherington, 1984).

Under mørning vil membranstrukturer disintegre over tid, og væske vil lekke fra intracellulære rom ut i ekstracellulære rom (Honikel, 1989). Den ekstracellulære væsken som kan fjernes ved sentrifugering kalles cellevevsvæske eller CTF (cell tissue fluid). Aktiviteten til lysosomale enzymer i CTF kan dermed fungere som en spesifikk indikator på lekkasje fra lysosomer (Nilsson og Ekstrand, 1994). Måling av aktiviteten i homogenat, supernatant etter sentrifugering av mekanisk ødelagt kjøtt i ekstraksjonsvæske, vil gi den totale aktiviteten til enzymet i kjøttet. Aktiviteten av katepsin B-lignende enzymer i CTF i forhold til deres aktivitet i homogenat sier altså noe om hvor mye katepsin B som har lekket fra cellene og ut i cellevevsvæsken. Forholdet blir dermed et mål på grad av membranødeleggelser i vevet. Tillaging av CTF og homogenat er beskrevet i avsnitt 2.5.

Det vil i denne oppgaven bli sett på aktiviteten av katepsin B i lammekjøtt oppbevart ved kjøleromstemperatur, i superkjølt lammekjøtt og i fryst/tint lammekjøtt. Dette vil gjøres for å sammenligne grad av lekkasje av katepsin B fra lysosomer ved bruk av de ulike lagringsmetodene, som vil si noe om forskjellen i membranødeleggelser i prøvene. Lignende studier er gjort på aktivitet av det lysosomale enzymet  $\beta$ -N-glukosaminidase (NAG), som ble brukt som en indikasjon på effekt av frysing og tining på membranintegritet i regnbueørret (Nilsson og Ekstrand, 1993). Andre studier er gjort med det lysosomale enzymet  $\alpha$ -glukosidase i laks, der effekten av frysing, superkjøling og lagring på is ble sammenlignet (Gallart-Jornet et al., 2007). Forandringer i kjøtt som følge av frysing/tining vil bli nærmere gjennomgått i avsnitt 1.7.

## 1.7 Oppbevaring av kjøtt

For å øke holdbarhetstiden til kjøtt ved å hemme mikrobiell vekst og enzymaktivitet, er den viktigste faktoren temperatur (Kaale et al., 2011). Den mest vanlige formen for konservering av kjøtt, er nedkjøling (Duun, 2008). Ifølge forskriften om næringsmiddelhygiene (Næringsmiddelhygieneforskriften, 2008), skal lettbederlige næringsmidler oppbevares ved 4 °C eller kaldere. Ved rask nedkjøling hemmes aktiviteten av enzymer raskt, mens enzymaktivitet vil føre til at kjøttet blir tidligere mørt dersom kjøttet nedkjøles sakte (Etherington, 1984). Kjølning kombinert med det naturlige pH-fallet i kjøtt gir i tillegg dårlige vekstforhold for mikroorganismer (Hemmer, 1997). For sakte nedkjøling vil imidlertid gi



uønsket bakterievekst, mens for rask nedkjøling kan gi kuldeforkortning i musklene. Nedkjølingshastigheten må derfor tilpasses.

Frysing er en prosess som gjør at matens kvalitet opprettholdes i lengre perioder enn ved kjølelagring (Duun, 2008). Fryste næringsmidler skal oppbevares ved temperaturer under  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Forskrift om dypfryste næringsmidler, 2008). Ved  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  er 90 % av vannet i vevet fryst ut til krystaller (Honikel, 1989). Iskrystallene dannes først i ekstracellulær væske, og konsentrasjonen av oppløste stoffer i gjenværende væske vil dermed øke. Dette gjør at vann forflyttes fra intracellulære rom ut i ekstracellulære rom ved hjelp av osmose. Det påvirker også enzymaktiviteten, se avsnitt 1.8. Grunnen til at den ekstracellulære væsken fryser først, er at totalkonsentrasjonen av ioniske partikler inne i cellene er høyere enn utenfor cellene (Zaritzky, 2012). Dette er fordi cellene inneholder en høyere konsentrasjon av ikke-diffuserbare ioner enn den ekstracellulære væsken. Det er dermed forventet at intracellulær væske har et lavere frysepunkt enn ekstracellulær væske.

Frysing fører til økt drypptap, og drypptap ved tining vil føre til et økonomisk tap på grunn av tap av vekt (Honikel, 1989). Drypptap vil også føre til at kjøttet blir blekere, og den våte overflaten fører til økt mikrobiell vekst. Vannløselige næringsmidler som salt, vitaminer, proteiner og smaksforbindelser tapes også med dryppet. For å forutsi mengde drypptap, må frysing og tining vurderes sammen. Ved sakte innfrysing av muskelvev, vil det dannes store iskrystaller kun i ekstracellulære rom (Honikel, 1989). Cellemembraner i vevet vil dermed penetreres av krystallene, noe som fører til tap av struktur. Raskere innfrysing vil føre til at mindre iskrystaller dannes, både inne i og utenfor cellene (Zaritzky, 2012). Vannet vil dermed ikke forflyttes fra intracellulære til ekstracellulære rom i like høy grad (Honikel, 1989). Rask tining av raskt fryst kjøtt har ikke noen store effekter, og drypptapet er lavt. Sakte tining av raskt fryst kjøtt fører til at iskrystaller vokser under tining og forårsaker lekkasje på membraner slik at mengden vann i ekstracellulært rom øker. Ved rask tining av sakte fryst kjøtt vil ikke vann reabsorberes i myofibrillene, og det vil bli et høyt drypptap. Sakte tining av sakte fryst kjøtt muliggjør at vannet blir delvis reabsorbent, men store iskrystaller vil ha skadet myofibrillene, og dette vil føre til et større drypptap.

Temperatursvingninger vil også føre til at små iskrystaller kan smelte og rekrystalliseres, og dette vil føre til at krystallene blir større (Duun, 2008). Dette er fordi krystallene vokser

sammen til større krystaller. Større krystaller vil forårsake økt drypptap (Magnussen et al., 2008). Rekrystallisering av is vil omtales nærmere i avsnitt 1.8.

## 1.8 Superkjøling

En annen metode for oppbevaring av kjøtt er superkjøling. Superkjøling innebærer at kjøtt oppbevares ved en temperatur mellom initialt frysepunkt for kjøttet og 1-2 °C under dette punktet (Duun og Rustad, 2007). Det initiale frysepunktet er den temperaturen der det først dannes is i kjøttet. Superkjøling har i tidligere studier vist å øke holdbarhetstiden til kjøttprodukter. Det ble for eksempel vist at holdbarhetstiden til svinekjøtt ble økt fra 2 til 16 uker ved bruk av superkjøling fremfor vanlig kjøling (Duun, 2008). Tilsvarende har det blitt vist at holdbarhetstiden for torsk ble økt fra 9 til 16/17 dager ved bruk av superkjøling fremfor vanlig kjøling (Wang et al., 2008).

Superkjøling kan brukes før tradisjonell kjøledistribusjon eller opprettholdes gjennom hele lagringsperioden samt ved distribusjon (Duun, 2008). Vanligvis består superkjøling av to trinn: innfrysing og lagring. I det første stadiet kjøles maten raskt. Hurtig varmefjerning er mulig ved store temperaturforskjeller mellom kjølemedie og produkt og/eller ved god varmeoverføringskoeffisient (Magnussen et al., 2008).

Innfrysing kan oppnås ved flere metoder, blant andre luftkjøling og bruk av kryogene gasser (CO<sub>2</sub> og N<sub>2</sub>) (Magnussen et al., 2008). Ved luftkjøling blir produktet utsatt for kalde luftstrømmer med høy hastighet (Duun, 2008). Ved bruk av kryogene gasser til nedkjøling, blir de tilført produktet direkte i en enkel kryogentank med sprayutstyr (Zhou et al., 2010). Produktet blir fortere fryst sammenlignet med luftkjøling, siden temperaturforskjellen mellom gass og produkt er stor og på grunn av den raske varmetransporten som resulterer fra kokingen av kryogengassen. Flytende nitrogen har en temperatur på rundt -196 °C, mens karbondioksid i fast form holder -78 °C (Kaale et al., 2011). Bruk av kryogene gasser kan imidlertid påvirke produktets utseende, og metoden er kostbar (Zhou et al., 2010). I denne oppgaven vil det kun sees på luftkjøling av kjøttet.

Skallfrysing innebærer at kun det ytterste laget av kjøttet fryses. Ved skallfrysing og påfølgende lagring ved superkjølingsbetingelser blir tiden inne i kjøleutstyret kortet ned sammenlignet med tradisjonell kjøling, siden is dannes i det ytterste laget av produktet

(Magnussen et al., 2008). Dette gjør at drivkraften for varmefjerning fra det indre av produktet blir stor. Det oppstår en temperaturgradient, der det indre av produktet er varmere enn overflaten.

Etter kjøling plasseres maten umiddelbart ved ønsket temperatur (Magnussen et al., 2008). Temperaturgradienten mellom det indre og det ytre av produktet utjevnes ved at varme fjernes fra det indre av produktet. Etter at temperaturen er utjevnet, vil resterende is kunne fungere som en kuldereserve som absorberer varme fra omgivelsene, slik at produktets indre temperatur ikke endres mye. Iskrystallene fungerer dermed som et internt isreservoar under distribusjon eller lagring i korte perioder, og kjøttet holder seg kaldt lengre (Kaale et al., 2014). Ved superkjølingstemperaturer vil det meste av mikrobiell aktivitet inhiberes eller opphøre (Magnussen et al., 2008). I tillegg til disse fordelene, vil en delvis fryst overflate gjøre det lettere å kutte kjøttprodukter jevnt. Skallfrysing med påfølgende superkjøling vil i enkelte tilfeller bare bli kalt ”superkjøling”.

Temperaturen bør holdes konstant under superkjølt lagring for å hindre smelting av is med påfølgende rekrystallisering av iskrystaller (Duun, 2008). Ved slik smelting og rekrystallisering, vil krystallene bli større, da flere krystaller vokser sammen til én. Små krystaller er termodynamisk ustabile siden de har et høyt overflate-til-volum-forhold, og dannelsen av færre, men større, krystaller vil redusere den frie energien (Zaritzky, 2012). Større krystaller vil forårsake mikrostrukturelle endringer i vevet under frysing, noe som blant annet fører til drypptap og at vevet krymper under tining (Magnussen et al., 2008). I temperaturområdet for superkjøling vil selv små forandringer i temperatur føre til endringer i mengde is som er fryst ut, eksempelvis vil 2 % av vann i storfekjøtt være fryst ut ved  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mens ved  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  vil hele 64 % være fryst (Mackie, 1993b). For å holde mengden is konstant, må det derfor være god kontroll på lagringstemperaturen.

Holdbarhetstiden for superkjølte produkter er langt kortere enn for fryste produkter, da en større del av vannet forblir i væskeform i superkjølt mat (Duun, 2008). Konsentrasjonen av oppløste stoffer øker i det ufryste vannet, noe som vil påvirke proteiner og enzymer i muskelen (Mackie, 1993a). Denne oppgaven vil, som tidligere nevnt, sammenligne endringer i enzymaktivitet under en lagringsperiode av lammekjøtt ved bruk av superkjøling med aktiviteten i ferske og fryste/tinte lammestykker. Det vil i tillegg bli sett på hvordan tilsats av salt vil påvirke enzymaktiviteten. Dette vil legge grunnlaget for å kunne si noe om hvordan

enzymer i superkjølt lammelår vil opptre ved tillaging av fenalår i forhold til i ferske og fryste lammelår.

## 1.9 Fenalår

Fenalår lages fra lamme- eller sauelår på over 3 kg, og vanlige saltemetoder er tørrsalting og lakesalting (Håseth et al., 2007). Før saltingen fjernes blodrester og halebein (Kjøttindustriens fellesforening, 1996). Ved tørrsalting gnis lårene inn med fint salt, og legges i lag i kar med steinsalt mellom hvert lag. Steinsalt er naturlig forekommende natriumklorid som vanligvis krystalliseres i kuber (Store norske leksikon, 2011). Saltet kan utvinnes ved direkte bryting fra saltstokker. (Raade, 2009). Det kan også utvinnes fra saltblokker forurenset av leire, gips eller lignende ved at kamre hugges ut i saltblokkene, for deretter å fylles med vann. Den resulterende saltlaken kokes deretter inn.

Ved lakesalting blir enten hele kjøttstykker lagt i lake, eller laken blir sprøytet inn i kjøttet (Hemmer, 1997). Saltkonsentrasjonen i laken er avhengig av størrelse på kjøttet, og hvilken sluttkonsentrasjon av salt kjøttet skal ha. Tørrsalting er imidlertid den vanligste metoden for salting av fenalår.

Ved tørrsalting dannes det saltlake på overflaten av lamme- eller sauelåret på grunn av overflatens fuktighet (Hemmer, 1997). Temperaturen er rundt 4 °C ved salting (Animalia, 2012; Matprat.no, 2014b). Mellomstore lammelår på rundt 3,5 kg må saltes i rundt 5 døgn, mens lår fra sau trenger et døgn ekstra saltetid (Kjøttindustriens fellesforening, 1996). Lår som har vært fryst må derimot saltes i et døgn mindre enn ufryste lår. Dette er fordi tining av fryste lår resulterer i økt porøsitet i kjøttet, og dette fører til at saltet lettere trenger inn i kjøttet (Toldrá, 2002). Denne oppgaven vil undersøke om dette også vil kunne gjelde for superkjølte lammelår.

Etter salting må lårene modnes, og dette tar rundt 7 døgn (Kjøttindustriens fellesforening, 1996). Modning vil si at saltet jevner seg ut i hele låret. Etter modningsperioden utvannes lårene i rundt 3 timer og henges deretter til tørking til et vekstvinn på rundt 30 % er oppnådd. Klimatiseringstemperaturen er rundt 14 °C, og luftfuktigheten er 70-75 %. Lårene tørkes i 60-90 dager (Animalia, 2012; Matprat.no, 2014b).

Det er visse regler som må følges for at fenalår skal kunne kalles ”Fenalår fra Norge” (Forskrift om Fenalår som geografisk betegnelse, 2012). Det er to typer fenalår som havner inne i denne kategorien, nemlig ”Tradisjonelt” og ”Modnet”. For å klassifiseres som Tradisjonelt, må saltinnholdet i fenalåret være maksimalt 9 % og ha et svinn på minst 30 %, mens fenalår av typen Modnet skal ha et saltinnhold på maksimalt 7 % og et vekttap på minst 35 %. I denne oppgaven vil det måles enzymaktivitet i homogenater og CTF fra kjølte, superkjølte og fryste/tinte lår med og uten salt i reaksjonsbufferen for å se om aktiviteten påvirkes forskjellig av salt-tilsats i kjøtt fra de ulike lagringsmetodene.

### 1.10 Bakgrunn for metoder

De viktigste analysemetodene som er brukt i denne oppgaven er: Biorad-metoden og Lowry-metoden for bestemmelse av henholdsvis mengde vannløselige proteiner og syreløselige peptider i prøvene, fluorescens-spektroskopi for bestemmelse av kalpain- og katepsin B-aktivitet i prøvene og reversfase HPLC for å bestemme mengde frie aminosyrer i lam fra høsten 2013. Grunnen til at Lowry-metoden ble brukt til deteksjon av syreløselige peptider, er at biorad-metoden har en nedre grense for deteksjon av peptider på 3-5 kDa (Bio-Rad Laboratories Inc., 2013).

*Biorad- metoden* er basert på at fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 skifter farge når det bindes til proteiner (Bradford, 1976). Dette fargestoffet finnes i tre former med ulike farger: kationisk (rød), nøytral (grønn) og anionisk (blå) (Bio-Rad Laboratories Inc., 2013). Dette fører til at fargestoffet er rødt under sure tilstander, og det har derfor en maksimal absorbans ved 470 nm. Fargen endres til blå når fargestoffet bindes til proteiner, siden det da er i sin stabile anioniske form. Maksimal absorbans endres dermed til 595 nm. Ved å måle absorbansen for kjente konsentrasjoner av et standardprotein, kan en lage en standardkurve for å finne omtrent konsentrasjon av ukjente proteiner i løsning. Standardproteinet brukt i denne oppgaven er bovint serum albumin (BSA).

*Lowry-metoden* er basert på at proteinet reagerer med kobber i alkalisk løsning og danner et kompleks (Lowry et al., 1951). Komplekset reagerer så med folinreagens og fører til at folinreagensen skifter farge fra gul til blå. Maksimal absorbans endres dermed til 750 nm, og på samme måte som i biorad-metoden, vil en standardkurve kunne brukes til å finne konsentrasjonen av proteiner i løsning.

*Fluorescens* er resultatet av at molekyler absorberer fotoner som eksiterer elektroner i molekylene. I denne oppgaven er det sett på aktivitet av katepsin B-lignende enzymer og kalpain-lignende enzymer. Katepsin B-lignende enzymer spalter av 4-metylcoumarin fra sitt substrat, peptidet N<sub>α</sub>- karbobenzoxy-L-arginyl-L-arginin-7-amido-4-metylcoumarin (Barrett og Kirschke, 1981), mens kalpain-lignende enzymer gjør det samme med sitt substrat, N-succinyl-leu-tyr-7-amido-4-metylcoumarin. Ved å stille inn et fluorimeter slik at det sender ut fotoner som 4-metylcoumarin absorberer og slik at det detekterer de resulterende fotonene 4-metylcoumarin sender ut, kan proteasenes aktivitet måles som økning i fluorescens-intensitet i forhold til blankprøver som inneholder substratet uten enzymer. Fluorimeteret stilles inn med bølgelengder som beskrevet i avsnitt 2.6.

Proteiner og aminosyrer kan separeres ved bruk av kolonnekromatografi (Nelson et al., 2008). Et porøst materiale, f. eks kuler av en polymer, utgjør stasjonær fase. Proteinløsningen sendes gjennom den stasjonære fasen ved hjelp av en bufferløsning, som kalles den mobile fasen. Ulike proteiner og aminosyrer vandrer med den mobile fasen i ulik hastighet gjennom kolonnen etter hvilke egenskaper de har, for eksempel størrelse eller ladning, som resulterer i ulike bånd med proteiner eller aminosyrer. *HPLC (High-performance liquid chromatography)* er en form for kolonnekromatografi. Høytrykkspumper brukes til å øke hastigheten til molekylene ned kolonnen, noe som fører til en bedre oppløsning på de resulterende proteinbåndene. I denne oppgaven er reversfase HPLC brukt til å finne total mengde frie aminosyrer i løsningene, se avsnitt 2.8. Reversfase HPLC går ut på adsorpsjon av hydrofobe molekyler på en hydrofob stasjonær fase med en polar mobil fase (Tosoh Bioscience LLC, Ingen dato). Ved å tilsette et organisk løsemiddel, reduseres den mobile fasens polaritet, og desorpsjon av de hydrofobe molekylene vil skje. Mer hydrofobe molekyler vil bruke mer tid adsorbent på den stasjonære fasen, og vil behøve mer organisk løsemiddel for desorpsjon.

## 2 Materialer og metoder

Det ble utført forsøk på både lammekjøtt og svinekjøtt i denne oppgaven. Lammekjøtt ble mottatt både høsten 2013 og våren 2014.

### 2.1 Lammekjøtt høsten 2013

Homogenat og CTF fra lammekjøtt fra Fatland AS' slakterier på Jæren ble laget som en del av prosjektoppgaven "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013). Prosjektoppgaven var en del av samarbeidsprosjektet BIP OptiLam mellom Fatland AS, SINTEF Energi AS og NTNU Bioteknologi. Lammekjøtt ble mottatt fra SINTEF Energi AS, som hadde oppbevart kjøttet vakuumpakket ved henholdsvis 4 °C (ferskt lam) og ved -1,6 °C (superkjølt lam). Det superkjølte kjøttet var tint på kjølerom ved 4 °C i 24 timer før det ble mottatt, og alt kjøtt ble mottatt benfritt. Prøver fra både ytterkant og midtstykke ble mottatt, som vist for et lammelår med ben i figur 2.1.1. Uttak av ferske og superkjølte prøver ble gjort i tiden etter slakt og superkjøling som vist i tabell 2.1.1. Metode for superkjøling ved SINTEF Energi er beskrevet i avsnitt 2.4, metode for tillaging av homogenat og CTF er beskrevet i avsnitt 2.5.



**Figur 2.1.1:** Lammelår med midtstykke og ytterkant markert i henholdsvis rødt og blått. Lammekjøttet mottatt fra SINTEF Energi høsten 2013 var utbenede kjøttstykker.

*Tabell 2.1.1: Uttakstider av lammekjøtt etter slakt og etter skallfrysing av superkjølte prøver.*

<b>Uttak</b>	<b>Tid etter slakt [Dager]</b>	<b>Tid etter skallfrysing/superkjøling [Dager]</b>
1	5	3
2	9	7
3	13	11
4	16	14
5	20	18
6	23	21
7	27	25
8	30	28
9	34	32
10	37	35
11	41	39

## 2.2 Svinekjøtt

Det ble laget homogenat fra ytrefilet av svin kjøpt på Meny for å teste ulike buffere for ekstrahering av proteiner, samt for å finne ideelle betingelser for målinger av kalpain-lignende proteolytisk aktivitet. Ekstrakter ble laget fra kjøttet etter kjøp og etter oppbevaring ved 4 °C i syv dager etter kjøp, samt fra kjøtt fryst i syv dager. Homogenat ble laget som beskrevet i avsnitt 2.5, mens måling av aktivitet av kalpain-lignende enzymer er beskrevet i avsnitt 2.6.

## 2.3 Lammekjøtt våren 2014

Fire hele, vakuumpakkede lammelår ble fraktet med fly fra Fatland AS' slakterier på Jæren og lagt i kjøleskap på 4 °C dagen etter slakt. Slaktedato var 11. mars 2014. Tre lammelår ble superkjølt ved SINTEF Energi AS etter to dager i kjøleskap. Metoden for superkjøling er beskrevet i avsnitt 2.4. Det siste lammelåret ble oppbevart vakuumpakket ved 4 °C ved NTNU Bioteknologi, og emballasjen ble åpnet en uke etter slakt. Emballasjen på et av de superkjølte lammelårene ble åpnet samme dag etter at kjøttet hadde tint ved 4 °C over natten. Lammekjøtt oppbevart ved 4 °C blir heretter kalt ferskt. Kjøttet fra ferskt lam ble fordelt i



lynlåposer av plast, der luft ble fjernet så godt det lot seg gjøre ved å senke posen i vann og skyve luften ut. Homogenat og CTF av både superkjølt og ferskt kjøtt ble laget som beskrevet i avsnitt 2.5. Homogenat og CTF fra både ferskt og superkjølt lam ble laget 1, 2 og 3 uker etter slakt, som tilsvarer 4, 11 og 18 dager etter superkjøling.

Hele, vakuumpakkede lammelår fra lam slaktet 11. mars 2014 ble fryst ved Fatland AS' slakterier på Jæren og fraktet til Trondheim med frysebil. De ble så lagt på frys ved SINTEF Energi AS, og de ble her tatt opp til tining tre uker og to dager etter slakt. Det ene lammelåret ble tint ved 4 °C over 4 døgn, det andre lammelåret ble tatt opp av frysen samtidig, men tint uten vakuumpakningen i rennende vann ved 8,6 °C i 17,5 time før det ble lagt på 4 °C. Begge lårene ble mottatt hele ved NTNU Bioteknologi 27 dager etter slakt. Homogenat og CTF fra begge lammelår ble laget som beskrevet i avsnitt 2.5.

## 2.4 Superkjøling

Metoden benyttet av SINTEF Energi for superkjøling, var skallfrysing i luft med påfølgende oppbevaring av lammekjøttet ved rundt -1,6 °C. En "impingement"-fryser ble benyttet for å oppnå skallfrysing. En impingement-fryser fungerer ved at kjøttet plasseres på et produktbånd og utsettes for avkjølt luft under trykk. Plater med dysehull er plassert over og under kjøttet. En vifte bygger opp trykk og tvinger luft avkjølt til -38 °C gjennom platene mens produktbåndet beveger kjøttet frem og tilbake i fryseseonen. Dette fører til en god fordeling av den kalde luften. Oppholdstiden i impingement-fryseren ble satt til 7 minutter for å oppnå en andel av is på ca 15 % av vannet i kjøttet, et estimat basert på tidligere forsøk gjort av SINTEF Energi (Samtale med Erlend Indergård (forsker ved SINTEF Energi AS), 2013).

## 2.5 Tillaging av homogenat og CTF

Kjøttstykker fra svin og lam ble mottatt og oppbevart som beskrevet i avsnittene 2.1, 2.2 og 2.3. Av svinekjøttet ble det kun laget homogenat, mens av lammekjøttet fra høsten 2013 ble det laget homogenat og to paralleller med CTF for hvert kjøttstykke mottatt. Fra lammekjøttet fra våren 2014 ble det laget homogenat og fire paralleller med CTF. Dette ble gjort basert på erfaringene fra høsten 2013, der det viste seg at to paralleller ga for lite CTF til å utføre alle analyser høsten 2013. Før tillaging ble bein og fett fjernet fra kjøttet.

Homogenater ble laget som beskrevet av Hultmann et al (2004), med noen modifikasjoner. Rundt 15 g kjøtt ble kvernet i en hurtigmikser i 15 sekunder. 10 g av det kverneede kjøttet ble deretter veid ut nøyaktig og overført til et lite sentrifugerør. Det ble deretter tilsatt 20 mL ekstraksjonsvæske (buffer eller destillert vann, presisert senere), før prøven ble homogenisert ved hjelp av en laboratoriekvern (IKA T 10 basic Ultra-Turrax disperser). Suspensjonen ble holdt på is i 30 minutter før sentrifugering ved 14500 x g og 4 °C i 20 minutter. Etter sentrifugering ble prøven filtrert gjennom glassull over i en 25 mL målekolbe og tilsatt ekstraksjonsvæske til merket. Eppendorfrør med 1 mL homogenat i hver ble lagret ved -20 °C.

Lammekjøttet fra høsten 2013 og våren 2014 ble homogenisert med destillert vann som ekstraksjonsvæske. Svinekjøttet ble homogenisert med to ulike ekstraksjonsvæsker. En parallell ble ekstrahert med destillert vann (Hultmann og Rustad, 2003), en annen parallell ble ekstrahert med en ekstraksjonsbuffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, justert til pH 7 (Revidert fra Hultmann og Rustad, 2002).

*Måling av pH* ble gjort ved å blande rundt 3 g kvernet kjøtt i 3 mL 0,15 M KCl-løsning.

CTF ble separert ut fra mellom 15 og 20 g lammekjøtt. Kjøttet ble skåret i små biter og veid ut nøyaktig før det ble plassert i sentrifugerør og sentrifugert ved 27000 x g og 4 °C i 30 minutter (Nilsson, 1994; Nilsson og Ekstrand, 1993). Væsken ble pipettert ut i eppendorfrør med automatpipette før en pasteurpipette av plast ble brukt til å overføre siste rest til nye, forhåndsveide eppendorfrør. Eppendorfrørene ble deretter veid på ny, og det ble antatt at 1 g prøve tilsvarte 1 mL prøve for å finne totalt volum CTF.

Mengden vannløselige proteiner i homogenat og CTF ble målt ved hjelp av BioRad Protein Assay (biorad-metoden) (Bradford, 1976), med bovint serum albumin (BSA) som standardprotein. Hver prøve ble analysert i tre paralleller. Resterende prøve ble deretter oppbevart ved -20 °C i eppendorfrør.

## **2.6 Aktivitet av proteolytiske enzymer**

Ved måling av proteolytisk aktivitet ble 100 µL av prøvene tilsatt i 100 µL reaksjonsbuffer ved ønsket pH. En blank ble laget ved å tilsette 100 µL reaksjonsbuffer i 100 µL destillert

vann. Reagensrørene med prøve og blank ble satt i vannbad, kjølerom eller kjøleskap ved ønsket inkuberingstemperatur. Etter 5 minutter ble reaksjonen startet ved å tilsette 100 µL substrat. Etter ønsket inkuberingstid ble reaksjonen stoppet ved tilsats av 3,0 mL buffer bestående av 1 % SDS og 50 mM bis-Tris tilsatt HCl for å oppnå pH 7.0. Blankprøven ble tilsatt substrat og stopp-buffer til samme tid som resten av prøvene.

Fluorescens ble målt ved en emisjonsbølglengde på 360 nm (10 nm slits) og en eksitasjonsbølglengde på 460 nm (10 nm slits) for alle prøver. Instrumentet som ble benyttet var av typen "Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS50B". Hver av prøvene ble analysert i tre paralleller. Verdien for tilhørende blankprøve ble trukket av fra hver prøves intensitet.

### ***Aktivitet av kalpain-lignende enzymer***

Det ble målt aktivitet av kalpain-lignende enzymer i homogenat fra lammekjøtt fra høsten 2013, samt i homogenat fra svinekjøtt fra våren 2014. Aktivitet ble målt mot substratet N-succinyl-leucin-tyrosin-7-amido-4-metylcoumarin (SLT) (Sasaki et al., 1984).

I det første forsøket på å måle kalpainaktivitet i homogenater fra lam høsten 2013. ble reagensrørene straks flyttet til en isoporboks fylt med is etter tilsats av stopp-buffer, men da dette gjorde at blandingen ble blakket, ble dette trinnet fjernet i videre forsøk.

Ved måling av kalpain-lignende aktivitet ble det målt kalsium-avhengig aktivitet ved å subtrahere kalsium-uavhengig aktivitet fra total aktivitet mot substratet (Hultmann, 2003), slik at prøvene måtte måles to ganger i to ulike reaksjonsbuffer. Det ble brukt tre ulike sett av reaksjonsbuffer, oppsummert i tabell 2.6.1. Kombinasjon 2 ble brukt i sammenheng med svineekstrakter, både ekstrakter som ble oppbevart i kjølerom over natten og med ekstrakter som ble oppbevart i fryser ved -20 °C. Det ble også brukt to ulike konsentrasjoner av substratet, SLT, i ulike kombinasjoner, nemlig 0,09375 mM (Barrett og Kirschke, 1981) og 0,125 mM (Hultmann, 2003). Inkuberingstemperaturen var 30 °C, da dette ligger nær fysiologisk temperatur, der kalpainer er aktive. I en studie ble det i tillegg funnet at kalpainer isolert fra lammekjøtt er mer aktive ved 25 °C enn 4 °C (Ceña et al., 1992). pH- optimum for kalpainer ligger rundt 7,4-7,6 (Edmunds et al., 1991), og pH i reaksjonsbufferne ble derfor satt til 7 eller 8, som vist i tabellen.

**Tabell 2.6.1:** Reaksjonsbufferer ved måling av kalpain-lignende aktivitet. Målingene ble gjort ved 30 °C.

Kombinasjon (kilde til kombinasjon)	Reaksjons- buffer 1 (Total aktivitet)	Reaksjons- buffer 2 (Kalsium- uavhengig aktivitet)	pH	Substrat- konsen- trasjon	Inku- basjons- tider	Prøver målt på
1 (Hultmann og Rustad, 2003)	100 mM bis- Tris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 2 mM DTT	100 mM bis- Tris, 20 mM EDTA, 2 mM DTT	7	0,09375 mM	15 min	Lam, uttak 1 (alle prøver fra 2013)
2 (Revidert fra Hultmann og Rustad, 2002)	100 mM bis- Tris, 5 mM CaCl <sub>2</sub>	100 mM bis- Tris, 5 mM EDTA	7	0,09375 mM	1 time, 2 timer	Svin, alle prøver
3 (Revidert fra Hultmann og Rustad, 2002)	100 mM Tris- HCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub>	100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA	8	0,125 mM	1 time, 2 timer	Svin, alle prøver, lam, uttak 1, 8 og 11 (alle prøver fra 2013)

### **Aktivitet av katepsin B-lignende enzymer**

Aktiviteten av katepsin B-lignende enzymer ble målt i to ulike reaksjonsbufferer. Den ene reaksjonsbufferen bestod av 150 mM bis-Tris, 30 mM EDTA og 6mM DTT, og den andre bestod av 150 mM bis-Tris, 30 mM EDTA og 6mM DTT tilsatt 15 vekt/volum % salt, slik at endelig saltkonsentrasjon ved reaksjon mellom enzym og substrat var 5 %. Substratet tilsatt for måling av katepsin B-lignende aktivitet var 0,09375 mM N<sub>α</sub>- karbobenzoxy-L-arginyl-L-arginin-7-amido-4-metylcoumarin (Barrett og Kirschke, 1981).

I prosjektoppgaven (Friestad, 2013) ble aktiviteten av prøvene fra lammekjøtt kun målt i den førstnevnte reaksjonsbufferen (uten salt), ved 30 °C og pH 6, da dette under innledende forsøk

ble funnet å være den temperatur og pH der aktiviteten av katepsin B var høyest. Alle prøver fra lammekjøtt fra 2014 ble målt i begge reaksjonsbufferne ved temperaturene 4 °C, 14 °C og 30 °C. Dette er, som nevnt i avsnitt 1.9, temperaturer ved salting (4 °C) og klimatisering (14 °C) ved tillaging av fenalår, og katepsin B-aktiviteten ble i 2013 målt ved 30 °C. I tillegg skilte fremgangsmåten våren 2014 seg fra fremgangsmåten høsten 2013 i det at tiden for utjevning av temperatur i prøvene før tilsetting av substrat var 5 minutter i 2014 sammenlignet med 15 minutter i 2013. Prøvene i 2013 ble satt på is etter tilsats av stoppbuffer, men dette ble fjernet fra prosedyren etter observert blakking i prøver for måling av aktivitet av kalpain-lignende enzymer.

Det ble sett på aktivitet av katepsin B-lignende enzymer i homogenat og CTF av både ferskt, superkjølt og fryst lammekjøtt våren 2014. Aktiviteten funnet ved 30 °C ble sammenlignet med verdier funnet i prosjektoppgaven for lammekjøttet fra 2013, og aktiviteten målt i de to ulike reaksjonsbufferne ble sammenlignet.

## 2.8 Frie aminosyrer

Mengde frie aminosyrer ble bestemt i ekstrakter fra lammekjøttet fra høsten 2013, samt fra lammekjøttet som ble fryst og tint våren 2014, som et mål på total enzymaktivitet i kjøttet i løpet av lagring.

1 mL homogenat av hver prøve ble overført til eppendorfrør (Osnes og Mohr, 1985). 0,25 mL 10 % sulfosalisylysyre ble tilsatt, og eppendorfrørene ble deretter ristet kraftig. De ble deretter satt på kjølerom i 30 minutter, før de ble sentrifugert i 10 minutter ved 7840 x g. 1 mL av supernatantene ble deretter tilsatt nye 0,25 mL 10 % sulfosalisylysyre i nye eppendorfrør, ristet, satt på kjølerom i 30 minutter og sentrifugert i nye 10 minutter ved 7840 x g.

Supernatantene ble deretter fortynnet i forholdet 1:20 med ionefritt vann, og fortynningene ble filtrert gjennom sprøytefiltre med porestørrelse 0,2 µm. 0,205 mL av hver av de filtrerte løsningene ble sendt til analyse på HPLC. En av prøvene ble analysert i fem paralleller for å få et mål på feilen i målingene, mens resten av prøvene ble målt kun én gang.

Mengde frie aminosyrer ble analysert ved bruk av reversfase HPLC ved metoden av Lindroth og Mopper (1979), som modifisert av Flynn (1988). Glycin og arginin ble målt sammen, da toppene deres overlappet.

## 2.9 Syreløselige peptider

Syreløselige peptider ble bestemt i homogenater fra lammekjøttet fra høsten 2013, samt fra lammekjøttet som ble fryst og tint våren 2014. 2 mL 20 % trikloreddiksyre (TCA) ble tilsatt i 2 mL homogenat i et reagensrør, og blandet ved hjelp av en whirlmixer. Reagensrøret med blandingen ble hensatt i romtemperatur i 30 minutter. Blandingen ble deretter filtrert gjennom et Whatman filter av type 55/90 mm. Mengde syreløselige peptider ble bestemt ved bruk av Lowry-metoden (Lowry et al., 1951), og prøvene ble analysert i tre paralleller.

### 3 Resultater og diskusjon

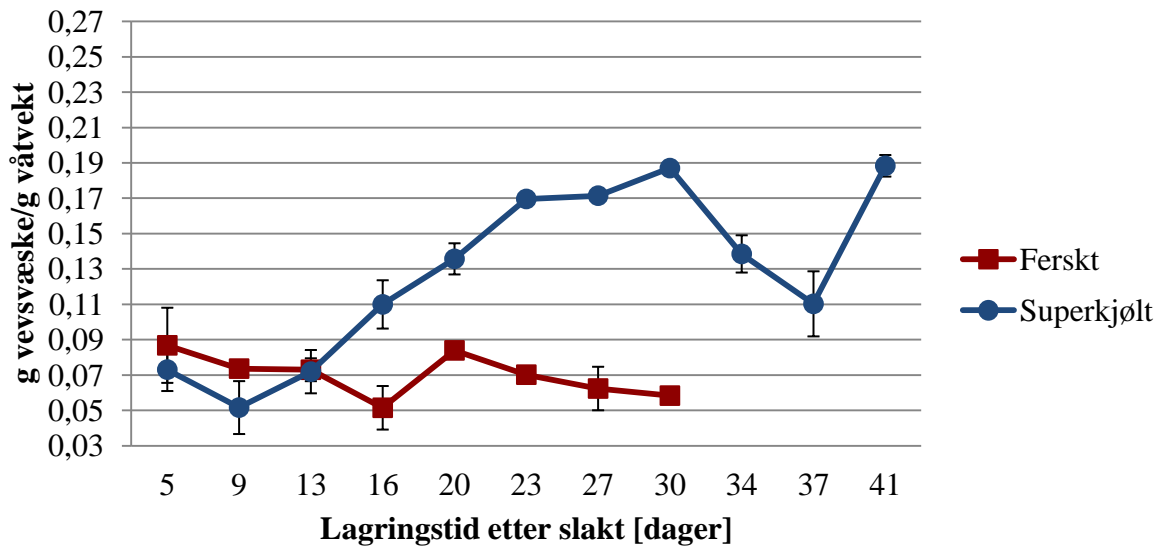
I dette kapittelet er resultater fra prosjektoppgaven ”Superkjøling av lam” (Friestad, 2013) sammenlignet med resultater funnet våren 2014 i forbindelse med masteroppgaven. Det er derfor presentert resultater som allerede er rapportert i prosjektoppgaven. Resultatene er imidlertid tilpasset, slik at lagringstiden er oppgitt som dager etter slakt istedenfor dager etter superkjøling, slik de ble presentert i prosjektoppgaven. Resultater for lammekjøtt fra høsten 2013 er funnet i forbindelse med prosjektoppgaven dersom ikke annet er oppgitt.

#### 3.1 Vevsvæske

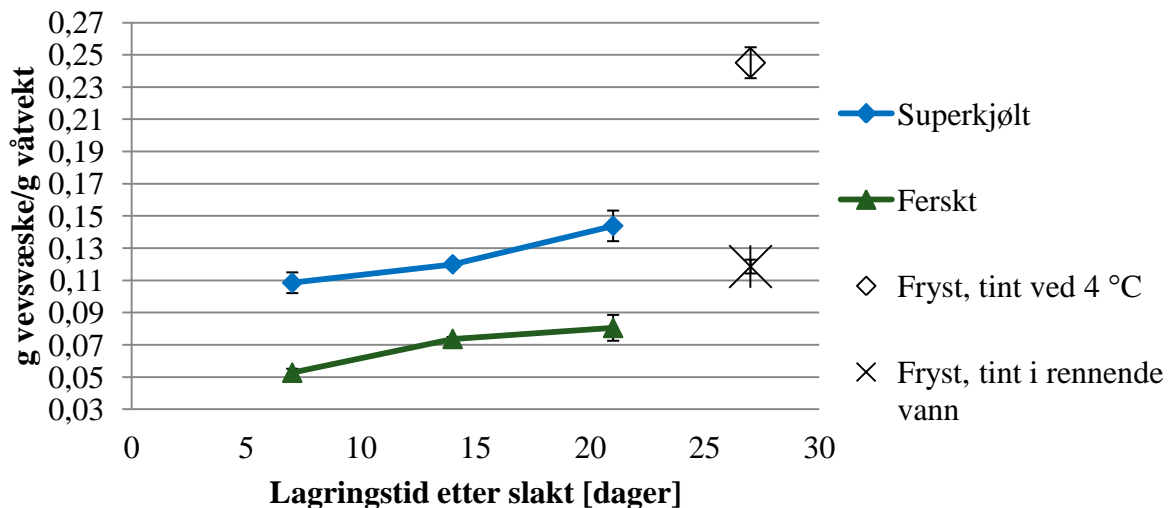
Siden kjøtt blir solgt på vektbasis, er det viktig at kjøttet ikke har et stort drypptap. Økt drypptap er forårsaket av redusert vannbindingsevne i kjøttet på grunn av strukturforandringer. Tidligere studier på svinekjøtt viste at superkjølt og kjølt kjøtt hadde liknende verdier for drypptap, 3,9-7,3 % vekttap i superkjølt kjøtt sammenlignet med et tap på 3,3-7,7 % i kjølt kjøtt (Duun, 2008). Sammenligning av superkjølte laksefileter og laksefileter lagret på is ga også like verdier for drypptap, med maksimalt 1,6 % vekttap i superkjølt fisk sammenlignet med <0,3 % vekttap i kjølt fisk (Duun, 2008). Ved sammenligning av superkjølt og kjølt torsk, hadde de superkjølte prøvene et lavere drypptap enn de kjølte prøvene, med 1,5 % vekttap sammenlignet med >5 % vekttap. I prosjektoppgaven (Friestad, 2013) ble det funnet at drypptapet for både ferske og superkjølte prøver av lammekjøtt utgjorde under 0,5 % av opprinnelig våtvekt. Dette kan ikke regnes som høye verdier, og superkjølingstemperaturen forårsaker dermed ikke membranødeleggelser store nok til at det skjer vesentlige endringer i kjøttets evne til å holde på væske.

Våren 2014 ble det ikke målt drypptap på kjøttet, men mengde cellevevsvæske ble målt. Cellevevsvæsken er væske som tapes når kjøttet utsettes for ytre kraft i form av sentrifugering, og er dermed noe knyttet til drypptapet. Det var imidlertid vanskelig å se sammenheng mellom drypptapet og mengde CTF høsten 2013. Økt mengde CTF skyldes at indre membraner ødelegges slik at mer væske lekker fra cellene ut i ekstracellulær matriks. Mengde CTF vil dermed være et bedre mål på indre ødeleggelser i celler og membraner enn drypptapet, som ikke sier noe om mengde ekstracellulær væske, men kun viser om kjøttet klarer å holde på denne væsken. Figur 3.1.1 sammenligner mengde vevsvæske i ferske og superkjølte prøver av midtstykker fra lammekjøtt fra høsten 2013 per g våtvekt kjøtt, mens

figur 3.1.2 sammenligner tilsvarende for prøver fra lammekjøtt fra våren 2014. Rådata, eksempelutregninger og beregnede verdier for dette avsnittet er gitt i vedlegg A.



**Figur 3.1.1:** Gram vevsvæske per gram våtvekt prøve fra lammekjøtt lagret ved 4°C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6°C (superkjølte prøver) fra høsten 2013. Verdier er gitt i tabell A.1 i vedlegg A, og er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013).



**Figur 3.1.2:** Gram vevsvæske per gram våtvekt prøve fra lammekjøtt lagret ved 4°C (ferske prøver), fra lammekjøtt lagret ved -1,6°C (superkjølte prøver) og fra fryst lammekjøtt tint ved ulike metoder våren 2014. Verdier er gitt i tabell A.2 i vedlegg A.



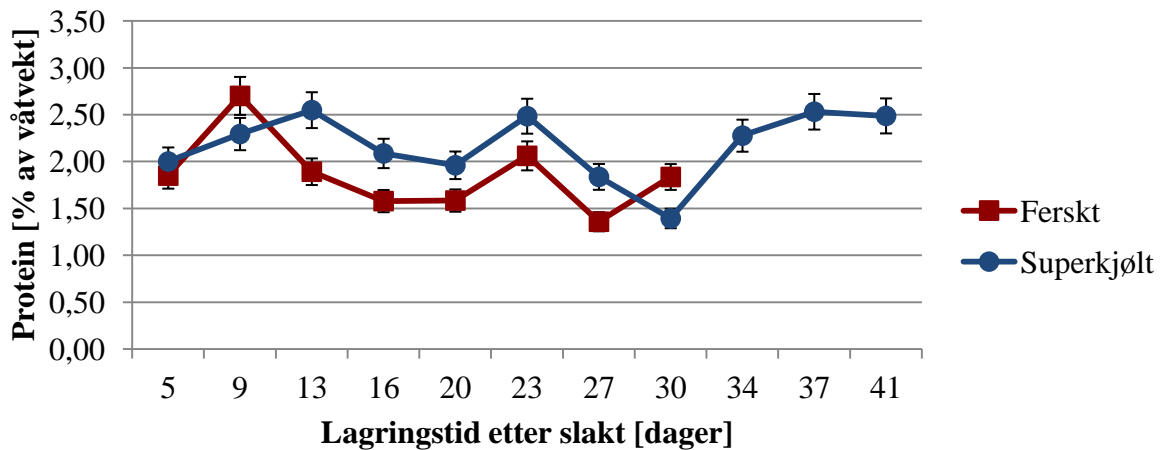
Figur 3.1.1 viser at mengde CTF holdt seg tilnærmet konstant for ferske prøver gjennom hele lagringsforsøket i 2013, mens den varierte mer for de superkjølte prøvene. 16 dager etter slakt, ved uttak 4, var mengden CTF i de superkjølte prøvene 2,1 ganger så stor som mengden CTF i de ferske prøvene. Mengden CTF i de superkjølte prøvene holdt seg høyere enn mengden CTF i de ferske prøvene gjennom resten av lagringsforsøket. I lagringsforsøket i 2014 var mengden CTF i de superkjølte prøvene mer enn 1,6 ganger større enn mengden i de ferske prøvene gjennom hele lagringsforsøket (se figur 3.1.2), og mengden varierte mindre i 2014 enn i 2013 for både ferske og superkjølte prøver. Dette kan skyldes at det ble gjort færre uttak av lam i 2014 enn i 2013, og at det var forskjellig lengde på lagringsperioden. Det kan i tillegg være på grunn av sesongvariasjoner i kjøttet, da lammene fra 2014 var et halvt år eldre enn lammene fra 2013 da de ble slaktet. Lagringsbetingelsene i 2014 kan også ha vært noe ulike betingelsene i 2013, selv om ikke dette ble registrert. Små temperatursvingninger kan for eksempel skje uten at utstyr registrerer det. Større mengde CTF i superkjølt kjøtt kan tyde på større ødeleggelse av membraner i det superkjølte kjøttet enn i det ferske kjøttet, mest sannsynlig på grunn av fryse/tine-ødeleggelse.

Det kan også observeres at prøver fra fryst lam tint ved 4 °C hadde en mye høyere andel av CTF per g våtvekt enn alle de andre prøvene, inkludert de superkjølte prøvene som var lagret i 41 dager etter slakt i 2013, noe som viser at fryse/tine-ødeleggelse i membranene har vært større i disse prøvene enn i de superkjølte. Fryste prøver tint i rennende vann hadde imidlertid en verdi som lå under verdiene for superkjølt lam når det var lagret i 20 dager for lam fra 2013 og 21 dager for lam fra 2014. Dette kan skyldes at det rennende vannet har skylt bort noe av væsken som ikke var fastbundet i proteinnettverk, siden kjøttet ikke var vakuumpakket da det ble tint, se avsnitt 2.3. Det kan også skyldes mindre tineskader ved tining i vann enn ved tining i luft, da tining i vann går raskere. Rask tining av raskt fryst kjøtt gir mindre ødeleggelse i vevet enn sakte tining, som nevnt i avsnitt 1.7.

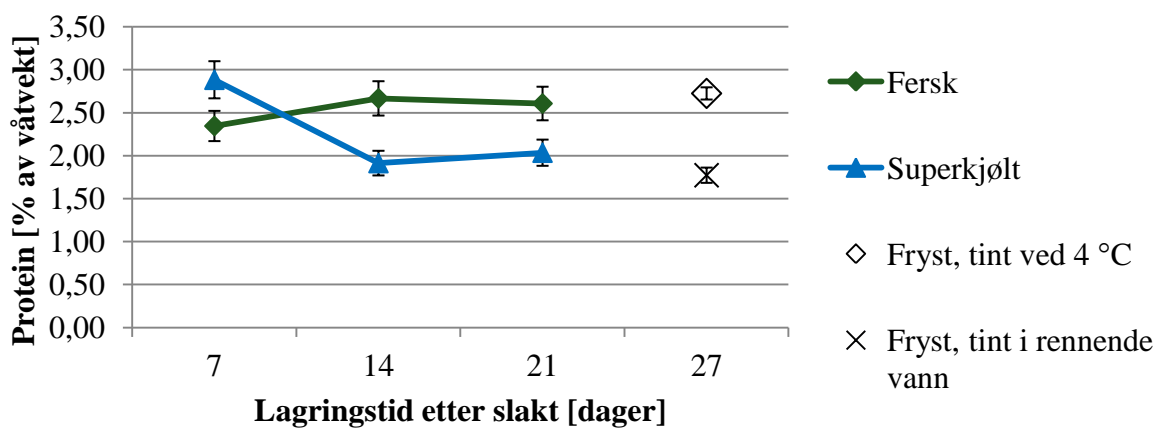
Tining av fryste lår fører til at salt lettere trenger inn i kjøttet, som nevnt i avsnitt 1.9. Dersom superkjølte lammelår skulle brukes til tillaging av fenalår, kan det at mengden CTF i superkjølte lår lå mellom mengden i kjølte og fryste lår tyde på at saltetiden ved tillaging burde være et sted mellom saltetiden for fryste lammelår og saltetiden for kjølte lammelår.

### 3.2 Vannløselige proteiner

Figurene 3.2.1 og 3.2.2 viser proteinmengde i homogenat fra ferske og superkjølte prøver fra henholdsvis høsten 2013 og våren 2014. Rådata, eksempelutregninger og beregnede verdier for dette avsnittet er gitt i vedlegg B.



**Figur 3.2.1:** Proteininnhold i homogenat i % av våtvekt av prøver fra midtstykker av lammekjøtt fra høsten 2013. Feilfelt er gitt til å være 7,5 % av verdien, som er funnet å være feilen i metoden (Samtale med Professor Turid Rustad, 2013). Verdiene er gitt i tabell B.4 i vedlegg B, og er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013).



**Figur 3.2.2:** Proteininnhold i homogenat i % av våtvekt av prøver fra lammekjøtt fra våren 2014. Feilfelt er gitt til å være 7,5 % av verdien, som er funnet å være feilen i metoden (Samtale med Professor Turid Rustad, 2013). Verdiene er gjennomsnitt av tre målinger, og er gitt i tabell B.7 i vedlegg B.

Da mekanisk ødeleggelse av vevet ødelegger membraner i celler, forventes det at homogenatene inneholder total mengde vannløselige proteiner som kan ekstraheres fra kjøttet med metoden som er brukt. Metoden gir kun et estimat på proteinmengde, da alle proteiner ikke er like standardproteinet BSA. Metoden kan imidlertid brukes for å se om proteinmengden endres i løpet av lagringsperioden i ulike uttak av kjøtt fra like lagringsmetoder. Proteininnholdet er også brukt for å se på enzymaktiviteten i forhold til mengde proteiner.

Figurene viser at proteininnholdet i homogenater fra ferskt og superkjølt lammekjøtt høsten 2013 og våren 2014 var relativt konstant, og at det ikke var stor forskjell mellom verdiene for høsten 2013 og våren 2014. For ferske prøver varierte verdiene i 2013 mellom 1,36 % og 2,70 % av våtvekten over hele lagringsperioden på 30 dager, mens verdiene for superkjølte prøver varierte mellom 1,39 % og 2,55 % over hele lagringsperioden på 41 dager. I 2014 varierte verdiene for ferske prøver mellom 2,34 % og 2,67 % av våtvekten, mens verdiene for de superkjølte prøvene varierte mellom 1,88 % og 1,91 % over lagringsperioden på 21 dager. Verdiene i 2013 og i 2014 ligger dermed i samme område. Tidligere studier har vist at mengden ekstraherte vannløselige proteiner fra svinekjøtt (både kjølt og superkjølt) var mellom 2,0 % og 4,2 % av våtvekten over en lagringsperiode på 21 dager (Duun, 2008), og verdiene kan dermed sies å være relativt lave.

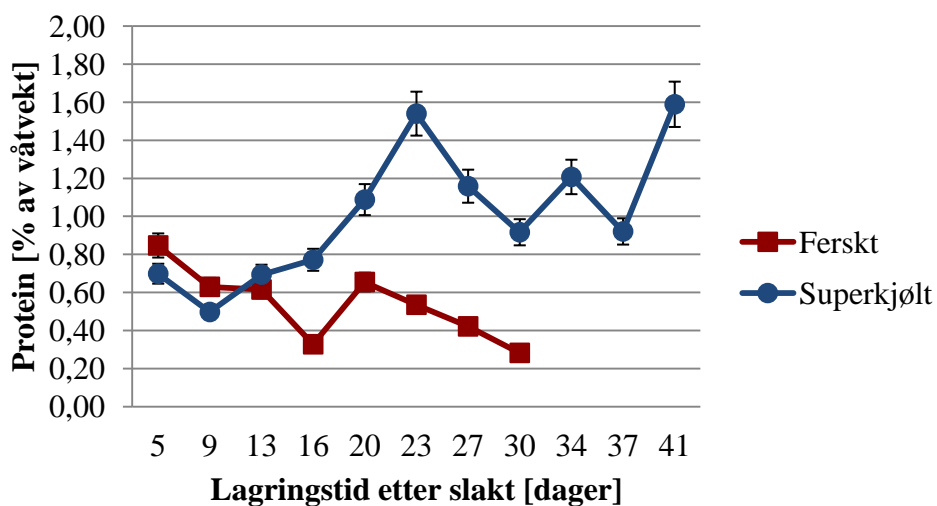
I enkelte tidsintervaller økte mengden vannløselige proteiner noe for alle prøver. Dette kan skyldes at kjøttet var mørnet. Proteindegradering på grunn av proteolytisk aktivitet kan nemlig øke ekstraherbarheten til proteinene (Duun, 2008). Det kan også ha vært variasjoner mellom de ulike lammelårene. Det ferske lammekjøttet fra 2014 var imidlertid fra samme lammelår for alle uttak, og det er mest sannsynlig at økningen var på grunn av mørning av kjøttet. Dette underbygges av utseendet og teksturen til det ferske kjøttet fra 2014, som er nærmere beskrevet i avsnitt 3.7.

I de tilfellene der mengden av vannløselige proteiner avtok i løpet av lagringsperioden, kan proteaser ha brutt ned proteinene slik at de ikke lenger ble bundet til fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250. Den nederste grensen for deteksjon av peptider er ved molekylvekter på 3-5 kDa (Bio-Rad Laboratories Inc., 2013). En høy grad av denaturering av muskelproteinene på grunn av frysing kan også redusere proteinenes ekstraherbarhet ved at proteinstabiliteten

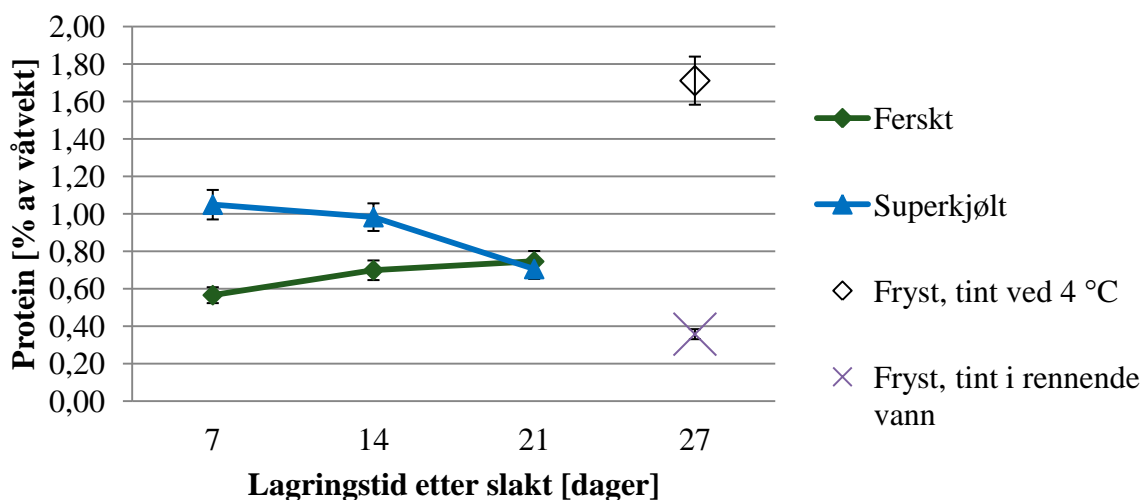
senkes (Duun, 2008). Denaturering kan også føre til kryssbindinger og proteinaggregasjon, som også fører til lavere ekstraherbarhet. Proteinene kan også ha forsvunnet med eventuelle drypptap. Endringene kan også igjen ha vært forårsaket av variasjoner mellom ulike lammelår.

Mengden av vannløselige proteiner i prøvene fra fryst lammekjøtt tint i 4 °C var tilnærmet lik mengden i superkjølte prøver i starten av lagringsperioden, mens prøvene fra fryst lammekjøtt tint i rennende vann hadde en lavere mengde vannløselige proteiner som var mer lik mengden etter 2 ukers lagring av superkjølte prøver. Dette kan tyde på at proteiner er blitt skylt vekk i det rennende vannet sammen med ekstracellulært vann som ikke var fast bundet, eller at det var variasjoner mellom lammelårene. Det kan også skyldes større grad av denaturering av proteiner på grunn av frysing/tining. Siden rask tining forventes å forårsake mindre skade enn ved sakte tining, og siden tining i vann går raskere enn tining i luft, virker dette lite sannsynlig.

Figur 3.2.3 og 3.2.4 viser proteininnhold i CTF i % av våtvekt for henholdsvis prøver fra lammekjøtt fra høsten 2013 og fra lammekjøtt fra våren 2014.



**Figur 3.2.3:** Proteininnhold i CTF i % av våtvekt av prøver fra lammekjøtt fra høsten 2013. Feilfelt er gitt til å være 7,5 % av verdien, som er funnet å være feilen i metoden (Samtale med Professor Turid Rustad, 2013). Verdiene er gitt i tabell B.4 i vedlegg B, og er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013).



**Figur 3.2.4:** Proteininnhold i CTF i % av våtvekt av prøver fra lammekjøtt fra våren 2014. Feilfelt er gitt til å være 7,5 % av verdien, som er funnet å være feilen i metoden (Samtale med Professor Turid Rustad, 2013). Verdiene er gitt i tabell B.7 i vedlegg B.

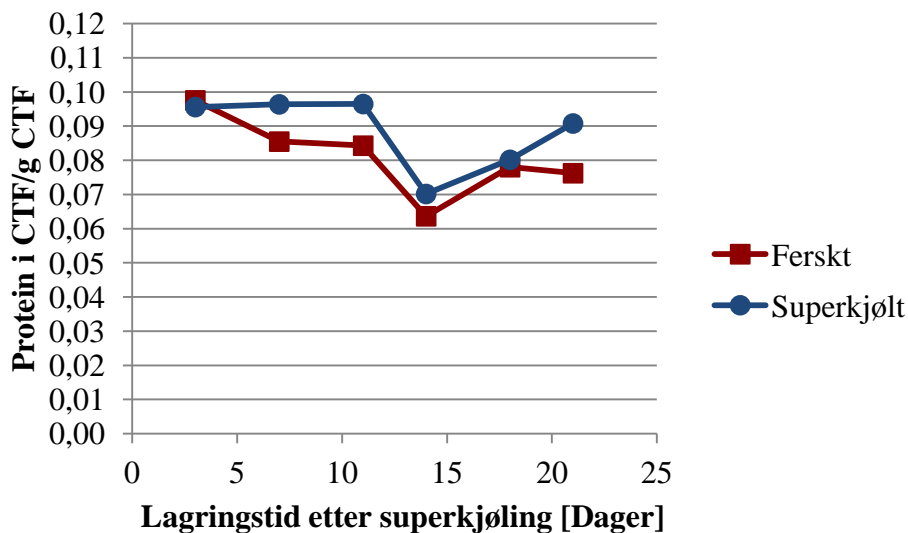
Mengden vannløselig protein i CTF per g våtvekt i ferske prøver fra lammekjøttet fra 2013 avtok totalt sett over lagringsperioden og lå i området mellom 0,28 % og 0,85 % av våtvekt over hele lagringsperioden på 30 dager. Reduksjonen kan skyldes variasjoner mellom lammelår og i mengden ekstraherbare proteiner. I de ferske prøvene fra 2014 økte mengden protein i CTF totalt sett, og lå i området mellom 0,57 % og 0,75 % over hele lagringsperioden på 21 dager. Økningen kan skyldes økt mørning. Det ferske lammekjøttet fra 2014 ble ikke oppbevart vakuumpakket etter at det ble mottatt 7 dager etter slakt, og kan dermed ha vært utsatt for økt bakterievekst som kunne bidratt til mørningen. Bakterievekst kan imidlertid også føre til at mengden protein synker, da bakterier kan ha forbrukt disse. Mengden lå innenfor samme område som i 2013, selv med økningen i mengde vannløselig protein.

Mengden vannløselig protein i CTF per g våtvekt i det superkjølte lammekjøttet fra høsten 2013 økte totalt sett, men det var først ved dag 16 etter slakt at det begynte å skille seg fra de ferske prøvene fra 2013. Mengden i de superkjølte prøvene varierte mellom 0,50 % og 1,6 % av våtvekten over hele lagringsperioden. Mengden protein i CTF fra superkjølte prøver fra 2014, derimot, avtok etter hvert i lagringsperioden. Mengden varierte mellom 0,71 % og 1,0 % av våtvekten, som er innenfor samme område som prøvene fra 2013. Reduksjonen totalt sett i mengde protein i CTF i superkjølte prøver står i tråd med at protein i homogenater av samme prøver også sank, og kan dermed skyldes variasjon i lammelårene.

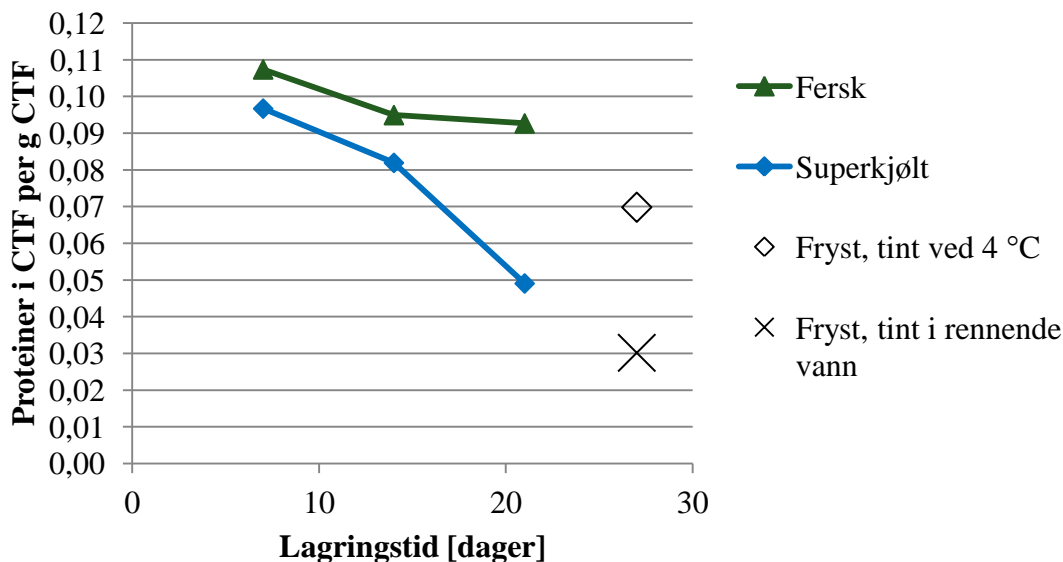
Mengden protein i CTF per g våtvekt i det fryste lammekjøttet som ble tint ved 4 °C var mye høyere enn i de andre prøvene fra 2014, med en verdi på 1,71 % av våtvekten, noe som kan tyde på større fryse/tine-skader enn i de andre prøvene. Mengden var tilnærmet lik som i de superkjølte prøvene fra 2013 etter 41 dagers oppbevaring. Mengden protein i CTF i lammekjøttet som ble tint i rennende vann var derimot lavere enn for de andre prøvene (med unntak av de ferske prøvene fra 2013, sent i lagringsperioden), med en verdi på 0,36 % av våtvekten, og dette kan igjen skyldes at noe CTF er skylt bort sammen med vannet prøven ble tint i. Det kan også ha sammenheng med den lave mengden proteiner i homogenat av samme prøver, eller med mindre tineskader ved tining i vann enn ved tining i luft.

Mengden av vannløselige proteiner i CTF fra de superkjølte prøvene fra 2014 var større enn i de ferske prøvene fra starten av, mens det først var ved dag 16 etter slakt at de superkjølte prøvene fra 2013 hadde større mengde protein i CTF enn de ferske prøvene fra 2013. Det var imidlertid tilnærmet like mye vannløselig protein i CTF i ferske og superkjølte prøver ved dag 21 etter slakt våren 2014.

Høyere proteininnhold i superkjølte prøver enn i andre prøver og enda høyere i fryste prøver tint ved 4 °C kan skyldes større lekkasje av proteiner fra celler eller større proteaseaktivitet, men det kan også skyldes at mengden CTF er større i disse prøvene. En må derfor se på forholdet mellom protein i CTF og gram CTF for å se om større mengde CTF er grunnen til høyere proteininnhold. Figur 3.2.5 og 3.2.6 sammenligner mengde protein i CTF per g CTF i ferske og superkjølte prøver fra henholdsvis høsten 2013 og våren 2014.



**Figur 3.2.5** Proteininnhold i CTF i gram per gram CTF av prøver fra høsten 2013. Verdiene er funnet ved å dele verdier for protein i løsning [g/g våtvekt] i tabell B.4 i Vedlegg B på verdier for g CTF per g våtvekt i tabell A.1 i Vedlegg A. Verdiene er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013).



**Figur 3.2.6** Proteininnhold i CTF i gram per gram CTF av prøver fra våren 2014. Verdiene er funnet ved å dele verdier for protein i løsning [g/g våtvekt] i tabell B.7 i Vedlegg B på verdier for g CTF per g våtvekt i tabell A.2 i Vedlegg A.

Figurene viser at mengden protein per g CTF avtok totalt sett for ferske og superkjølte prøver, bortsett fra de superkjølte prøvene fra 2013, der forholdet holdt seg relativt konstant. Dette

betyr at mengde protein ikke øker i takt med mengde CTF, og mengden protein i CTF per g CTF i ferske prøver er mye større enn i superkjølte prøver i slutten av lagringsforsøket. Mengde CTF er dermed ikke årsaken til høyere innhold av proteiner i CTF i superkjølte prøver enn i ferske. Nedgangen kan skyldes at en økt mengde vann og andre stoffer har lekket ut i CTF i forhold til proteiner. Dette tyder på membranødeleggelse i prøvene. I de superkjølte prøvene fra 2013 har det lekket mindre væske ut i forhold til protein enn i de superkjølte prøvene fra 2014. Dette kan tyde på sesongvariasjoner i kjøttet, eller at lagringsbetingelsene i 2014 var noe ulike betingelsene i 2013, selv om dette ikke ble registrert.

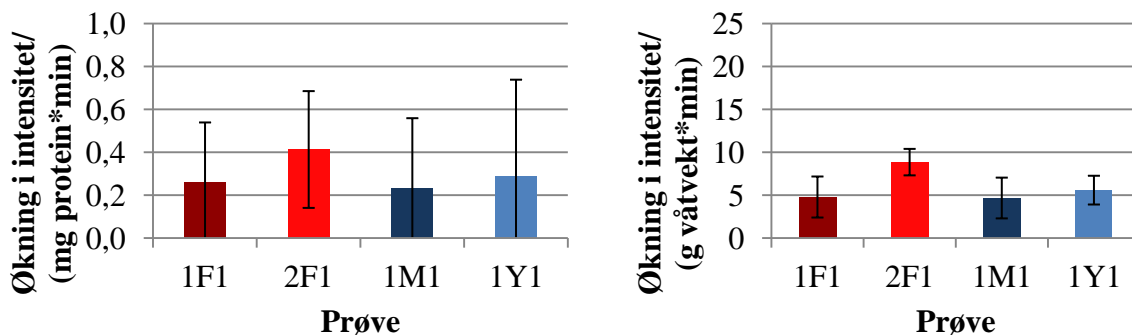
Stor mengde væske og andre stoffer i CTF kan være grunnen til at også fryste prøver tint ved 4 °C hadde en lav verdi for protein i CTF per g CTF i, da disse inneholdt mer protein i CTF enn de andre prøvene og mer CTF enn de andre prøvene som prosent av våtvekten. Dette betyr igjen at fryse/tine-ødeleggelse har ført til at lekkasje av proteiner fra celler har foregått. Resultatene underbygger videre at superkjølte prøver har en membranødeleggelse som ligger mellom kjølte og fryste prøver, slik det ble nevnt i avsnitt 3.1. De fryste prøvene tint i vann inneholdt mindre protein og hadde en lavere mengde CTF enn de fleste av de andre prøvene, noe som er grunnen til det lave forholdet vist i figur 3.2.6.

### 3.3 Målinger av kalpain-lignende aktivitet

Det ble forsøkt å måle kalpainaktivitet i homogenat fra det første uttaket av lammekjøtt fra høsten 2013 ved bruk av bufferkombinasjon 1 fra tabell 2.6.1, men dette ga ikke målbare resultater. Det ble imidlertid observert noe bunnfall i noen av prøvene, og dette kan føre til at lyset spres, noe som igjen fører til feilaktige resultater. Årsaken til bunnfallet ble funnet å være at reagensrørene ble satt på is, da dette gjorde at bufferen brukt til å stoppe reaksjonen ble blakket når den ble blandet med enzymprøve. Dette var mest sannsynlig på grunn av at SDS feller ut ved lave temperaturer.

Det ble forsøkt å måle aktivitet på nytt uten å sette prøvene kaldt etter inkubering med substrat, og denne gangen ble det ikke observert noe bunnfall. Resultatet er presentert i figur 3.3.1. Rådata, eksempelutregninger og beregnede verdier for dette avsnittet er gitt i vedlegg C.

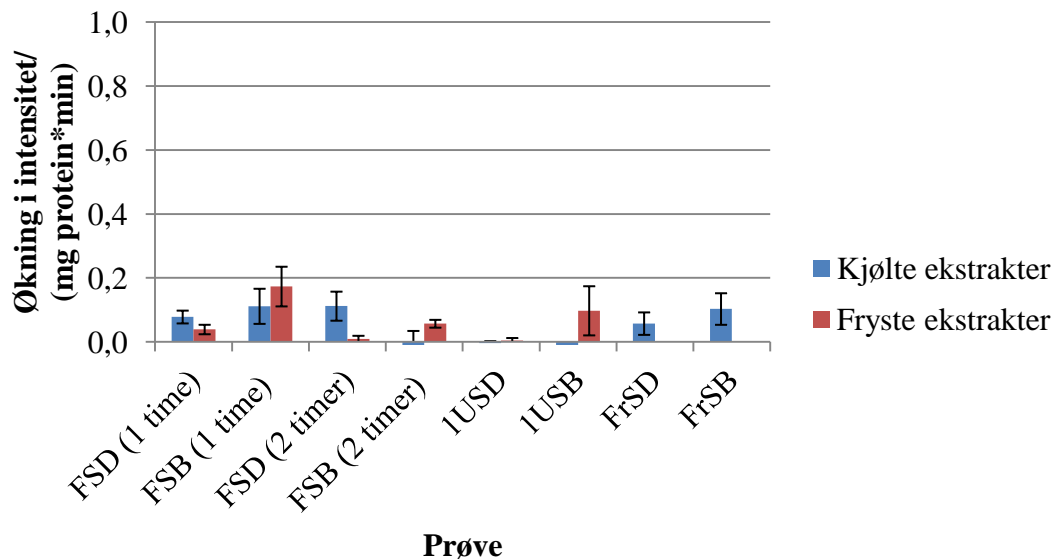




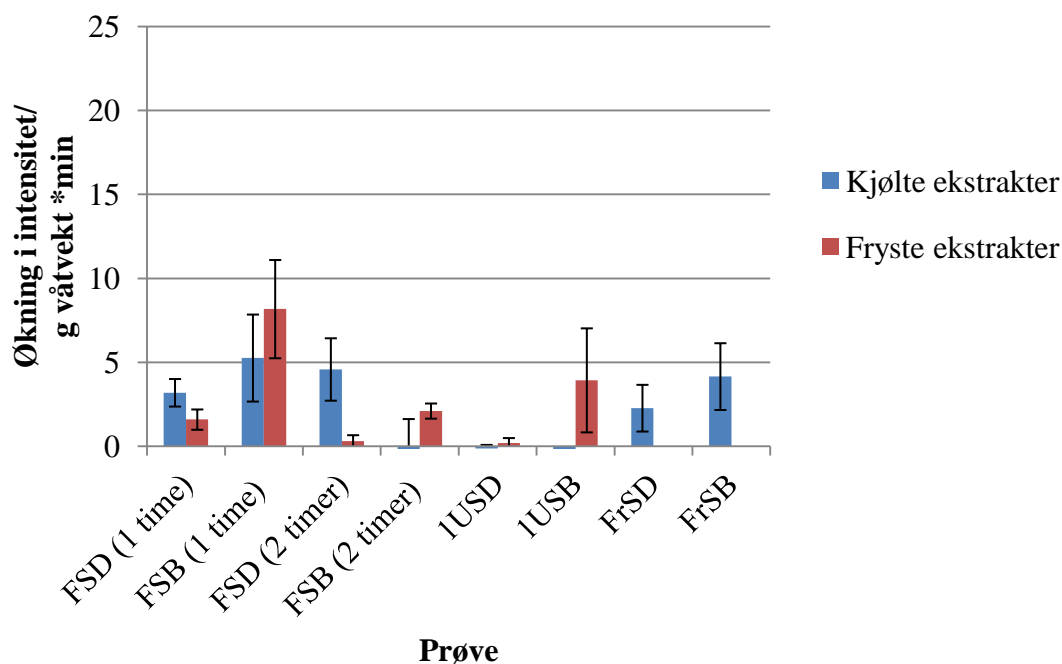
**Figur 3.3.1:** Kalpainaktivitet i prøver fra første uttak av lammekjøtt høsten 2013, vist per mg protein og minutt, samt per g våtvekt og minutt. 1F er lammekjøtt fra ferskt midtstykke, 2F er fersk ytterkant, 1M er superkjølt midtstykke og 1Y er superkjølt ytterkant. Det siste 1-tallet i prøvekode angir at prøvene er fra 1. uttak. Bufferkombinasjonen brukt er kombinasjon 1 fra tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6 i hovedteksten. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell C.1 i Vedlegg C. Analysene ble gjort våren 2014.

Aktiviteten var svært lav, og i prøvene 1F1, 1M1 og 1Y1 var resultatene per mg protein og minutt ikke målbare på grunn av usikkerheten i målingene. Dette var i samsvar med resultater oppnådd for oppdrettstorsk ved bruk av samme bufferkombinasjon (med ulik pH) (Hultmann og Rustad, 2003). Det er imidlertid forventet at kalpainer er viktigere i mørning av kjøtt enn i fisk (Hultmann, 2003). Det ble derfor besluttet å forsøke å finne en annen bufferkombinasjon som kunne være bedre for måling av kalpainaktivitet. Det ble også prøvd ut en annen ekstraksjonsbuffer (se avsnitt 2.5) i tillegg til destillert vann.

På grunn av begrensede mengder homogenat fra høsten 2013, ble det besluttet å gjøre innkjøp av svinekjøtt for å teste ut hvilke betingelser det ville være mest gunstig å måle kalpainaktivitet under. Buffersammensetninger og inkuberingstider var betingelsene som ble endret. Aktiviteten av kalpain-lignende enzymer i svinekjøtt ved bruk av bufferkombinasjon 2 i tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6 er vist per g våtvekt og minutt i figur 3.3.2 og per mg protein og minutt i figur 3.3.3. Det ble brukt både ekstrakter som var kjølt over natten etter tillaging og ekstrakter som ble lagret ved -20 °C før tining og analyse, dette for å se om frysing av ekstraktene hadde innvirkning på enzymaktiviteten.

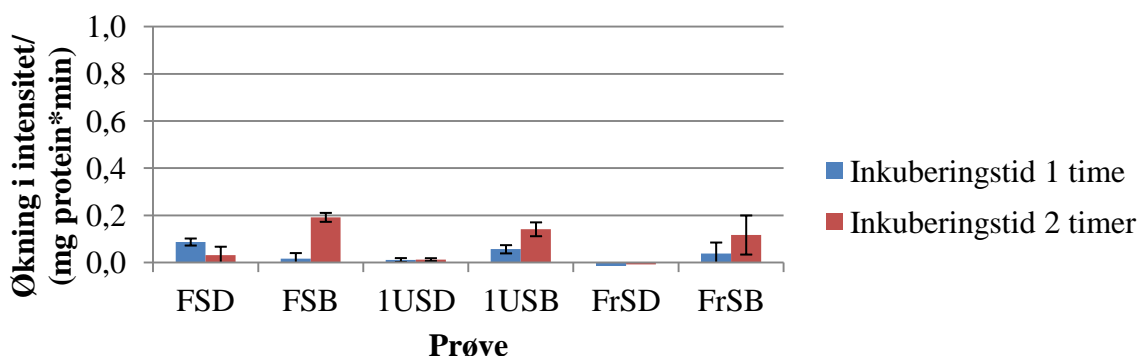


**Figur 3.3.2:** Kalpainaktivitet per mg protein og minutt i prøver fra homogenater fra svinekjøtt våren 2014. Kjølte ekstrakter stod på kjølerom over natten etter tillaging, mens fryste ekstrakter ble lagret ved -20 °C etter tillaging. "FS" i prøvekode indikerer at prøven var fra nykjøpt (ferskt) svin, "IUS" var fra svin lagret 1 uke etter kjøp og "FrS" var fra fryst svin tint i kjølerom over natten. "D" i prøvekode indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann og "B" i prøvekode indikerer at ekstraksjonsbufferen var bufferen beskrevet i avsnitt 2.5. Tekst i parentes angir inkuberingstid, som er 1 time om ikke annet er oppgitt. Bufferkombinasjonen brukt ved aktivitetsmåling er kombinasjon 2 fra tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6 i hovedteksten. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell C.2 i Vedlegg C for kjølte ekstrakter, og i tabell C.3 for fryste ekstrakter.

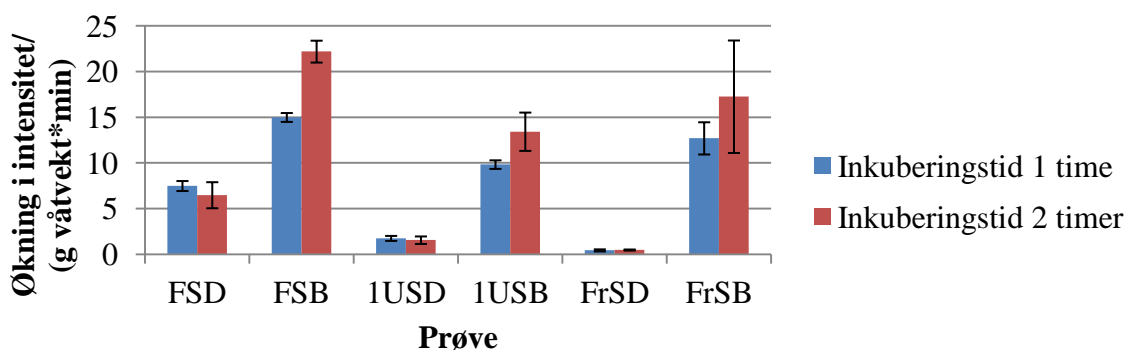


**Figur 3.3.3:** Kalpainaktivitet per g våtvekt og minutt i prøver fra homogenater fra svinekjøtt våren 2014. Kjølte ekstrakter stod på kjølerom over natten etter tillaging, mens fryste ekstrakter ble lagret ved -20 °C etter tillaging. "FS" i prøvekoden indikerer at prøven var fra nykjøpt (ferskt) svin, "IUS" var fra svin lagret 1 uke etter kjøp og "FrS" var fra fryst svin tint i kjølerom over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann og "B" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var bufferen beskrevet i avsnitt 2.5. Tekst i parentes angir inkuberingstid, som er 1 time om ikke annet er oppgitt. Bufferkombinasjonen brukt ved aktivitetsmåling er kombinasjon 2 fra tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6 i hovedteksten. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell C.2 i Vedlegg C for kjølte ekstrakter, og i tabell C.3 for fryste ekstrakter.

Figurene viser at aktiviteten av kalpainer var svært lav, og at den ikke var målbar for enkelte av prøvene. Det ble derfor besluttet å benytte en tredje bufferkombinasjon, bufferkombinasjon 3 i tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6. Det ble også funnet at frysing av ekstrakter ikke gjorde aktiviteten i homogenatene lavere enn hvis ekstraktene bare hadde vært kjølt over natten, så det ble ikke lagd nye ekstrakter ved videre analyser. Figur 3.3.4 og 3.3.5 viser aktiviteten av kalpain-lignende enzymer i svinekjøtt ved bruk av bufferkombinasjon 3 fra tabell 2.6.1, per g våtvekt og minutt i figur 3.3.4 og per mg protein og minutt i figur 3.3.5.

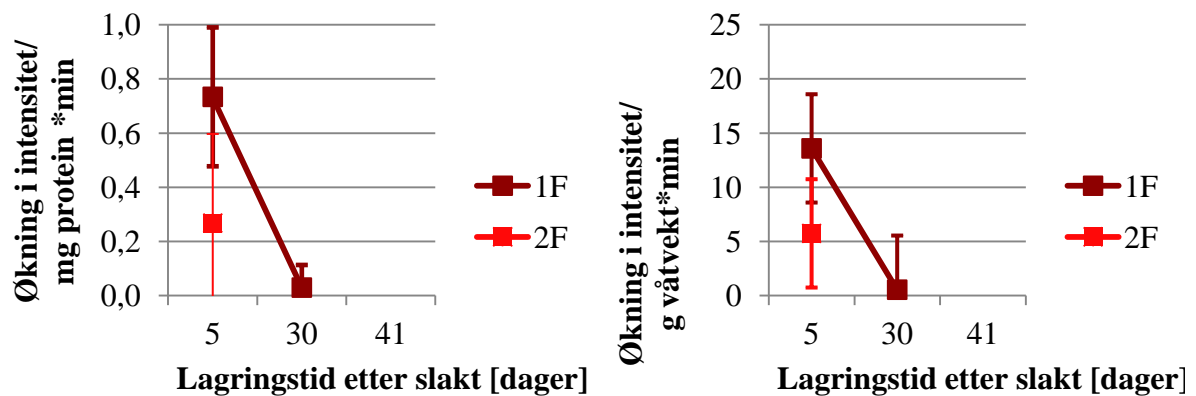


**Tabell 3.3.4:** Kalpainaktivitet i prøver fra homogenater fra svinekjøtt våren 2014 per mg protein og minutt. Ekstraktene var lagret ved -20 °C etter tillaging. . "FS" i prøvekoden indikerer at prøven var fra nykjøpt (ferskt) svin, "1US" var fra svin lagret 1 uke etter kjøp og "FrS" var fra fryst svin tint i kjølerom over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann og "B" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var bufferen beskrevet i avsnitt 2.5. Bufferkombinasjonen brukt ved aktivitetsmåling er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6 i hovedteksten. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell C.4 i Vedlegg C for prøver med 1 times inkuberingstid og i tabell C.5 ved 2 timers inkuberingstid.

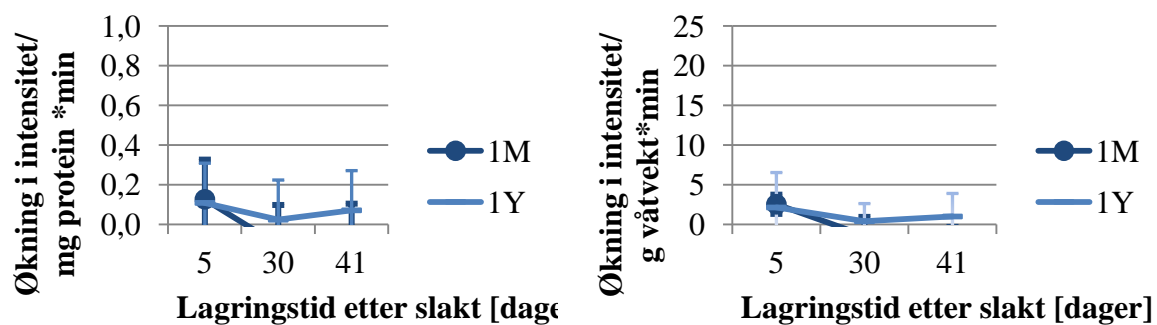


**Figur 3.3.5:** Kalpainaktivitet i prøver fra homogenater fra svinekjøtt våren 2014 per g våtvekt og minutt. Ekstraktene var lagret ved -20 °C etter tillaging. . "FS" i prøvekoden indikerer at prøven var fra nykjøpt (ferskt) svin, "1US" var fra svin lagret 1 uke etter kjøp og "FrS" var fra fryst svin tint i kjølerom over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann og "B" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var bufferen beskrevet i avsnitt 2.5. Bufferkombinasjonen brukt ved aktivitetsmåling er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6 i hovedteksten. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell C.4 i Vedlegg C for prøver med 1 times inkuberingstid og i tabell C.5 ved 2 timers inkuberingstid.

Aktiviteten var fortsatt lav med denne reaksjonsbufferen, og den varierte mellom å være høyere og lavere enn for de andre bufferkombinasjonene per mg protein og minutt for ulike prøver. Per g våtvekt var den imidlertid høyere for alle prøver utenom fryst svin med destillert vann som ekstraksjonsvæske, og høyest var den ved en inkuberingstid på to timer. Det ble derfor forsøkt å måle aktiviteten av kalpainer på nytt i lammeekstraktene fra 2013, denne gangen også i senere uttak. Aktiviteten er vist i figur 3.3.6 for ekstrakter fra ferskt lammekjøtt, og i figur 3.3.7 for ekstrakter fra superkjølt lammekjøtt.



**Figur 3.3.6:** Kalpainaktivitet i prøver av ferskt lammekjøtt høsten 2013, vist per mg protein og minutt, samt per g våtvekt og minutt. 1F er lammekjøtt fra ferskt midtstykke, 2F er fersk ytterkant. Bufferkombinasjonen brukt er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6 i hovedteksten. Inkuberingstid med substrat var 2 timer. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell C.6 i Vedlegg C. Analysene ble gjort våren 2014.



**Figur 3.3.7:** Kalpainaktivitet i prøver av superkjølt lammekjøtt høsten 2013, vist per mg protein og minutt, samt per g våtvekt og minutt. 1M er superkjølt midtstykke og 1Y er superkjølt ytterkant. Bufferkombinasjonen brukt er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i avsnitt 2.6 i hovedteksten. Inkuberingstid med substrat var 2 timer. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell C.6 i Vedlegg C. Analysene ble gjort våren 2014.

Aktiviteten var fremdeles svært lav eller ikke målbar i alle prøver, og det ble derfor ikke gjort flere forsøk på kalpainer i lammekjøttet fra 2013. Bruk av ekstraksjonsbuffer ved tillaging av homogenat før måling av aktivitet i svinekjøtt hadde heller ikke en så stor effekt i forhold til bruk av destillert vann at det ble sett på som hensiktsmessig i forhold til tidsbruk å forsøke å måle kalpainaktivitet i prøvene fra lammekjøtt 2014.

De lave aktivitetsverdiene kan skyldes kalpain-inhibitoren kalpastatin, eller feil valg av ekstraksjonsbuffer. Kalpastatin ble ikke fjernet i denne oppgaven, siden det er tidskrevende å skille kalpastatin fra kalpainene (Gaarder, 2011). I tillegg vil kalpainer autolysere fort i nærvær av kalsiumioner, selv ved lave temperaturer (Thompson og Goll, 2000).

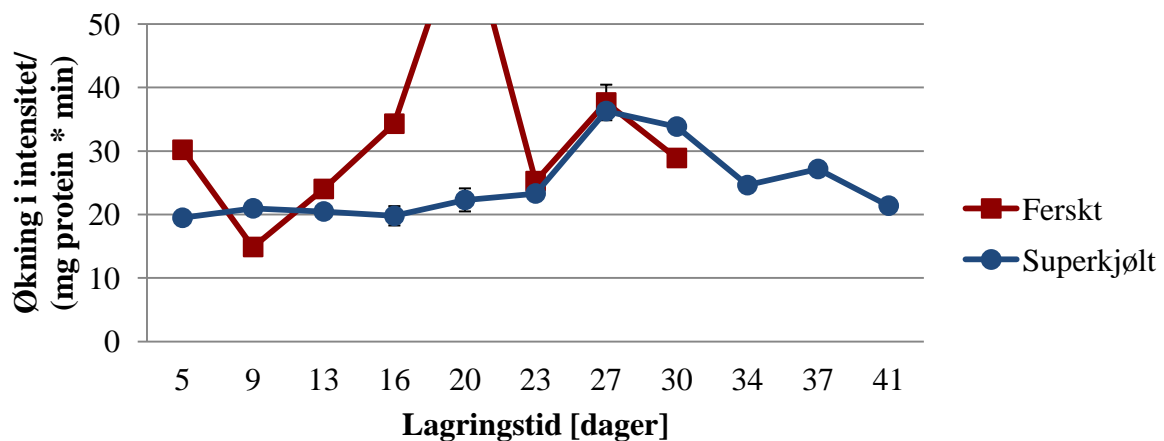
Ekstraksjonsbufferen må dermed, ifølge Thompson & Goll (2000), inneholde en  $\text{Ca}^{2+}$ -chelator som EDTA eller EGTA med konsentrasjoner på 1 til 10 mM for å forhindre at enzymene autolyseres før aktivitetsmålinger. I tillegg bør den ifølge Gaarder (2011) inneholde flere inhibitorer, som serin-protease inhibitor, cystein-protease inhibitor og trypsin-protease inhibitor.

Tidligere forsøk på storfekjøtt har vist at aktiviteten av m-kalpain etter 7 dagers lagring etter slakt avtok til 63 % av aktiviteten ved slakt (Boehm et al., 1998), så dette kan også være en grunn til at aktiviteten var lav i prøvene fra lamme- og svinekjøttet fra henholdsvis 2013 og 2014. Tilsvarende avtok aktiviteten av  $\mu$ -kalpain i storfe 1 dag etter slakt til 20 % av

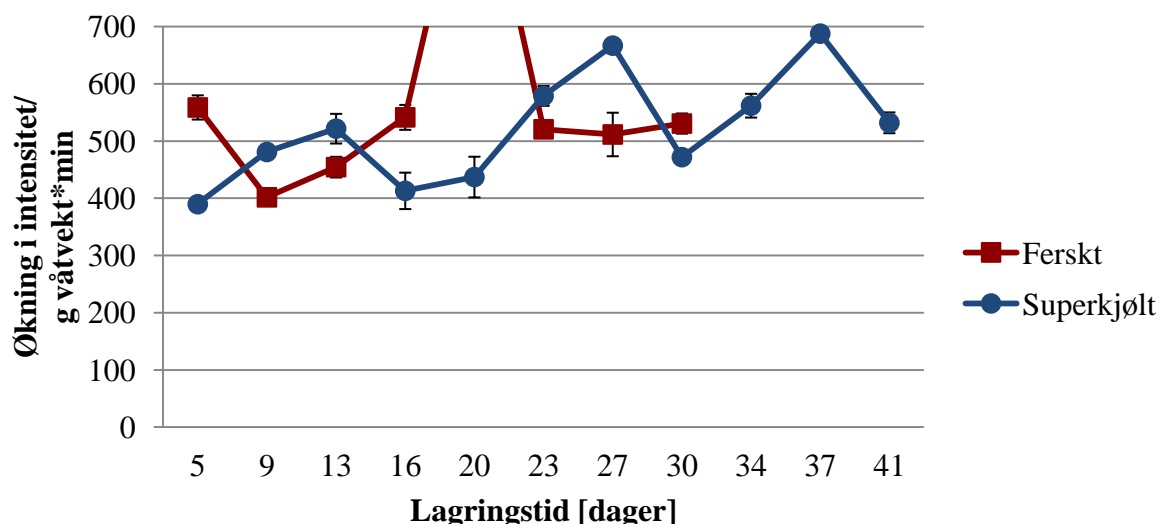
aktiviteten ved slakt, og til under 4 % av aktiviteten ved slakt etter 7 dagers oppbevaring (Boehm et al., 1998). Kalpastatinaktiviteten ble også redusert, til 60 % av opprinnelig aktivitet etter 1 dag og til 30 % av opprinnelig aktivitet etter 7 dager. Både kalpainer og kalpastatin ble imidlertid isolert før aktiviteten ble målt. Aktivitet av inhibitor i lammekjøttet fra 2013 og svinekjøttet fra 2014 kan ha gjort kalpain-aktivitetene lave og umålbare, da enzymer og inhibitor ikke ble separert.

### 3.4 Målinger av aktivitet av katepsin B-lignende enzymer

Figurene 3.4.1 og 3.4.2 viser aktiviteten av katepsin B-lignende enzymer i homogenat fra ferske og superkjølte prøver fra høsten 2013 henholdsvis per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt. Rådata, eksempelutregninger og beregnede verdier for dette avsnittet kan finnes i vedlegg D.



**Figur 3.4.1:** Katepsin B-aktivitet per mg protein og minutt i homogenater av lammekjøtt lagret ved 4 °C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6 °C (superkjølte prøver) fra høsten 2013. Inkuberingstemperaturen var 30 °C, og inkuberingstiden var 15 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell D.1 i vedlegg D, og er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013). Verdien ved dag 20 (som var 67) er ikke tatt hensyn til, da det mest sannsynlig har skjedd noe feil ved analyse av denne prøven.

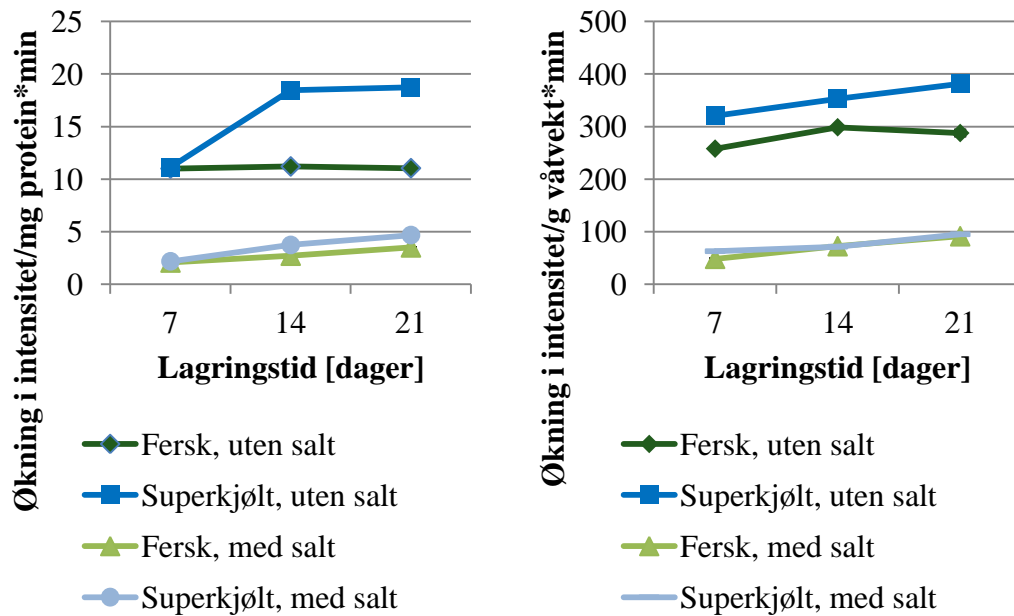


**Figur 3.4.2:** *Katepsin B-aktivitet per g våtvekt og minutt i homogenater av lammekjøtt lagret ved 4 °C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6 °C (superkjølte prøver) fra høsten 2013. Inkuberingstemperaturen var 30 °C, og inkuberingstiden var 15 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell D.1 i vedlegg D, og er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013). Verdien ved dag 20 (som var 1062) er ikke tatt hensyn til, da det mest sannsynlig har skjedd noe feil ved analyse av denne prøven.*

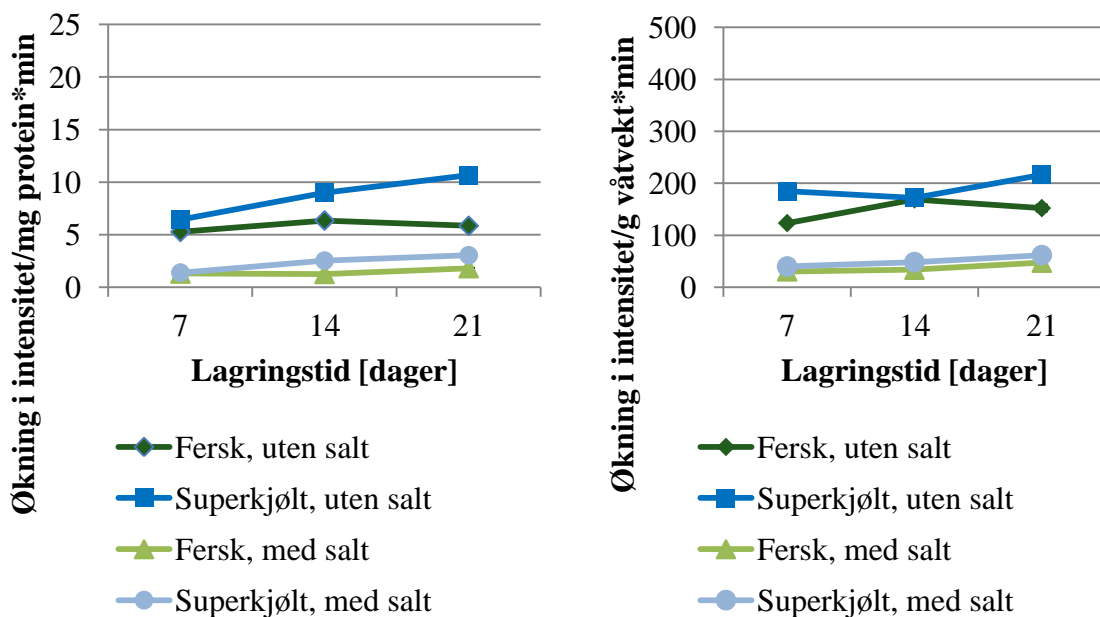
Verdiene var relativt konstante for både ferske og superkjølte prøver, noe som betyr at aktiviteten av katepsin B ikke tapes ved noen av temperaturene. Enzymet kan dermed bidra til videre mørning dersom kjøttet lagres ved kjøleromstemperatur etter superkjølt mellomlagring.

I figur 3.4.3-5 er katepsin B-aktivitet i ferske og superkjølte prøver med og uten 5 % salt i løsningen ved inkubering med substrat presentert. Aktiviteten er vist som økning i intensitet per mg og minutt og per g våtvekt og minutt. Inkuberingstemperaturer og -tider er henholdsvis 30 °C og 15 minutter (figur 3.4.3), 14 °C og 60 minutter (figur 3.4.4) og 4 °C og 120 minutter (figur 3.4.5).

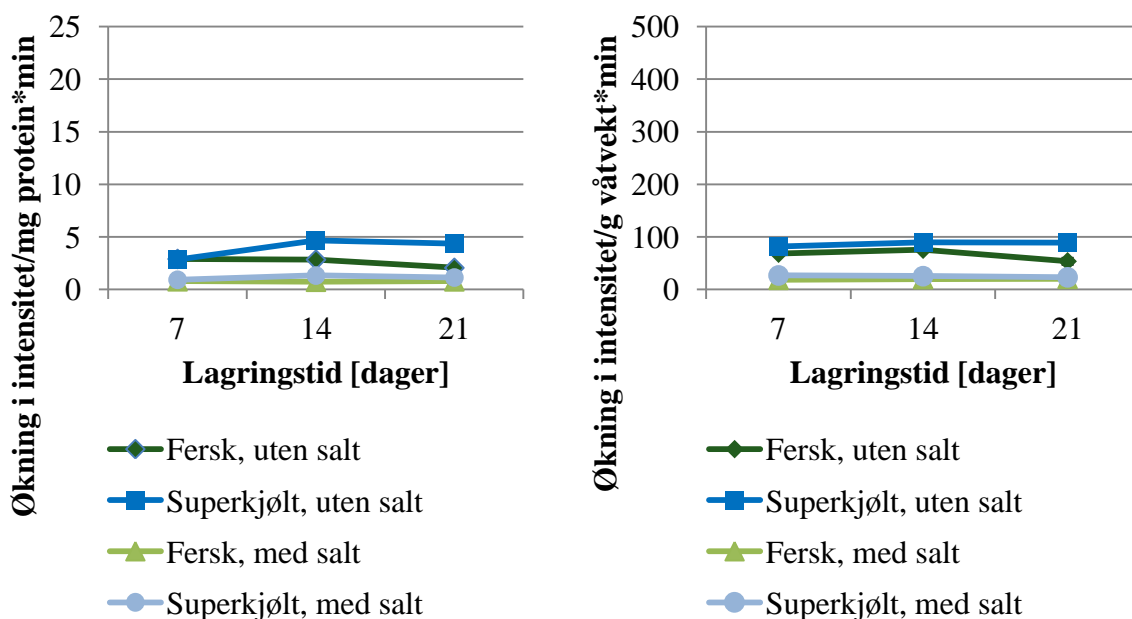




**Figur 3.4.3:** Katesin B-aktivitet per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt i homogenater av lammekjøtt lagret ved 4 °C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6 °C (superkjølte prøver) fra våren 2014. Inkuberingstemperaturen var 30 °C, og inkuberingstiden var 15 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) for prøver uten salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.2 i vedlegg D, mens verdier og feilfelt for prøver med salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.3 i vedlegg D. Merk at aksene har andre maksimum enn i figur 3.4.1 og 3.4.2, dette på grunn av bedre synlighet av alle prøver.



**Figur 3.4.4:** *Katepsin B-aktivitet per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt i homogenater av lammekjøtt lagret ved 4 °C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6 °C (superkjølte prøver) fra våren 2014. Inkuberingstemperaturen var 14 °C, og inkuberingstiden var 60 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) for prøver uten salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.4 i vedlegg D, mens verdier og feilfelt for prøver med salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.5 i vedlegg D. Merk at aksene har andre maksimum enn i figur 3.4.1 og 3.4.2, dette på grunn av bedre synlighet av alle prøver.*



**Figur 3.4.5:** *Katepsin B-aktivitet per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt i homogenater av lammekjøtt lagret ved 4 °C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6 °C (superkjølte prøver) fra våren 2014. Inkuberingstemperaturen var 4 °C, og inkuberingstiden var 120 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) for prøver uten salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.6 i vedlegg D, mens verdier og feilfelt for prøver med salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.7 i vedlegg D. Merk at aksene har andre maksimum enn i figur 3.4.1 og 3.4.2, dette på grunn av bedre synlighet av alle prøver.*

Figurene viser at aktiviteten av katepsin B-lignende enzymer var høyest i de superkjølte prøvene. Siden mengden protein i homogenater av superkjølte prøver i % av våtvekt (figur 3.2.2) var lavere 14 dager etter slakt enn i homogenater av de ferske prøvene, skulle en tro at mer katepsin B var til stede i de ferske prøvene etter hvert i lagringsperioden. Høyere aktivitet i superkjølte prøver kan derfor skyldes variasjoner i mengde katepsin B i ulike lammelår, og variasjoner i mengde ekstraherbart katepsin B mellom ferske og superkjølte prøver.

Tilsatt salt senket aktiviteten av katepsin B-lignende enzymer. Dette er også funnet ved en tidligere studie av katepsin B-aktivitet i "Jinhua" skinke, en type spekeskinke fra byen Jinhua i Zhejiang-provinsen øst i Kina (Zhao et al., 2005). Her ble det også funnet at effekten av temperaturendring på katepsin B-aktiviteten ble redusert ved høyere saltinnhold, og at økt temperatur økte saltets inhiberende effekt på aktiviteten. Ved temperaturer under 10 °C hadde saltet imidlertid lite innvirkning på aktiviteten, og dette ble også observert i denne oppgaven, der saltet hadde en avtagende virkning på aktiviteten ved avtagende temperaturer. Dette kan

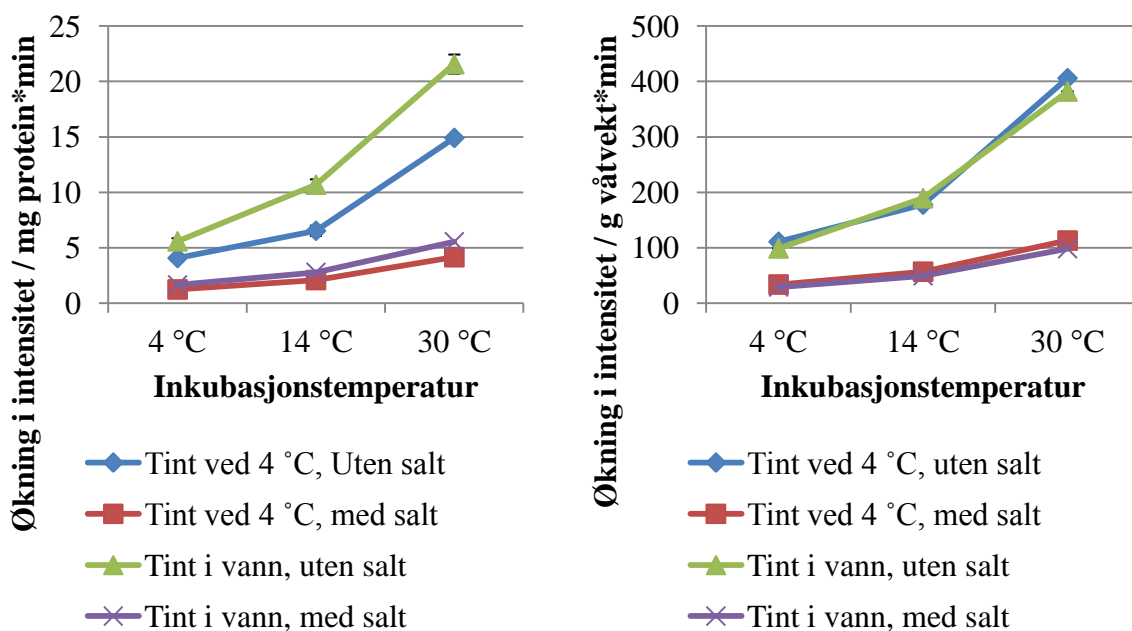
sees i figurene 3.4.3-5, der forskjellen mellom aktivitetene i prøver uten salt og i prøver med salt gradvis ble mindre ved lavere temperaturer. Aktiviteten i superkjølte prøver målt i reaksjonsbuffer med salt ved 30 °C var 32 % av aktiviteten målt i reaksjonsbuffer uten salt. Ved 4 °C var aktiviteten i superkjølte prøver målt i reaksjonsbuffer med salt 38 % av aktiviteten målt i reaksjonsbuffer uten salt.

Alle prøver hadde totalt sett en liten økning i aktivitet over lagringsperioden, og aktiviteten av katepsin B tapes derfor heller ikke her under oppbevaringen, kjølt eller superkjølt, selv om aktiviteten hemmes av lavere temperaturer. Enzymet kan derfor bidra til videre mørning etter superkjølt mellomlagring dersom det lekker ut av lysosomene. Det kan også være noe aktivt i saltet kjøtt ved 4 °C og 14 °C, og vil dermed kunne bidra til mørning i fenalår. Økningen i aktivitet samsvarer ikke med tidligere studier av aktivitet av katepsin B-lignende enzymer i svinekjøtt, der aktiviteten av katepsin B etter 20 dagers lagring hadde avtatt til 30 % av opprinnelig aktivitet ved slaktetidspunktet (Toldrá og Etherington, 1988).

Aktivitetene målt ved 30 °C i 2014 var lavere enn de som ble målt i 2013, noe som kan skyldes sesongvariasjoner mellom lammelårene, eller at lagringsbetingelsene i 2014 var noe ulike betingelsene i 2013, selv om dette ikke ble registrert. Det kan også skyldes at prøvene i 2013 ble holdt i vannbad i 15 minutter for temperaturutjevning, mens prøvene fra 2014 ble holdt i kun 5 minutter. Dette var imidlertid før tilsats av substrat, og inkuberingstiden med substrat var lik. En annen grunn kan være at blakking av prøvene fra 2013 har skjedd uten at dette ble observert med det blotte øye, da disse prøvene ble satt på is etter tilsats av stoppbuffer.

Alle aktiviteter av katepsin B-lignende enzymer var lavere ved lavere temperatur, noe som er forventet, da enzymenes aktivitet hemmes ved senking av temperatur etter slakt (Etherington, 1984). Ved 14 °C var katepsin B-aktiviteten ved 21 dagers lagring av superkjølte prøver 53 % av aktiviteten ved 30 °C ved tilsvarende uttak. Ved 4 °C var aktiviteten kun 19 % av aktiviteten ved 30 °C. Tidligere forsøk på laks viste også at katepsin B-aktiviteten var lavere ved lavere temperaturer, da den var lavere ved 5 °C enn ved 20 °C (Duun og Rustad, 2008).

I figur 3.4.6 er katepsin B-aktivitet i homogenat av fryste prøver tint ved 4 °C, samt i fryste prøver tint i rennende vann, presentert per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt.

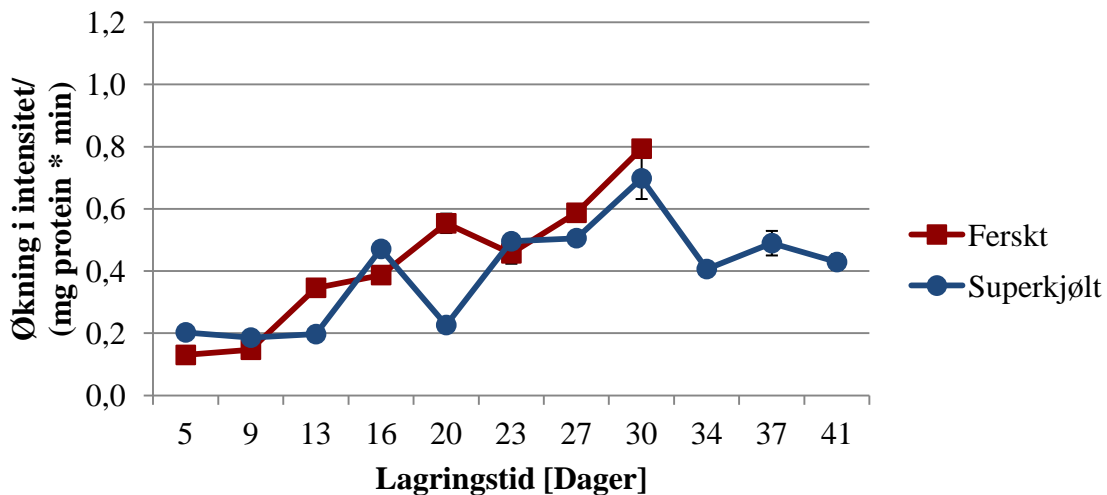


**Figur 3.4.6:** *Katepsin B-aktivitet per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt i homogenater av fryst lammekjøtt fra våren 2014 tint ved 4 °C, samt i rennende vann. Inkuberingstiden var 15 minutter ved inkuberingstemperatur på 30 °C, 60 minutter ved 14 °C og 120 minutter ved 4 °C. Verdier og feilfelt for prøver uten salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.2 (30 °C), D.4 (14 °C) og D.6 (4 °C) i vedlegg D, mens verdier og feilfelt for prøver med salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.3 (30 °C), D.5 (14 °C) og D.7 (4 °C) i vedlegg D. Merk at aksene har andre maksimum enn i figur 3.4.1 og 3.4.2, dette på grunn av bedre synlighet av alle prøver.*

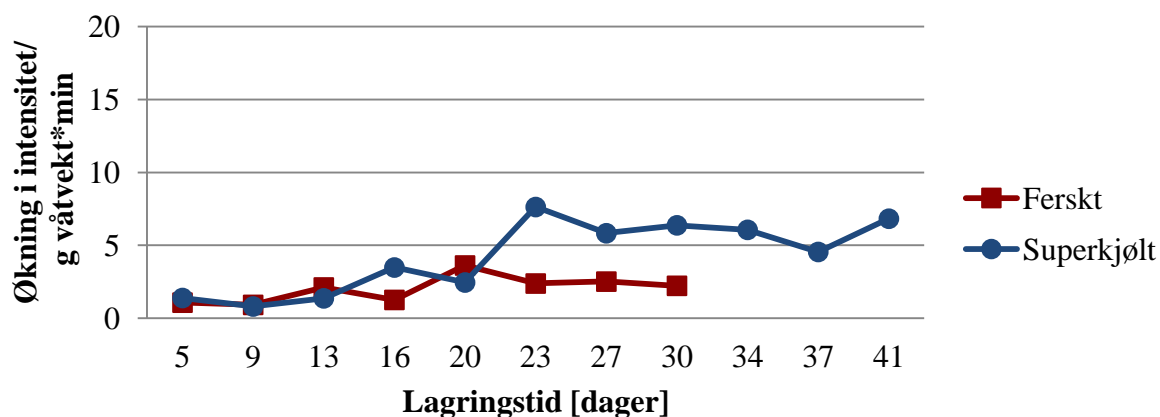
Figuren viser at aktiviteten var tilnærmet identisk i de fryste prøvene med ulike tinemetoder per g våtvekt og minutt, mens det var noe forskjell per mg protein og minutt. Forskjellen skyldes at de fryste prøvene tint ved 4 °C inneholdt mer protein enn de fryste prøvene tint i rennende vann. Forholdet mellom aktivitet og mg protein (og minutt) blir da lavere i fryste prøver tint ved 4 °C. Den høye aktiviteten i de fryste prøvene viser at aktiviteten av katepsin B også bevares ved frysing, slik at enzymet kan bidra til videre mørning etter tining. Aktiviteten i fryse/tinte prøver var høyere enn i ferske prøver ved 30 °C, og de superkjølte prøvene hadde en aktivitet som lå rundt aktiviteten for de fryste prøvene. Resultatene samsvarer ikke fullstendig med resultater funnet for  $\alpha$ -glukosidase i homogenater fra laks (Gallart-Jornet et al., 2007), der de superkjølte prøvene hadde aktiviteter i homogenat som lå mellom kjølte og

fryste prøver, og der det ble observert en reduksjon i aktiviteten av  $\alpha$ -glukosidase over tid. Dette er imidlertid et annet enzym, og det er forventet å ha andre egenskaper enn katepsin B.

Figurene 3.4.7 og 3.4.8 viser aktiviteten av katepsin B-lignende enzymer i CTF fra ferske og superkjølte prøver fra høsten 2013, henholdsvis per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt.



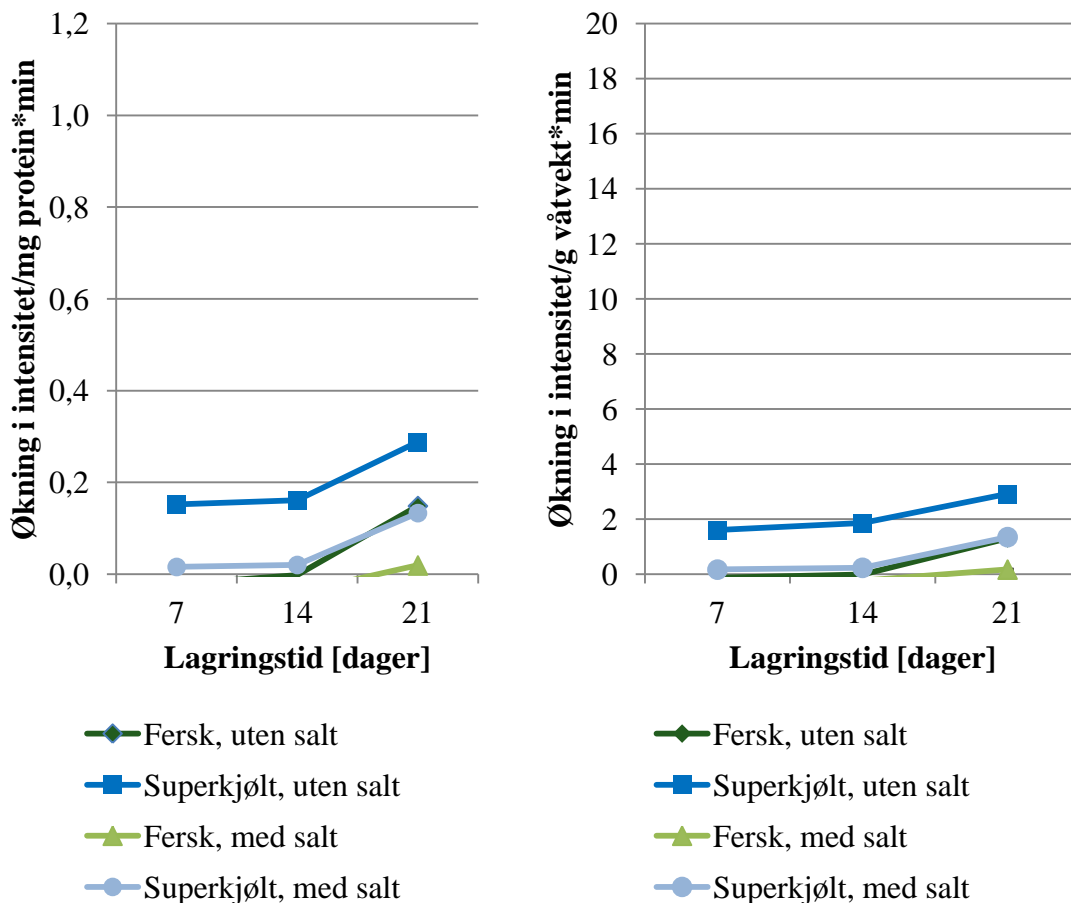
**Figur 3.4.7:** Katepsin B-aktivitet per mg protein og minutt i CTF av lammekjøtt lagret ved 4°C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6°C (superkjølte prøver) fra høsten 2013. Inkuberingstemperaturen var 30 °C, og inkuberingstiden var 15 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell D.1 i vedlegg D, og er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam"(Friestad, 2013).



**Figur 3.4.8:** *Katepsin B-aktivitet per g våtvekt og minutt i CTF av lammekjøtt lagret ved 4°C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6°C (superkjølte prøver) fra høsten 2013. Inkuberingstemperaturen var 30 °C, og inkuberingstiden var 15 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell D.1 i vedlegg D, og er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013).*

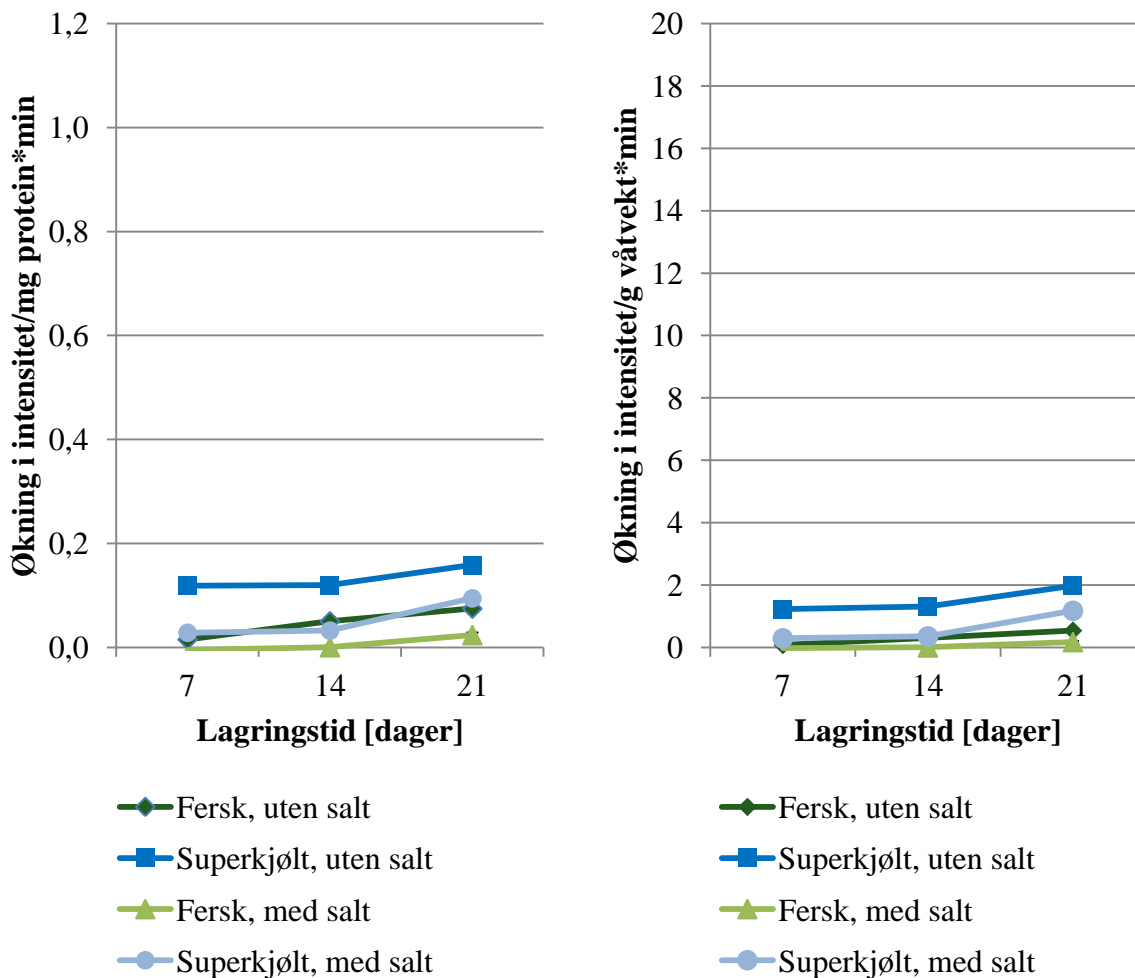
Aktiviteten i de ferske og superkjølte prøvene var tilnærmet like til og med den 13. dagen etter slakt per g våtvekt (figur 3.4.8). Etter dag 20 økte imidlertid aktiviteten av katepsin B i CTF fra superkjølte prøver vesentlig mer enn i CTF fra ferske prøver, og ved dag 23 var aktiviteten hele 3,1 ganger større i CTF fra superkjølt kjøtt enn i CTF fra ferskt kjøtt. Forskjellen kan skyldes større grad av fryse/tine-ødeleggelse i de superkjølte prøvene, som vil føre til større lekkasje av katepsin B fra lysosomer og ut i ekstracellulær væske. Større grad av membranødeleggelser underbygges av de tidligere resultatene med større mengde CTF i superkjølte enn i kjølte prøver (figur 3.1.1). Per mg protein (figur 3.4.7) var det imidlertid ikke like store forskjeller i aktivitet mellom de superkjølte og de ferske prøvene, noe som kan skyldes at det var mer protein i de superkjølte prøvene enn i de ferske prøvene (se figur 3.2.3). Forholdet mellom høyere økning i intensitet og større mengde proteiner blir dermed like stort som forholdet mellom en lavere økning i intensitet og en mindre mengde proteiner, slik at forskjellene i økning i intensitet ikke synes godt i figur 3.4.7.

Figurene 3.4.9-11 viser katepsin B-aktivitet i CTF fra ferske og superkjølte prøver med og uten 5 % salt i løsningen ved inkubering med substrat. Aktiviteten er vist som økning i intensitet per mg og minutt og per g våtvekt og minutt. Inkuberingstemperaturer og -tider er henholdsvis 30 °C og 15 minutter (figur 3.4.9), 14 °C og 60 minutter (figur 3.4.10) og 4 °C og 120 minutter (figur 3.4.11).

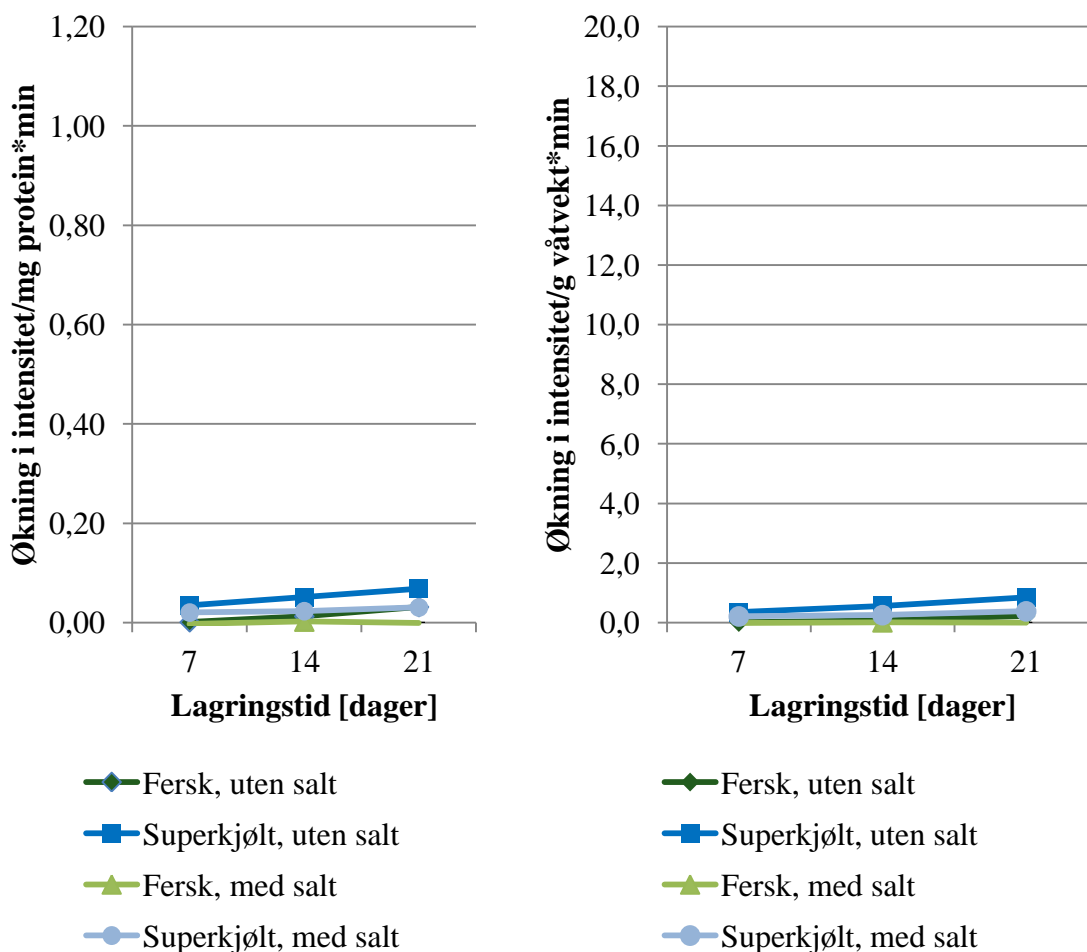


**Figur 3.4.9:** Kathepsin B-aktivitet per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt i CTF av lammekjøtt lagret ved 4°C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6°C (superkjølte prøver) fra våren 2014. Inkuberingstemperaturen var 30 °C, og inkuberingstiden var 15 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) for prøver uten salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.2 i vedlegg D, mens verdier og feilfelt for prøver med salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.3 i vedlegg D.





**Figur 3.4.10:** *Katepsin B-aktivitet per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt i CTF av lammekjøtt lagret ved 4°C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6°C (superkjølte prøver) fra våren 2014. Inkuberingstemperaturen var 14 °C, og inkuberingstiden var 60 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) for prøver uten salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.4 i vedlegg D, mens verdier og feilfelt for prøver med salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.5 i vedlegg D.*



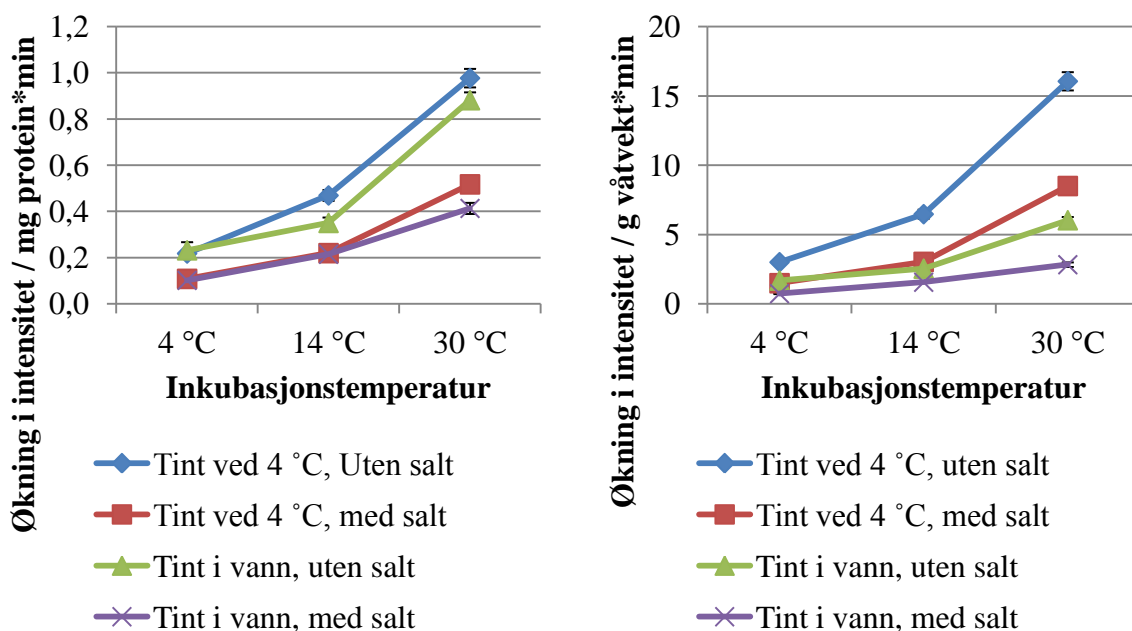
**Figur 3.4.11:** *Katepsin B-aktivitet per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt i CTF av lammekjøtt lagret ved 4 °C (ferske prøver), samt fra lammekjøtt lagret ved -1,6 °C (superkjølte prøver) fra våren 2014. Inkuberingstemperaturen var 4 °C, og inkuberingstiden var 120 minutter. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) for prøver uten salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.6 i vedlegg D, mens verdier og feilfelt for prøver med salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.7 i vedlegg D.*

Figurene viser at aktiviteten i CTF fra de superkjølte prøvene var høyere enn i CTF fra de ferske prøvene, og at de superkjølte prøvene med salt i bufferen hadde en tilsvarende eller høyere aktivitet enn de ferske prøvene uten salt i bufferen per g våtvekt. Dette kan igjen skyldes at mer katepsin B har lekket ut i CTF i de superkjølte prøvene, noe som tyder på større grad av fryse/tineødeleggelse i de superkjølte prøvene. Aktiviteten var igjen avhengig av temperatur og saltinnhold, som forventet, og sank med synkende temperatur og tilsatt salt. Ved 14 °C var katepsin B-aktiviteten ved 21 dagers lagring av superkjølte prøver 41 % av

aktiviteten ved 30 °C ved tilsvarende uttak (med aktivitet per g våtvekt og minutt som utgangspunkt). Ved 4 °C var aktiviteten i tilsvarende prøver kun 18 % av aktiviteten ved 30 °C. Aktiviteten i superkjølte prøver 21 dager etter slakt målt i reaksjonsbuffer med salt var 12 % av aktiviteten målt i reaksjonsbuffer uten salt ved 30 °C.

Ikke målbare aktiviteter i ferske prøver kan skyldes for kort inkuberingstid for enkelte prøver, eller at membranskadene ikke var store nok til å forårsake lekkasje av katepsin B. Verdiene for superkjølte prøver 2014 var svært like verdiene funnet i 2013, mens de ferske prøvene i 2014 hadde lavere verdier enn verdiene funnet i 2013. Forskjellen kan henge sammen med at totalaktiviteten i homogenatene var lavere i 2014, eller det kan igjen skyldes sesongvariasjoner mellom lammelårene og forskjellen i lengden på temperaturutjevningen før tilsats av substrat. Det kan også igjen være på grunn av at blakking av prøvene har kun skjedd i 2013 uten at dette ble observert med det blotte øye, forårsaket av at disse prøvene ble satt på is etter tilsats av stopp-buffer. Høyere verdier av katepsin B-aktivitet i superkjølte prøver tyder på større grad av membranødeleggelse på grunn av frysing/tining.

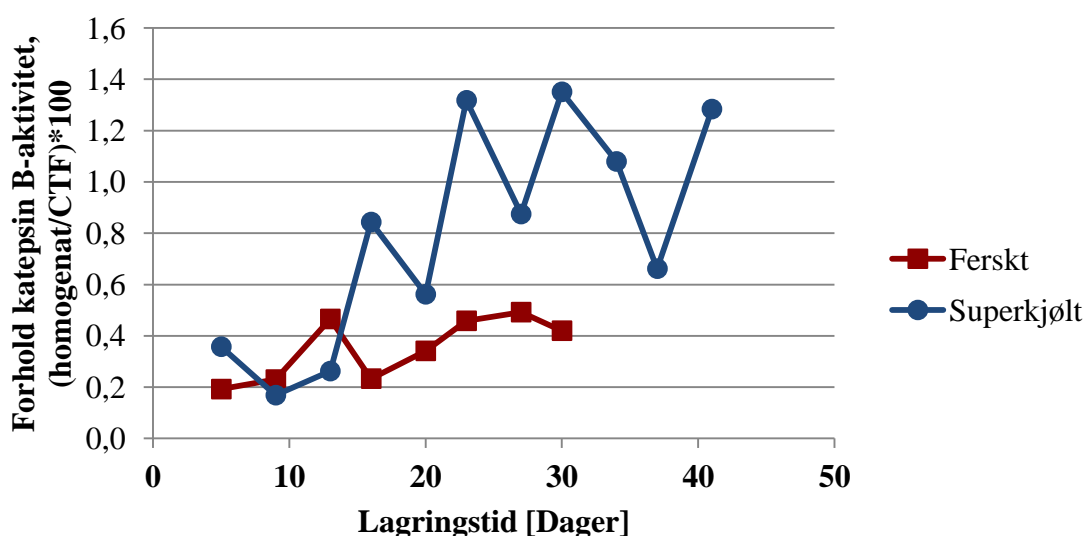
Figur 3.4.12 viser katepsin B-aktivitet i CTF fra frysede prøver, med og uten 5 % salt i løsningen ved inkubering med substrat. Aktiviteten er vist som økning i intensitet per mg og minutt og per g våtvekt og minutt.



**Figur 3.4.12:** Katepsin B-aktivitet per mg protein og minutt og per g våtvekt og minutt i CTF av fryst lammekjøtt fra våren 2014 tint ved 4 °C, samt i rennende vann. Inkuberingstiden var 15 minutter ved inkuberingstemperatur på 30 °C, 60 minutter ved 14 °C og 120 minutter ved 4 °C. Verdier og feilfelt (SEM, middelfelen) for prøver uten salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.2 (30 °C), D.4 (14 °C) og D.6 (4 °C) i vedlegg D, mens verdier og feilfelt for prøver med salt i reaksjonsbufferen er gitt i tabell D.3 (30 °C), D.5 (14 °C) og D.7 (4 °C) i vedlegg D.

Aktiviteten i de fryste prøvene ved 30 °C var mye høyere enn i de ferske og superkjølte prøvene, noe som skyldes at ødeleggelsen av membranstrukturen i de fryste prøvene er større enn i de superkjølte og kjølte prøvene. Det kan også skyldes at aktiviteten i homogenatene var høy. Forskjellen fra aktiviteten i de kjølte og superkjølte prøvene var mindre ved lavere temperaturer. Aktiviteten i de superkjølte prøvene lå mellom aktiviteten i de ferske og de fryste prøvene, noe som samsvarer med tidligere resultater for  $\alpha$ -glukosidase i CTF fra laks (Gallart-Jornet et al., 2007). Dette kan tilsi at superkjølt kjøtt brukt til tillaging av fenalår vil ha en salteperiode som varer en tid mellom salteperioden for fryste og for kjølte lammelår, som også resultatet for mengde CTF i avsnitt 3.1 underbygger. Som nevnt i avsnitt 1.9, vil salt lettere trenge inn i kjøtt med strukturforandringer forårsaket av frysing og tining.

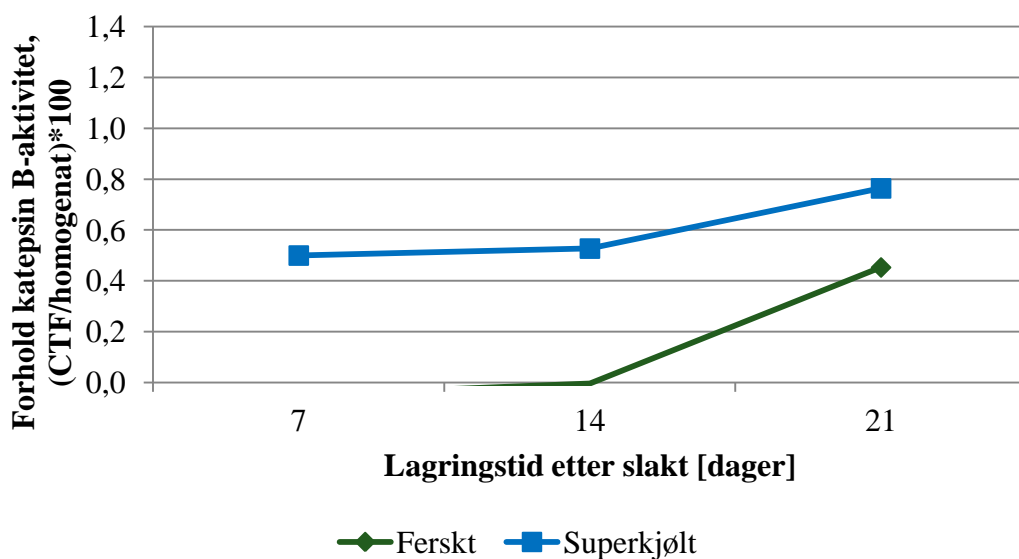
Figur 3.4.13 viser forholdet mellom aktiviteten i CTF og i homogenat for prøvene fra 2013 ved inkuberingstemperatur på 30 °C og inkuberingstid på 15 minutter.



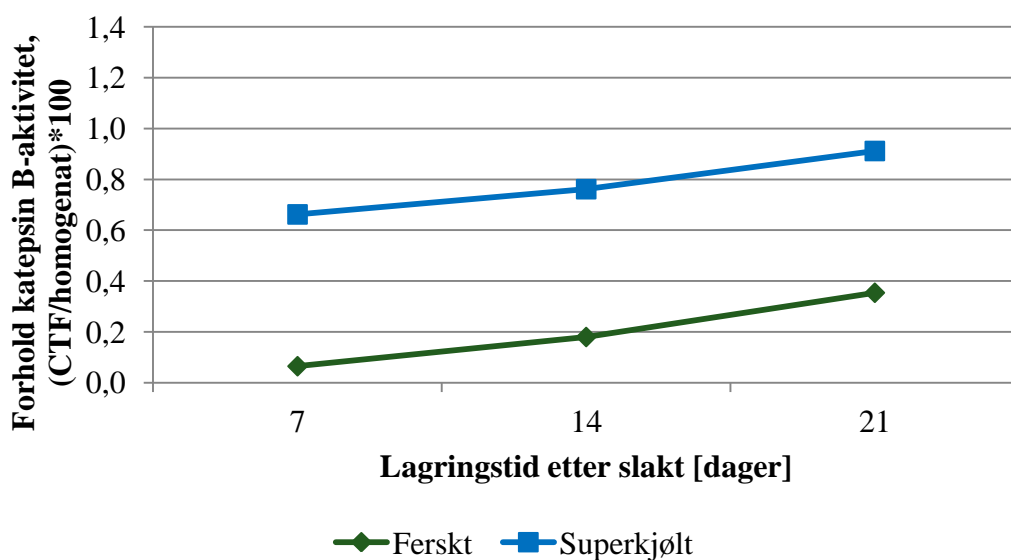
**Figur 3.4.13:** Forhold mellom aktivitet av katepsin B per gram våtvekt i CTF og homogenat for prøver fra lammekjøtt fra høsten 2013. Inkuberingstemperaturen var 30 °C, og inkuberingstiden var 15 minutter. Verdier er gitt i tabell D.1 i vedlegg D, og er tilpasset fra verdier rapportert i prosjektet "Superkjøling av lam" (Friestad, 2013).

Figuren viser at forholdet mellom aktiviteten i CTF og i homogenat i superkjølte prøver økte mer enn forholdet i de ferske prøvene. Dette tyder på at lekkasjen av katepsin B-lignende enzymer var større i de superkjølte prøvene, noe som igjen tyder på større membranødeleggelse i disse prøvene.

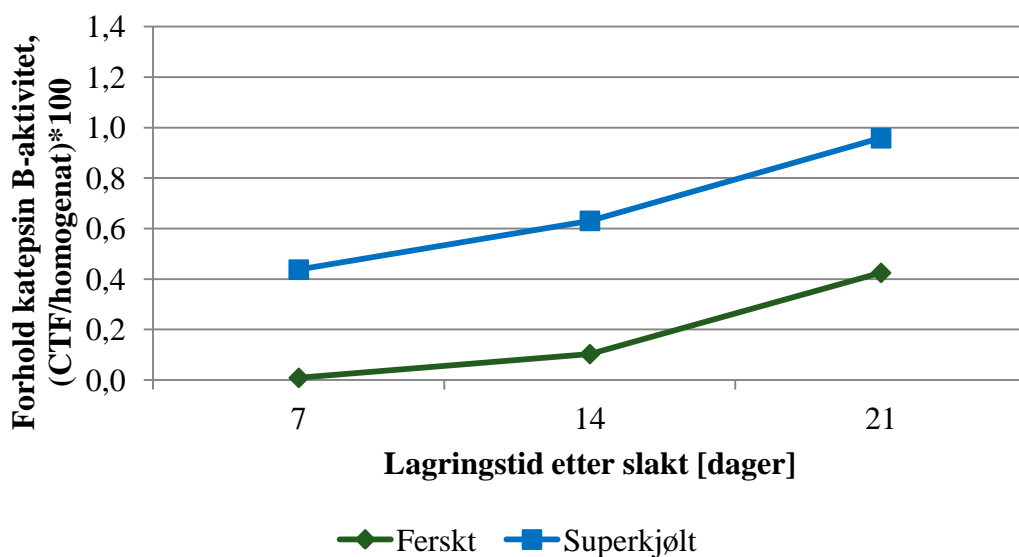
Figurene 3.4.14-16 viser forholdet mellom aktiviteten i CTF og i homogenat for superkjølte og kjølte prøver fra 2014 ved 30 °C, 14 °C og 4 °C, uten salt i reaksjonsbufferen. Forholdet i målinger med salt i reaksjonsbufferen er utelatt, da dette er fra de samme prøvene som målingene uten salt, og flere av målingene i CTF fra ferske prøver var ved tilsatt av salt dessuten lave eller ikke målbare.



**Figur 3.4.14:** Forhold mellom aktivitet av katepsin B per gram våtvekt i CTF og homogenat for prøver fra kjølt og superkjølt lammekjøtt fra våren 2014 uten salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstemperaturen var 30 °C, og inkuberingstiden var 15 minutter. Verdier er gitt i tabell D.2 i vedlegg D,



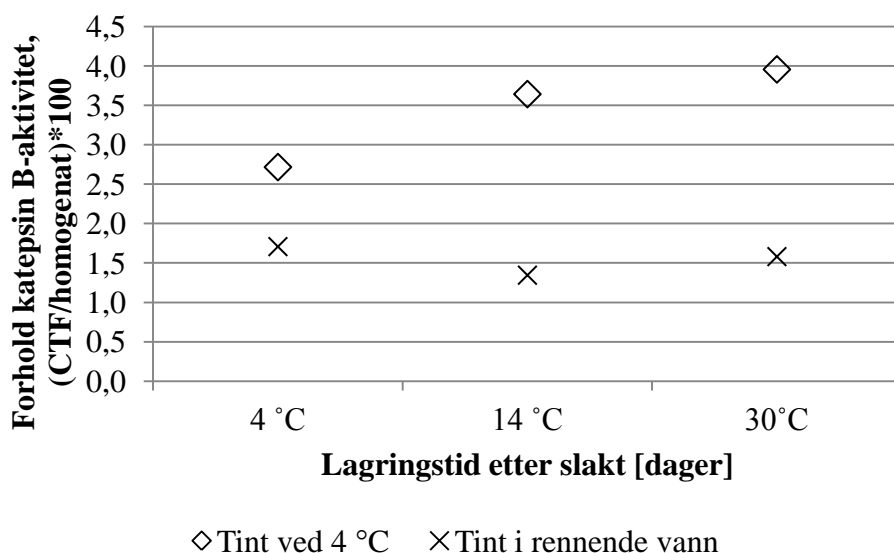
**Figur 3.4.15:** Forhold mellom aktivitet av katepsin B per gram våtvekt i CTF og homogenat for prøver fra kjølt og superkjølt lammekjøtt fra våren 2014 uten salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstemperaturen var 14 °C, og inkuberingstiden var 60 minutter. Verdier er gitt i tabell D.4 i vedlegg D,



**Figur 3.4.16:** Forhold mellom aktivitet av katepsin B per gram våtvekt i CTF og homogenat for prøver fra kjølt og superkjølt lammekjøtt fra våren 2014 uten salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstemperaturen var 4 °C, og inkuberingstiden var 120 minutter. Verdier er gitt i tabell D.6 i vedlegg D,

Også i disse figurene er forholdet mellom aktiviteten av katepsin B-lignende enzymer i CTF mot homogenat høyere i superkjølte prøver enn i ferske prøver, og større lekkasje fra lysosomer har dermed skjedd i de superkjølte prøvene, noe som igjen underbygger at membranødeleggelsene i de superkjølte prøvene var større enn i de ferske prøvene. Det var lite forskjell i forholdene ved ulike temperaturer. I de ferske prøvene var, som nevnt, aktiviteten ikke målbar i CTF for alle prøver, noe som kan tyde på at inkuberingstiden ikke var lang nok eller at det ikke har skjedd tilstrekkelig lekkasje fra lysosomene i disse prøvene.

Figur 3.4.17 viser forholdet mellom aktiviteten i CTF og i homogenat for frysede/tinte prøver fra 2014 ved ulike temperaturer.



**Figur 3.4.17:** Forhold mellom aktivitet av katepsin B per gram våtvekt i CTF og homogenat for prøver fra fryst/tint lammekjøtt fra våren 2014 uten salt i reaksjonsbufferen. Inkuberings-temperaturen var 14 °C, og inkuberingstiden var 60 minutter. Verdier er gitt i tabell D.2 (30 °C), D.4 (14 °C) og D.6 (4 °C) i vedlegg D. Merk at aksene har andre verdier enn i figur 3.4.13-16.

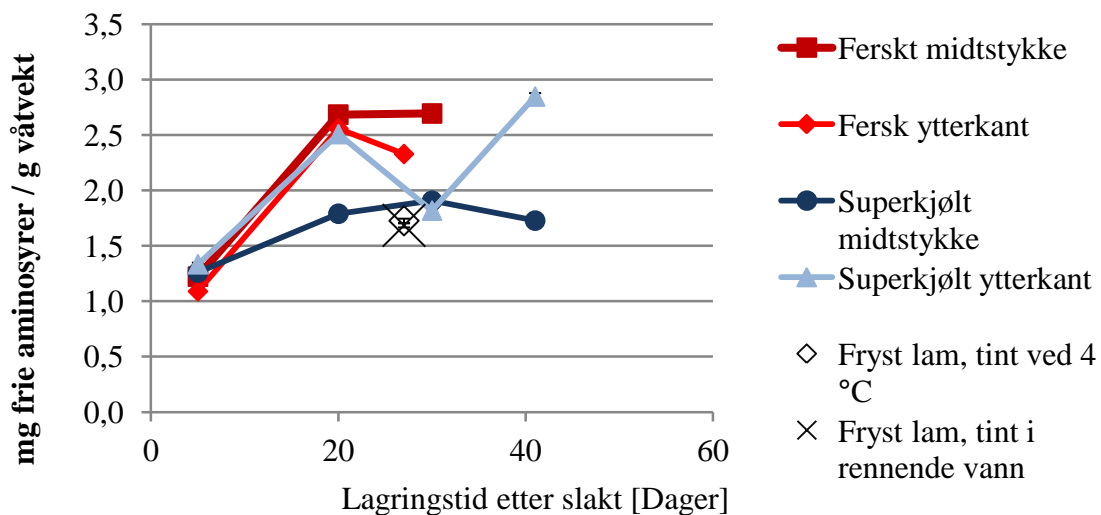
Forholdet mellom aktiviteten i CTF og i homogenat var større for de fryste/tinte prøvene enn for de superkjølte prøvene. Dette underbygger at membranødeleggelsene som følge av frysing/tining i de fryste prøvene var større enn i de superkjølte prøvene, og at membranødeleggelsen i superkjølte prøver lå mellom ødeleggelsene i fryste/tinte prøver og ødeleggelsene i kjølte prøver. Resultatene tyder igjen på at saltetiden ved tillaging av fenalår fra superkjølte lammelår vil ligge et sted mellom saltetiden for fryste lår og saltetiden for ferske lår.

Aktiviteten av katepsin B-lignende enzymer i CTF i forhold til aktiviteten i homogenat vil ikke være et entydig mål på hvilken metode som er brukt til oppbevaring av kjøtt, selv om det er en spesifikk indikator på grad av fryseødeleggelse. Dette er fordi det er usikkerhet knyttet til måling av aktiviteten, og denne vil propagere ved utregninger. I tillegg vil det forekomme sesongvariasjoner og variasjoner mellom ulike dyr, og forholdet mellom aktivitet i CTF og i homogenat vil øke med lagringstiden av kjøttet, slik at et superkjølt produkt kort tid etter slakt vil kunne ha samme forhold som et kjølt produkt etter en lengre lagringsperiode etter slakt.



### 3.5 Frie aminosyrer

Mengde frie aminosyrer gir en indikasjon på aktiviteten av proteolytiske enzymer, da det genereres flere frie aminosyrer etter hvert som proteasene degraderer proteinene (Duun, 2008). Frie aminosyrer er sluttproduktene i den proteolytiske kjeden, og er et resultat av aktivitet av eksopeptidaser (Toldra, 2006). De frie aminosyrene bidrar direkte til smak. I figur 3.5.1 er frie aminosyrer per g våtvekt av prøver fra 2013 presentert. Analysene på HPLC ble utført av ingeniør Siri Stavrum i 2014. Rådata, eksempelutregninger og beregnede verdier for dette avsnittet kan finnes i vedlegg E.



**Figur 3.5.1:** Mengde frie aminosyrer målt i homogenater av lammekjøtt tillagd høsten 2013. Analysene ble gjort i 2014. Verdier for total mengde frie aminosyrer i hver prøve er gitt i tabellene E.1-20 i vedlegg E. Feilfelt er 1,1 % av verdien, da dette ble funnet å være feilen for metoden ved måling av 5 paralleller.

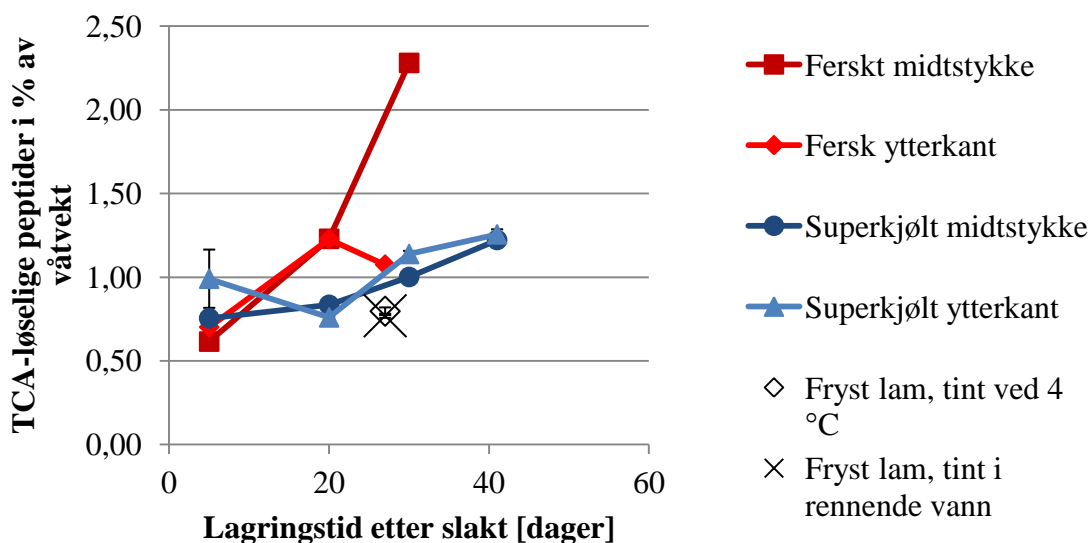
Alle prøver hadde en økning i mengde frie aminosyrer fra første uttak (5 dager etter slakt) til femte uttak (ved dag 20 etter slakt). Det superkjølte midtstykket har imidlertid en mindre økning enn de andre prøvene. De fryste prøvene har også en mindre mengde frie aminosyrer enn de andre prøvene ved tilnærmet lik lagringstid. Dette kan tyde på at aktiviteten av eksopeptidaser var lavere i superkjølt midtstykke og fryste prøver under oppbevaring enn i de andre prøvene. Tidligere studier på torsk viste at torsk kjølt på is hadde større mengder frie aminosyrer enn fryst torsk etter henholdsvis rundt 20 og rundt 35 dagers oppbevaring, men at

de superkjølte prøvene hadde noe større mengder frie aminosyrer enn kjølt torsk ved samme lagringsperiode (Duun, 2008).

Reduksjonen i mengde frie aminosyrer i enkelte prøver kan skyldes bakteriell vekst, men da det ikke ble utført mikrobiologiske analyser i prosjektoppgaven (Friestad, 2013), er dette uvisst.

### 3.6 Syreløselige peptider

Peptider løselige i TCA (her kalt syreløselige peptider) gir også en indikasjon på generell proteolytisk aktivitet av både endo- og eksopeptidaser (Hultmann, 2003). I figur 3.6.1 er syreløselige peptider per g våtvekt av prøver fra 2013 presentert. Analysene ble utført i 2014 av praktikant Caroline D. Høyen. Rådata, eksempelutregninger og beregnede verdier for dette avsnittet kan finnes i vedlegg F.



**Figur 3.6.1:** Mengde syreløselige peptider målt i homogenater av lammekjøtt tillagd høsten 2013. Analysene ble gjort i 2014. Verdier og feilfelt (SEM, middelfeilen) er gitt i tabell F.2 i vedlegg F.

De syreløselige peptidene økte totalt sett for alle prøver, og de ferske prøvene inneholdt en større mengde syreløselige peptider enn både superkjølte og fryste prøver. Økningen samsvarer med at aktiviteten av endopeptidasen katepsin B økte over tid. Større mengde syreløselige peptider i ferske prøver kan bety at aktiviteten av katepsin B var høyere i disse

prøvene enn i de superkjølte og fryste prøvene under lagring, siden lavere temperaturer hemmet enzymaktiviteten. Dette vil si at lekkasje av enzymer på grunn av fryse/tineødeleggelse vil kunne føre til større mørning i fryste eller superkjølte prøver enn i ferske prøver kun ved høyere temperaturer (tining og videre kjøleromslagring), ikke under selve lagringen fryst eller superkjølt. Dette underbygges av at teksturen i de ferske prøvene gikk i oppløsning etter hvert i lagringsforsøket, samt at lukten av prøvene ble dårligere før de superkjølte prøvene, se avsnitt 3.7.

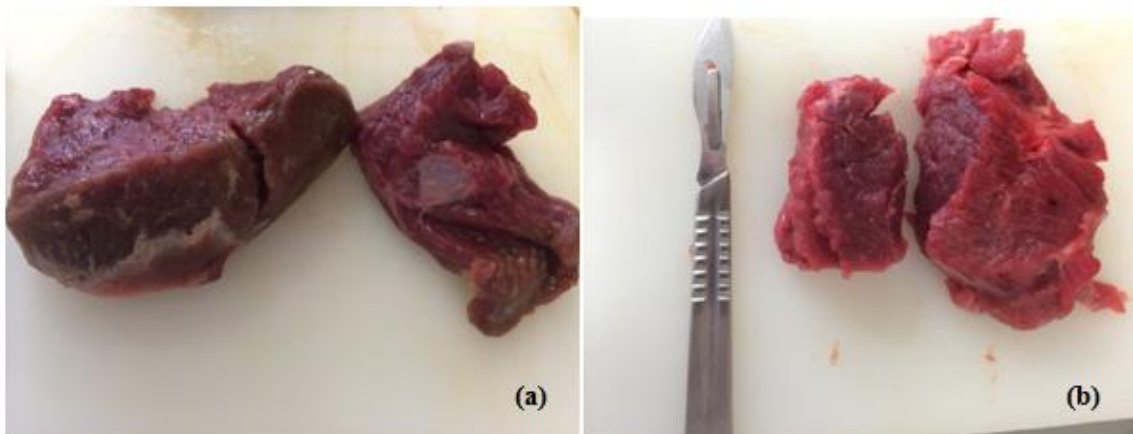
Forskjellen mellom mengden TCA-løselige peptider i prøvene var imidlertid ikke stor. I en studie av TCA-løselige peptider i svinekjøtt, der peptidene ble løst i 12 % TCA istedenfor 20 %, hadde kjølelagrede prøver også her en større mengde TCA-løselige peptider enn superkjølte prøver, og alle prøver hadde en økt mengde TCA-løselige peptider over tid (Duun, 2008).

Prøven fra det 8. uttaket (30 dager etter slakt) av ferskt midtstykke skiller seg ut fra de andre prøvene, noe som kan skyldes at dette var det siste uttaket av ferskt lammekjøtt, og det var tydelig at det var skjedd betydelig mørning i kjøttstykket, se også avsnitt 3.7.

### **3.7 Kjøttets utseende og lukt**

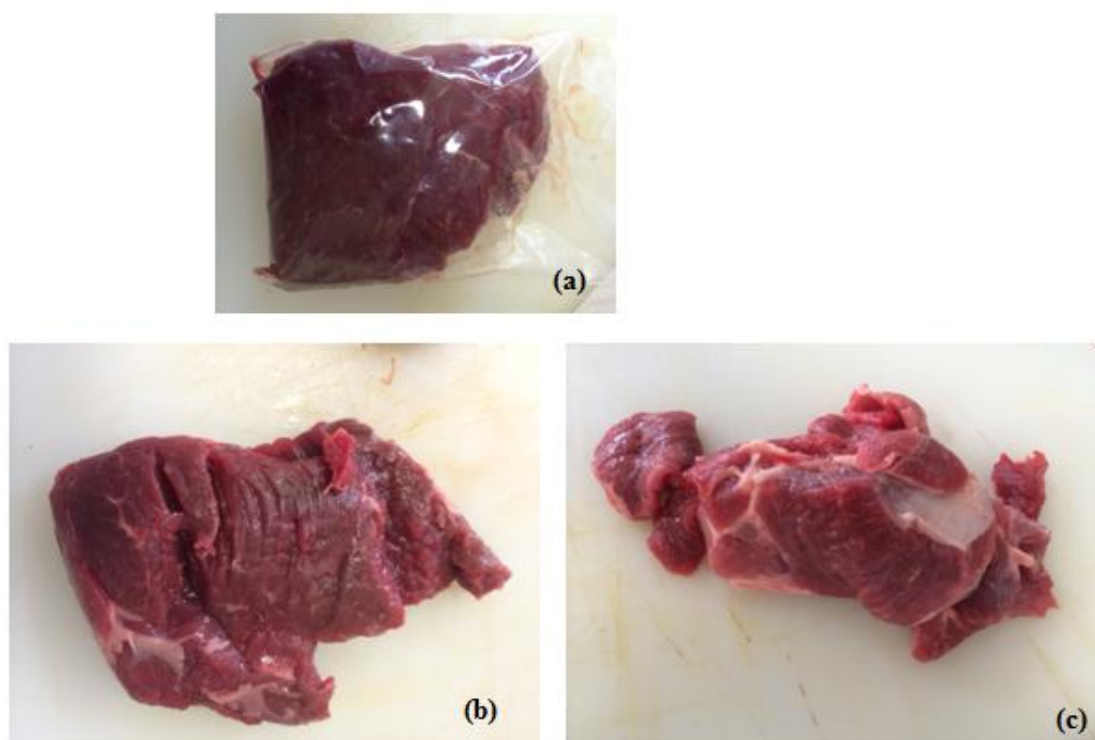
Fra og med uttak 5 (dag 20 etter slakt) høsten 2013 begynte det superkjølte kjøttet å få en sterkere lukt enn tidligere. Det var først ved uttak 7 (dag 27 etter slakt) at alle prøvene hadde begynt å få en sterkere lukt, og ved uttak 8 (dag 30 etter slakt, siste dag for uttak av ferskt kjøtt) hadde ferskt kjøtt begynt å gå i oppløsning. Ved uttak 10 (dag 37 etter slakt) var det så å si ingen motstand ved hurtigmiksing av det superkjølte kjøttet. Det ble imidlertid ikke utført noen sensorisk analyse av kjøttet, og det vites derfor ikke om tekstur og smak ville blitt opplevd som god gjennom hele lagringsperioden.

Våren 2014 ble det ikke lagt merke til noen spesiell lukt fra det superkjølte kjøttet. Ved det 2. uttaket våren 2014 begynte ferskt og superkjølt lam imidlertid å skille seg i tekstur og farge (se figur 3.7.1). Det ferske kjøttet begynte å lukte sterkere, og det ble mer klebrig enn tidligere.



**Figur 3.7.1:** Lammekjøtt 14 dager etter slakt. (a) Ferskt lam, (b) Superkjølt lam.

Også ved det 3. uttaket var det forskjell mellom prøvene (se figur 3.7.2), men det ble ikke like tydelig på bildene.



**Figur 3.7.2:** Lammekjøtt 21 dager etter slakt. (a) Ferskt lam i lynlåsposten. (b) Ferskt lam. (c) Superkjølt lam.

Som figurene viser, var det superkjølte kjøttet mye mer klart rødt enn det ferske kjøttet. Dette kan skyldes at det superkjølte kjøttet inneholder mer oksymyoglobin (som har en klar

rødfarge, se avsnitt 1.4) enn det ferske kjøttet. Dette kan skyldes at prosesser i kjøttet som ellers ville omsette oksygen har gått saktere på grunn av den lave temperaturen i superkjølt kjøtt. Det ferske kjøttet ble utsatt for oksygen over en lengre periode, da lynlåsposene det ble oppbevart i etter den første uken etter slakt ikke var helt tomme for luft. Dette har mest sannsynlig ført til at myoglobin i kjøttet forekom som metmyoglobin. Det kan i tillegg ha vært økt bakterievekst i kjøttet, noe som virket sannsynlig da kjøttet fra det 3. uttaket var klebrig, det var skjedd endringer i teksturen slik at kjøttet lettere gikk i oppløsning enn tidligere, og det hadde et gulbrunt lag av væske som hang igjen i lynlåsposen (figur 3.7.2(a)). Det ble imidlertid ikke foretatt mikrobiologiske analyser til å underbygge dette. En annen årsak til forskjellen i farge kan være at det superkjølte kjøttet kan ha vært mindre utblødd enn det ferske kjøttet, noe som kan ha forårsaket at hemoglobin har bidratt til den klare rødfargen.

### 3.8 Videre arbeid

I fryste prøver tint i rennende vann virket det som om tineødeleggelsene var mindre enn i fryste prøver tint ved 4 °C. Det ville derfor være interessant i senere forsøk å se hvordan tining i rennende vann eller andre raske tiningsmetoder av superkjølte prøver ville påvirke lammekjøtt. I tillegg ville det være interessant å sammenligne sensoriske analyser og målinger av enzymaktivitet ved bruk av kjølte, superkjølte og fryste lammelår ved tillaging av fenalår.

Sensorisk analyse må også utføres for å finne ut hvordan lammekjøtt lagret i lagringsforsøk tilsvarende forsøket utført i denne oppgaven ville oppleves for forbrukere. I tillegg kunne det være interessant å måle aktivitet av kalpainer i lammekjøtt når enzymer er separert fra kalpastatin, samt ved bruk av en mer egnet ekstraksjonsbuffer.



## 4 Konklusjon

Målet med denne oppgaven var å finne ut hvordan ulike oppbevaringsmetoder påvirker lammekjøtt. Resultater funnet fra lagringsforsøk av kjølt og superkjølt lam 2013 ble sammenlignet med resultater oppnådd for kjølt, superkjølt og fryst/tint lam i 2014.

Aktiviteten av kalpain-lignende enzymer var lav og ikke målbar i vannekstrakter fra lammekjøtt fra 2013 og i vannekstrakter fra svinekjøtt fra 2014, og ble derfor ikke målt i prøver fra lammekjøtt fra 2014.

Målinger av katepsin B-aktivitet i løsninger med tilsatt salt og ved ulike temperaturer viste at aktiviteten ble hemmet av tilsatt salt og senket temperatur. Ved senkede temperaturer var imidlertid ikke forskjellen like stor mellom aktivitet med tilsatt salt og aktiviteten uten tilsatt salt som ved høyere temperaturer. Målinger av mengde CTF, mengde vannløselig protein i CTF og forholdet mellom katepsin B-aktivitet i CTF og i homogenat tydet på mindre frys/tine-ødeleggelse i det superkjølte kjøttet enn i det fryste kjøttet. Ødeleggelsene var imidlertid større enn i det ferske kjøttet. Forholdet mellom katepsin B-aktivitet i CTF og i homogenat i fryste prøver tydet på mindre frys/tine-ødeleggelse i fryst kjøtt tint i rennende vann enn i fryst kjøtt tint ved 4 °C.

Frie aminosyrer og syreløselige peptider økte totalt sett i alle prøver fra 2013. Dette tyder på at både endo- og eksopeptidaser var aktive under både kjølt, superkjølt og fryst lagring av lammekjøtt. Lavere mengder i superkjølte og fryste prøver (med unntak av frie aminosyrer i superkjølt ytterkant) kan tyde på mindre proteolytisk aktivitet under oppbevaring i disse prøvene. Målingene av katepsin B-aktivitet viste dermed at lekkasje av enzymer fra lysosomer i superkjølte og fryste prøver vil føre til økt mørning kun dersom prøvene lagres ved høyere temperaturer etter superkjølt eller fryst mellomlagring.

Denne oppgaven viste at superkjøling fører til noe frys/tine-ødeleggelse av lammekjøtt i forhold til i kjølt kjøtt, men ødeleggelsene var mindre enn i fryst kjøtt. Ved bruk av superkjølt kjøtt til tillaging av fenalår, vil det dermed forventes at saltetiden til kjøttet må ligge et sted i området mellom fryst og ferskt kjøtts saltetid. Siden salt hemmet katepsin B-aktiviteten, vil mørning skje saktere i fenalår enn i usaltede lammelår. Fryst kjøtt tint sakte ved 4 °C hadde

større membranødeleggelse enn fryst kjøtt tint raskere i rennende vann. Det ville derfor være interessant å utføre forsøk på superkjølt kjøtt tint raskt for å se om dette ville føre til mindre membranødeleggelse enn ved sakte tining av superkjølt kjøtt.

Det ble ikke foretatt noen sensorisk analyse av lammekjøttet i denne oppgaven, og det må derfor gjøres videre undersøkelser for å finne ut hvordan kjøtt lagret ved de ulike lagringsmetodene vil oppleves for forbrukere. Det ville også være interessant å studere endringer i enzymaktivitet under tillaging av fenalår ved bruk av lammelår oppbevart ved ulike temperaturer, samt hvordan de ulike lagringsmetodene vil påvirke smaken av produktet.



## Referanser:

- Animalia. (2012). *Lag ditt eget fenalår* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://www.animalia.no/Slakt--kjott--og-eggkvalitet/Spekematproduksjon/Aktuelt-og-fagstoff/Lag-ditt-eget-fenalar/> [Nedlastet 20.02.2014].
- Barrett, A. J. & Kirschke, H. (1981). Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol*, 80 Pt C(535-61).
- Bio-Rad Laboratories Inc. (2013). *Quick Start™ Bradford Protein Assay Instruction Manual* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf> [Nedlastet 05.12.2013].
- Boehm, M. L., Kendall, T. L., Thompson, V. F. & Goll, D. E. (1998). Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *Journal of Animal Science*, 76(9), 2415-2434.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(248-54).
- Ceña, P., Jaime, I., Beltrán, J. A. & Roncalés, P. (1992). Proteolytic activity of isolated lamb calpains on myofibrils under the conditions of pH, Ca<sup>2+</sup> concentration and temperature existing in postmortem muscle. *Z Lebensm Unters Forsch*, 194(3), 248-51.
- Cheret, 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.
- Coulter, T. P. (2009). *Food the chemistry of its components*, Cambridge, Royal Society of Chemistry.
- Duun, A. S. (2008). *Superchilling of muscle food. Storage stability and quality aspects of salmon (Salmo salar), cod (Gadus morhua) and pork*. Dr. ing.- avhandling, , Institutt for Bioteknologi, NTNU.
- Duun, A. S. & Rustad, T. (2007). Quality changes during superchilled storage of cod (Gadus morhua) fillets. *Food Chemistry*, 105(3), 1067-1075.
- Duun, A. S. & Rustad, T. (2008). Quality of superchilled vacuum packed Atlantic salmon (Salmo salar) fillets stored at -1.4 and -3.6 degrees C. *Food Chemistry*, 106(1), 122-131.

- Edmunds, T., Nagainis, P. A., Sathe, S. K., Thompson, V. F. & Goll, D. E. (1991). Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of  $\mu$ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1077(2), 197-208.
- Samtale med Erlend Indergård (forsker ved SINTEF Energi AS). (2013).
- Etherington, D. J. (1984). The Contribution of Proteolytic-Enzymes to Postmortem Changes in Muscle. *Journal of Animal Science*, 59(6), 1644-1650.
- Flynn, K. J. (1988). Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. *Chemistry and Ecology*, 3(269-293).
- Forskningsrådet. (2011). *Optimal verdikjede for ferskt lam* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://www.forskningsradet.no/servlet/Satellite?c=Prosjekt&cid=1253966780726&pageName=bionaer/Hovedsidemal&p=1253971968637> [Nedlastet 14.11.2013].
- Forskrift om dypfryste næringsmidler. (2008). *Forskrift om dypfryste næringsmidler: Trådt i kraft 19. desember 2008 nr 1618*. [Internettside]. Tilgjengelig fra: [http://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-19-1618/KAPITTEL\\_2#KAPITTEL\\_2](http://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-19-1618/KAPITTEL_2#KAPITTEL_2) [Nedlastet 28.05. 2014].
- Forskrift om Fenalår som geografisk betegnelse. (2012). *Forskrift om beskyttelse av Fenalår fra Norge som geografisk betegnelse: Trådt i kraft 3. oktober 2012 nr 935*. [Internettside]. Tilgjengelig fra: [http://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-10-03-935?q=FOR-2012-10-03-935\\*](http://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-10-03-935?q=FOR-2012-10-03-935*) [Nedlastet 20.02.2014].
- Friestad, E. (2013). Superkjøling av lam. Prosjektoppgave i emnet "TBT4500 – Bioteknologi Fordypningsprosjekt"
- Gaarder, M. (2011). *The importance of the calpain system in post mortem Atlantic salmon (Salmo salar L.) muscle in relation to texture*. Dr. ing.- avhandling, , Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, Universitetet for miljø- og biovitenskap.
- Gallart-Jornet, L., Rustad, T., Barat, J. M., 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.
- Hardin, J., Bertoni, G., Becker, W. M. & Kleinsmith, L. J. (2012). *Becker's world of the cell*, Boston, Benjamin Cummings.
- Hemmer, E. (1997). *Kjøtt-teknologi*, Trondheim, Tapir forlag.
- Hemmingsen, A. K. T. (2002). *Quality of fresh foods*. Dr. ing.- avhandling, , Institutt for energi- og prosesssteknikk, NTNU.

- Hildrum, K. I. (2010). *På hvilke måter er kjøtt fra ulike dyreslag forskjellig?* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://www.nofima.no/artikkel/paa-hvilke-maater-er-kjott-fra-ulike-dyreslag-forskjellig> [Nedlastet 16.05. 2014].
- Honikel, K. O. (1989). The meat aspects of water and food quality. *I: HARDMAN, T. M. (ed.) Water and food quality*. London: Elsevier Applied Science.
- Hultmann, L. (2003). *Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins and texture*. Dr. ing - avhandling Doktoravhandling, Institutt for bioteknologi, NTNU.
- 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. (2003). Texture, proteins and proteolytic enzymes in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) *Artikkel i L. Hultmanns doktoravhandling "Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins and texture"*
- Hultmann, L., Rørå, A. M. B., 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.
- Håseth, T. T., Thorkelsson, G. & Sidhu, M. S. (2007). North European Products. *I: TOLDRÀ, F. (ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Kaale, L. D., Eikevik, T. M., Rustad, T. & Kolsaker, K. (2011). Superchilling of food: A review. *Journal of Food Engineering*, 107(2), 141-146.
- Kaale, L. D., Eikevik, T. M., Rustad, T. & Nordtvedt, T. S. (2014). Changes in water holding capacity and drip loss of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle during superchilled storage. *Lwt-Food Science and Technology*, 55(2), 528-535.
- Kjøttindustriens fellesforening (1996). *Kjøttfagene. Fra bås til bord*, Oslo, Kjøttindustriens fellesforening : Yrkesopplæring.
- 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.
- Laguerre, M., Lecomte, J. & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244-282.

- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979). High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Subpicomole Amounts of Amino-Acids by Precolumn Fluorescence Derivatization with Ortho-Phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry*, 51(11), 1667-1674.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Mackie, I. M. (1993a). The Effects of Freezing on Flesh Proteins. *Food Reviews International*, 9(4), 575-610.
- Mackie, I. M. (1993b). The Effects of Freezing on Flesh Proteins. *Food Reviews International* 9 (4), 575-610. OPPRINNELIG FRA REIDEL, L., KALTETECHNIK, 8, 374 (1956)
- Magnussen, O. M., Haugland, A., Hemmingsen, A. K. T., Johansen, S. & Nordtvedt, T. S. (2008). Advances in superchilling of food - Process characteristics and product quality. *Trends in Food Science & Technology*, 19(8), 418-424.
- Matprat.no. (2014a). *Lammekjøtt: Tall og fakta* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://www.matprat.no/MatNyttig/Ravarer-fra-AA/Alt-om-lammekjott/Lammekjott-Tall-og-fakta/> [Nedlastet 09.05. 2014].
- Matprat.no. (2014b). *Salting og speking* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://www.matprat.no/matnyttig/metoder/salting-og-speking/salting-og-speking> [Nedlastet 20.02.2014].
- Mushi, D. E., Eik, L. O., Thomassen, M. S., Sorheim, O. & Adnoy, T. (2008). Suitability of Norwegian short-tail lambs, Norwegian dairy goats and Cashmere goats for meat production - Carcass, meat, chemical and sensory characteristics. *Meat Science*, 80(3), 842-850.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. & Lehninger, A. L. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*, New York, Freeman.
- Nilsson, K. (1994). *Quality of frozen rainbow trout : effects of different freezing and thawing treatments*, Göteborg, Department of Food Science, Chalmers University of Technology.
- 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 & 838.

- Næringsmiddelhygieneforskriften. (2008). *Forskrift om næringsmiddelhygiene (næringsmiddelhygieneforskriften): Trådt i kraft 22. desember 2008 nr 1623*. [Internettside]. Tilgjengelig fra: [http://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623#KAPITTEL\\_5](http://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623#KAPITTEL_5) [Nedlastet 28.05. 2014.].
- Osnes, K. K. & Mohr, V. (1985). Peptide hydrolases of Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comparative biochemistry and physiology*, 82B(4), 599-606.
- Samtale med Professor Turid Rustad. (2013).
- Raade, G. (2009). *Salt - utvinning* [Internettside]. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/salt/utvinning> [Nedlastet 09.05. 2014].
- Rustad, T. (1998, revidert 2005). Muskelvevet i kjøtt og fisk. *Trondheim Institutt for Bioteknologi*, .
- Sasaki, T., Kikuchi, T., Yumoto, N., Yoshimura, N. & Murachi, T. (1984). Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J Biol Chem*, 259(20), 12489-94.
- Stahl, D. A., Clark, D. P., Brock, T. D., Martinko, J. M. & Madigan, M. T. (2012). *Brock biology of microorganisms*, Boston, Mass., Pearson.
- Statistisk sentralbyrå. (2014). *Kjøttproduksjon, 2013* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/slakt> [Nedlastet 09.05. 2014].
- Store norske leksikon. (2011). *Halitt* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/halitt> [Nedlastet 09.05. 2014].
- Thompson, V. F. & Goll, D. E. (2000). Purification of  $\mu$ -calpain, m-calpain, and calpastatin from animal tissue. I: ELCE, J. S. (ed.) *Methods in molecular biology, vol. 144: Calpain methods and protocols*. Totowa, New Jersey: Human press.
- Toldra, F. (2006). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 17(4), 164-168.
- Toldrá, F. (2002). *Dry-cured meat products*, Trumbull, Conn., Food & Nutrition Press.
- Toldrá, F. & Etherington, D. J. (1988). Examination of cathepsins B, D, H and L activities in dry-cured hams. *Meat Science*, 23(1), 1-7.
- Tosoh Bioscience LLC. (Ingen dato). *Principles of Reversed Phase Chromatography* [Internettside]. Tilgjengelig fra: <http://www.separations.us.tosohbioscience.com/ServiceSupport/TechSupport/ResourceCenter/PrinciplesofChromatography/ReversedPhase/> [Nedlastet 04.06. 2014].

- Wang, T., Sveinsdottir, K., Magnusson, H. & Martinsdottir, E. (2008). Combined application of modified atmosphere packaging and superchilled storage to extend the shelf life of fresh cod (*Gadus morhua*) loins. *Journal of Food Science*, 73(1), S11-S19.
- Warriss, P. D. (2010). *Meat science: an introductory text*, Wallingford, UK, CABI Pub.
- Zaritzky, N. (2012). Physical–Chemical Principles in Freezing. I: SUN, D.-W. (ed.) *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Zhao, G. M., Zhou, G. H., Wang, Y. L., Xu, X. L., Huan, Y. J. & Wu, J. Q. (2005). Time-related changes in cathepsin B and L activities during processing of Jinhua ham as a function of pH, salt and temperature. *Meat Science*, 70(2), 381-388.
- Zhou, G. H., Xu, X. L. & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat - A review. *Meat Science*, 86(1), 119-128.

## Vedlegg A: Cellevevsvæske

Dette vedlegget gir grunnlaget for avsnitt 3.1 i hovedteksten.

I tabell A.1 er rådata og beregnede verdier tilknyttet mengde vevsvæske (CTF, væsken som tapes når kjøttet utsettes for ytre kraft i form av sentrifugering) i ferske og superkjølte prøver av lammekjøtt presentert. Verdiene ble funnet i prosjektet ”Superkjøling av lam” (Friestad, 2013). Tilsvarende verdier funnet våren 2014 i forbindelse med masteroppgaven er presentert i tabell A.2.

I tabellene er standardavviket funnet ved formelen:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2},$$

der  $\sigma$  er standardavviket,  $N$  er antall målinger av en prøve,  $x_i$  er verdien for g CTF per g våtvekt prøve for en parallell og  $\bar{x}$  er gjennomsnittet av alle målinger for en prøve.

Ved uttak 9 fra tabell A.1 ble det mottatt to kjøttstykker fra samme midtstykke. Det ble her regnet ut gjennomsnittet av standardavvikene for parallell A og B for hvert kjøttstykke.

SEM (”standard error of the mean”, middelfeil) i tabell A.2 er funnet ved formelen:

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{N}},$$

der  $\sigma$  er standardavviket og  $N$  er antall målinger av en prøve.

**Tabell A.1:** Rådata og beregnede verdier for midtstykker av lammekjøtt fra høsten 2013.

"1F" i prøvekode indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" indikerer at prøven er fra superkjølt kjøtt. "C" først i prøvekode indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller av samme kjøttstykke. Utrekninger av standardavvik er forklart i teksten.

Uttak	Prøve	g vevsvæske	g våtvekt	g vevsvæske/ g våtvekt	Gjennom- snitt	Standard- avvik
1. uttak fersk	C1F1A	1,3295	20,2947	0,065509714	0,09	0,02
	C1F1B	2,1937	20,3072	0,108025725		
1. uttak superkjølt	C1M1A	1,2904	15,1555	0,085144007	0,07	0,012
	C1M1B	0,9237	15,1639	0,060914409		
2. uttak fersk	C1F2A	1,5307	19,9844	0,076594744	0,07	0,003
	C1F2B	1,4105	19,9853	0,070576874		
2. uttak superkjølt	C1M2A	0,5458	14,9178	0,036587164	0,05	0,015
	C1M2B	0,9911	14,9002	0,066515886		
3. uttak fersk	C1F3A	1,6835	21,1929	0,079436981	0,07	0,006
	C1F3B	1,4759	22,2005	0,066480485		
3. uttak superkjølt	C1M3A	2,1369	25,4002	0,084129259	0,07	0,012
	C1M3B	1,5144	25,4	0,059622047		
4. uttak fersk	C1F4A	1,32	20,7064	0,063748406	0,05	0,012
	C1F4B	0,8106	20,7244	0,039113316		
4. uttak superkjølt	C1M4A	2,5362	20,5235	0,123575414	0,11	0,014
	C1M4B	1,98	20,574	0,09623797		
5. uttak fersk	C1F5A	1,5484	18,3451	0,08440401	0,08	0,0005
	C1F5B	1,537	18,4316	0,083389396		
5. uttak superkjølt	C1M5A	2,8962	20,0446	0,144487792	0,14	0,009
	C1M5B	2,5481	20,0866	0,126855715		
6. uttak fersk	C1F6A	1,4607	20,2801	0,072026272	0,07	0,0019
	C1F6B	1,4043	20,5603	0,068301533		
6. uttak superkjølt	C1M6A	3,447	20,0683	0,171763428	0,17	0,002
	C1M6B	3,3781	20,1854	0,167353632		
7. uttak fersk	C1F7A	1,154	15,4631	0,07462928	0,06	0,012
	C1F7B	0,7844	15,6812	0,05002168		
7. uttak superkjølt	C1M7A	3,6854	21,3752	0,17241476	0,17	0,0010
	C1M7B	3,6154	21,2151	0,17041635		
8. uttak fersk	C1F8A	1,1168	20,5795	0,0542676	0,06	0,004
	C1F8B	1,3021	20,8818	0,06235574		
8. uttak superkjølt	C1M8A	3,5487	19,0648	0,18613885	0,19	0,0009
	C1M8B	3,5873	19,0948	0,1878679		



*Fortsettelse tabell A.1: Rådata og beregnede verdier for midtstykker av lammekjøtt fra høsten 2013. "1F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" indikerer at prøven er fra superkjølt kjøtt. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller av samme kjøttstykke. Utregninger av standardavvik er forklart i teksten.*

<b>Uttak</b>	<b>Prøve</b>	<b>g vevsvæske</b>	<b>g våtvekt</b>	<b>g vevsvæske/ g våtvekt</b>	<b>Gjennom- snitt</b>	<b>Standard- avvik</b>
9. uttak superkjølt 1	C1M9A	2,5903	20,2563	0,12787627	0,14	0,011
	C1M9B	3,1204	20,4435	0,15263531		
9. uttak superkjølt 2	C2M9A	2,2409	15,633	0,14334421		
	C2M9B	2,3048	16,0178	0,14388992		
10. uttak superkjølt	C1M10A	1,7837	19,426	0,09182024	0,11	0,018
	C1M10B	2,4878	19,3402	0,12863362		
11. uttak superkjølt	C1M11A	2,7484	15,0833	0,18221477	0,19	0,006
	C1M11B	2,9194	15,016	0,19441929		

**Tabell A.2:** Rådata og beregnede verdier for lammekjøtt fra våren 2014. "F" indikerer at prøven er fra ferskt lammekjøtt og "S" indikerer at prøven er fra superkjølt lammekjøtt. Prøvekoden "T1" indikerer at prøven var fryst og tint ved 4 °C, "VT1" indikerer at prøven var fryst og tint i rennende vann. "C" først i prøvekode indikerer at prøven er CTF, ikke homogenat. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A", "B", "C" og "D" indikerer paralleller av samme kjøttstykke. Utrekninger er forklart i teksten.

	Prøve	g vevsvæske	g våtvekt	g vevsvæske/ g våtvekt	Gjennom- snitt	Standard- avvik	SEM
1. uttak fersk	CF1A	0,9771	20,2945	0,05	0,05	0,005	0,002
	CF1B	1,1954	20,2033	0,06			
	CF1C	1,0858	20,3223	0,05			
	CF1C	1,0165	20,2515	0,05			
1. uttak superkjølt	CS1A	2,4166	20,3917	0,12	0,11	0,013	0,006
	CS1B	1,9822	20,1252	0,10			
	CS1C	2,4709	20,4723	0,12			
	CS1D	1,9377	20,1091	0,10			
2. uttak fersk	CF2A	1,4858	20,3589	0,07	0,07	0,002	0,0012
	CF2B	1,436	20,2832	0,07			
	CF2C	1,5638	20,3623	0,08			
	CF2D	1,499	20,2487	0,07			
2. uttak superkjølt	CS2A	2,3915	20,1427	0,12	0,12	0,005	0,002
	CS2B	2,5111	20,0428	0,13			
	CS2A	2,4299	20,0061	0,12			
	CS2B	2,2883	20,0071	0,11			
3. uttak fersk	CF3A	1,545	20,3413	0,08	0,08	0,02	0,008
	CF3B	1,849	20,0254	0,09			
	CF3C	1,889	20,0818	0,09			
	CF3D	1,209	20,2231	0,06			
3. uttak superkjølt	CS3A	3,240	20,1712	0,16	0,14	0,02	0,009
	CS3B	2,654	20,3271	0,13			
	CS3C	2,5134	20,1888	0,12			
	CS3D	3,2013	20,0525	0,16			
Fryst, tint ved 4 °C	CT1A	4,416	20,2467	0,22	0,25	0,02	0,010
	CT1B	5,192	20,1465	0,26			
	CT1C	5,2543	20,2109	0,26			
	CT1D	4,913	20,093	0,24			
Fryst, tint i rennende vann	CVT1A	2,3598	19,9931	0,12	0,12	0,01	0,004
	CVT1B	2,5745	20,0979	0,13			
	CVT1C	2,4478	20,2796	0,12			
	CVT1D	2,1781	20,2828	0,11			

## Vedlegg B: Mengde vannløselig protein med Biorad-metoden

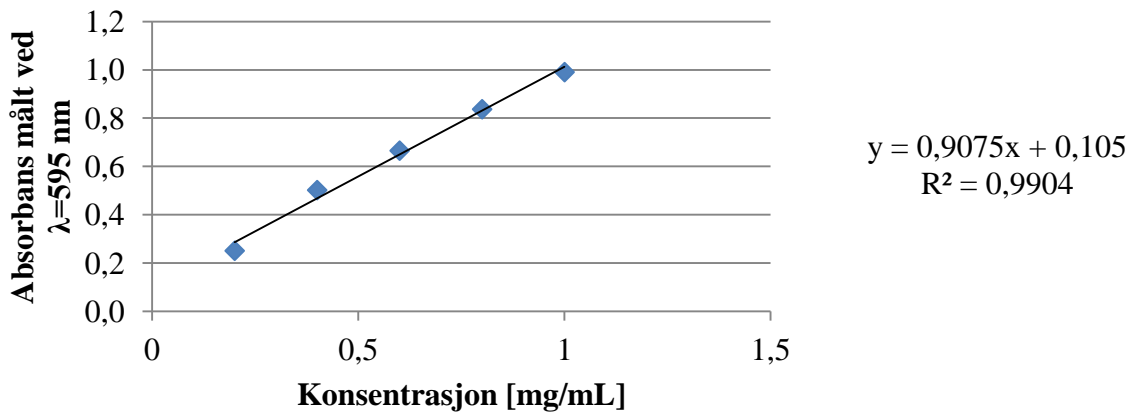
I dette vedlegget er resultater fra analyser med Biorad-metoden (Bradford, 1976) presentert. Vedlegget gir grunnlaget for avsnitt 3.2 i hovedteksten. I tabell B.1 er rådata for absorbanismålinger for bovint serum albumin (BSA) med kjent konsentrasjon presentert. Målingene ble gjort i forbindelse med uttak av lammekjøtt høsten 2013. Uttakene ble gjort tiden etter slakt og superkjøling som gitt i tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten. Tilhørende standardkurve for det første uttaket kan sees i figur B.1. Alle verdier for lammekjøtt fra høsten 2013 i dette vedlegget ble funnet i prosjektoppgaven ”Superkjøling av lam” (Friestad, 2013), men ble der rapportert kun i form av figurer.

**Tabell B.1:** Absorbansmålinger ved bølgelengde 595 nm for løsninger av BSA med kjente konsentrasjoner gjort i forbindelse med analyser av lammekjøttekstrakter fra høsten 2013. Tilhørende ligning for resulterende standardkurve, samt  $R^2$ -verdi, er også presentert. Ligning og  $R^2$ -verdi er funnet ved lineær regresjon i Microsoft Excel.  $y$  er konsentrasjon,  $x$  er absorbens. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene.

Uttak	Standard-konsentrasjon [mg/mL]	Absorbans målt ved 595 nm			Gjennomsnitt	Standardligning og $R^2$ -verdi
		1	2	3		
1	0,2	0,223	0,233	0,297	0,251	$y = 0,908 \cdot x + 0,105$ $R^2 = 0,9904$
	0,4	0,516	0,500	0,491	0,502	
	0,6	0,690	0,688	0,619	0,666	
	0,8	0,862	0,831	0,819	0,837	
	1,0	0,977	1,006	0,990	0,991	
2	0,2	0,293	0,273	0,279	0,282	$y = 0,9778 \cdot x + 0,0964$ $R^2 = 0,9991$
	0,4	0,490	0,481	0,507	0,493	
	0,6	0,713	0,679	0,691	0,694	
	0,8	0,845	0,898	0,904	0,882	
	1,0	1,040	1,069	1,085	1,065	
3	0,2	0,301	0,294	0,324	0,306	$y = 0,8185 \cdot x + 0,1519$ $R^2 = 0,9944$
	0,4	0,460	0,841	0,514	0,487	
	0,6	0,691	0,649	0,653	0,664	
	0,8	0,788	0,768	0,971	0,778	
	1,0	1,068	0,921	0,949	0,979	
4	0,2	0,297	0,280	0,288	0,288	$y = 0,9202 \cdot x + 0,1346$ $R^2 = 0,9912$
	0,4	0,523	0,522	0,521	0,522	
	0,6	0,721	0,715	0,691	0,709	
	0,8	0,917	0,889	0,861	0,889	
	1,0	1,061	1,049	0,965	1,025	

*Fortsettelse tabell B.1: Absorbansmålinger ved bølgelengde 595 nm for løsninger av BSA med kjente konsentrasjoner gjort i forbindelse med analyser av lammekjøttekstrakter fra høsten 2013. Tilhørende ligning for resulterende standardkurve, samt  $R^2$ -verdi, er også presentert. Ligning og  $R^2$ -verdi er funnet ved lineær regresjon i Microsoft Excel.  $y$  er konsentrasjon,  $x$  er absorbans. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene.*

Uttak	Standard-konsentrasjon [mg/mL]	Absorbans målt ved 595 nm			Gjennomsnitt	Standardligning og $R^2$ -verdi
		1	2	3		
5	0,2	0,312	0,313	0,301	0,309	$y = 0,9337 \cdot x + 0,1492$ $R^2 = 0,9946$
	0,4	0,541	0,556	0,544	0,547	
	0,6	0,735	0,725	0,726	0,729	
	0,8	0,924	0,879	0,878	0,894	
	1,0	1,070	1,062	1,075	1,069	
6	0,2	0,253	0,250	0,240	0,248	$y = 0,864 \cdot x + 0,0809$ $R^2 = 0,9921$
	0,4	0,396	0,392	0,439	0,409	
	0,6	0,640	0,615	0,62	0,625	
	0,8	0,779	0,805	0,807	0,797	
	1,0	0,915	0,918	0,920	0,918	
7	0,2	0,246	0,234	0,251	0,244	$y = 0,9722 \cdot x + 0,0543$ $R^2 = 0,9987$
	0,4	0,449	0,455	0,467	0,457	
	0,6	0,645	0,638	0,618	0,634	
	0,8	0,833	0,821	0,802	0,819	
	1,0	1,044	1,025	1,036	1,035	
8	0,2	0,235	0,225	0,246	0,235	$y = 0,9562 \cdot x + 0,0591$ $R^2 = 0,9979$
	0,4	0,453	0,445	0,450	0,449	
	0,6	0,648	0,640	0,655	0,648	
	0,8	0,836	0,830	0,827	0,831	
	1	0,988	1,000	1,014	1,001	
9	0,2	0,295	0,286	0,299	0,293	$y = 0,9925 \cdot x + 0,1033$ $R^2 = 0,9983$
	0,4	0,504	0,496	0,495	0,498	
	0,6	0,713	0,730	0,722	0,722	
	0,8	0,883	0,893	0,898	0,891	
	1,0	1,088	1,065	1,115	1,089	
10	0,2	0,291	0,289	0,288	0,289	$y = 1,0058 \cdot x + 0,0994$ $R^2 = 0,998$
	0,4	0,520	0,531	0,519	0,523	
	0,6	0,710	0,692	0,667	0,690	
	0,8	0,904	0,910	0,919	0,911	
	1,0	1,111	1,090	1,103	1,101	
11	0,2	0,267	0,275	0,282	0,275	$y = 0,9248 \cdot x + 0,1097$ $R^2 = 0,9924$
	0,4	0,493	0,490	0,477	0,487	
	0,6	0,687	0,671	0,678	0,679	
	0,8	0,888	0,879	0,874	0,880	
	1,0	1,01	0,999	0,999	1,003	



**Figur B.1:** Standardkurve for konsentrasjon mot absorbans med tilhørende ligning og  $R^2$ -verdi. Verdier er gitt i tabell B.1, og ble funnet i forbindelse med det første uttaket av lammekjøtt høsten 2013.

Tilsvarende målinger ble gjort ved uttak av svinekjøtt og lammekjøtt våren 2014, og verdiene er presentert i henholdsvis tabell B.2 og B.3.

**Tabell B.2:** Absorbansmålinger ved bølglengde 595 nm for løsninger av BSA med kjente konsentrasjoner gjort i forbindelse med analyser av svinekjøttekstrakter fra våren 2014. Tilhørende ligning for resulterende standardkurve, samt  $R^2$ -verdi, er også presentert. Ligning og  $R^2$ -verdi er funnet ved lineær regresjon i Microsoft Excel.  $y$  er konsentrasjon,  $x$  er absorbans.

Uttak	Standard-konsentrasjon [mg/mL]	Absorbans målt ved 595 nm			Gjennomsnitt	Standardligning og $R^2$ -verdi
		1	2	3		
Fersk svinefilet	0,2	0,333	0,353	0,323	0,336	$y = 0,9658 \cdot x + 0,1538$ $R^2 = 0,9991$
	0,4	0,541	0,561	0,556	0,553	
	0,6	0,742	0,761	0,696	0,733	
	0,8	0,924	0,935	0,936	0,932	
	1,0	1,129	1,091	1,118	1,113	
Svinefilet lagret 1 uke etter kjøp og fryst/tint svinefilet	0,2	0,301	0,29	0,283	0,291	$y = 1,0022 \cdot x + 0,0926$ $R^2 = 0,9989$
	0,4	0,488	0,488	0,499	0,492	
	0,6	0,721	0,720	0,681	0,707	
	0,8	0,900	0,877	0,861	0,879	
	1,0	1,090	1,102	1,107	1,100	

**Tabell B.3:** Absorbansmålinger ved bølgelengde 595 nm for løsninger av BSA med kjente konsentrasjoner gjort i forbindelse med analyser av lammekjøtt ekstrakter fra våren 2014. Tilhørende ligning for resulterende standardkurve, samt  $R^2$ -verdi, er også presentert. Ligning og  $R^2$ -verdi er funnet ved lineær regresjon i Microsoft Excel.  $y$  er konsentrasjon,  $x$  er absorbans.

Uttak	Standard-konsentrasjon [mg/mL]	Absorbans målt ved 595 nm			Gjennomsnitt	Standardligning og $R^2$ -verdi
		1	2	3		
1	0,2	0,278	0,256	0,261	0,265	$y = 0,99 \cdot x + 0,0893$ $R^2 = 0,9966$
	0,4	0,523	0,503	0,502	0,509	
	0,6	0,704	0,700	0,660	0,688	
	0,8	0,892	0,879	0,895	0,889	
	1,0	1,085	1,051	1,060	1,065	
2	0,2	0,255	0,281	0,265	0,267	$y = 0,9678 \cdot x + 0,093$ $R^2 = 0,9965$
	0,4	0,495	0,479	0,495	0,490	
	0,6	0,700	0,689	0,703	0,697	
	0,8	0,883	0,864	0,863	0,870	
	1	1,055	1,030	1,049	1,045	
3	0,2	0,281	0,284	0,281	0,282	$y = 0,9842 \cdot x + 0,0962$ $R^2 = 0,999$
	0,4	0,461	0,495	0,533	0,496	
	0,6	0,702	0,699	0,695	0,699	
	0,8	0,908	0,870	0,874	0,884	
	1,0	1,060	1,078	1,079	1,072	
Fryst/ tint lammekj øtt	0,2	0,274	0,281	0,276	0,277	$y = 1,1108 \cdot x + 0,0396$ $R^2 = 0,9805$
	0,4	0,497	0,493	0,497	0,496	
	0,6	0,692	0,700	0,696	0,696	
	0,8	0,878	0,827	0,851	0,852	
	1,0	1,187	1,227	1,215	1,210	

Rådata og utregnede verdier for prøver fra lammekjøtt høsten 2013 er presentert i tabell B.4 og B.5. Rådata og utregnede verdier for prøver fra svinekjøtt våren 2014 og fra lammekjøtt våren 2014 er presentert i henholdsvis tabell B.6 og tabell B.7. Konsentrasjonene er funnet ved hjelp av standardligningene i tabell B.1, B.2 og B.3. I tabell B.4 er for eksempel konsentrasjonen av parallell 1 av prøve "1F1", første uttak av ferskt midtstykke, funnet ved hjelp av standardligningen for uttak 1 i tabell B.1 som:

$$y = 0,908 \cdot x + 0,105, \text{ som vil si:}$$

$$\text{Målt absorbans} = 0,908 \cdot \text{konsentrasjon} + 0,105 \quad (\text{B.1})$$

Ligning (B.1) kan omgjøres til:

$$\text{Konsentrasjon} = \frac{\text{Målt absorbans} - 0,105}{0,908} \quad (\text{B.2})$$

Fra ligning (B.2) får en at:

$$\text{Konsentrasjon i prøve 1F1, parallell 1} = \frac{0,273 - 0,105}{0,9075} = 0,185 \quad (\text{B.3})$$

Resten av konsentrasjonene i tabellene er funnet på tilsvarende måte som i ligning B.2, men ut fra standardligningen til tilhørende uttak. For å finne mengde protein som g protein per g våtvekt av opprinnelig prøve, er gjennomsnittet av konsentrasjonene i parallellene ganget med faktoren for hvor mye prøven er fortynnet, samt med volum i mL av opprinnelig prøve. Det er deretter delt på våtvekten av opprinnelig prøve. For å finne mengde protein i løsning som % av våtvekt, er verdien for g protein per g våtvekt ganget med 100.

x

**Tabell B.4:** Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for midtstykker av lammekjøtt fra høsten 2013. Verdiene er funnet høsten 2013.

"1F" i prøvekode indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" og "2M" indikerer paralleller av samme superkjølte stykke. "C" indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller.

Standardligninger for utregninger er hentet fra tabell B.1. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	Fortynningsfaktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]			Gjennomsnitt * fortynningsfaktor	Protein i løøsning [g/g våtvekt]	Protein i løøsning [% av våtvekt]
					1	2	3	1	2	3			
1F1	5,52	10,0609	25	40	0,273	0,269	0,28	0,185	0,181	0,193	7,451	0,019	1,851
C1F1A		20,2947	1,3295	200	0,53	0,492	0,537	0,468	0,426	0,476	91,394	0,006	0,6
C1F1B		20,3072	2,1937	200	0,543	0,59	0,561	0,483	0,534	0,503	101,311	0,011	1,1
1M1	5,52	10,112	25	40	0,291	0,285	0,290	0,205	0,198	0,204	8,097	0,020	2,002
C1M1A		15,1555	1,2904	200	0,535	0,563	0,575	0,474	0,505	0,518	99,769	0,008	0,8
C1M1B		15,1639	0,9237	200	0,507	0,506	0,524	0,443	0,442	0,462	89,778	0,005	0,5
1F2	5,67	10,0308	25	32	0,421	0,441	0,421	0,332	0,352	0,332	10,840	0,027	2,70
C1F2A		19,9844	1,5307	200	0,514	0,464	0,48	0,427	0,376	0,392	79,680	0,006	0,6
C1F2B		19,9853	1,4105	200	0,563	0,54	0,533	0,477	0,454	0,446	91,815	0,006	0,6
1M2	5,56	10,5498	25	32	0,391	0,416	0,370	0,301	0,327	0,280	9,683	0,023	2,29
C1M2A		14,9178	0,5458	200	0,515	0,54	0,525	0,428	0,454	0,438	87,997	0,003	0,32
C1M2B		14,9002	0,9911	200	0,615	0,595	0,561	0,530	0,510	0,475	101,019	0,007	0,67
1F3	5,64	10,0045	25	32	0,33	0,361	0,346	0,218	0,255	0,237	7,575	0,019	1,9
C1F3A		21,1929	1,6835	200	0,517	0,465	0,501	0,446	0,383	0,427	83,673	0,007	0,7
C1F3B		22,2005	1,4759	200	0,517	0,489	0,494	0,446	0,412	0,418	85,058	0,006	0,6
1M3	5,74	10,0094	25	32	0,402	0,438	0,399	0,306	0,350	0,302	10,208	0,025	2,5
C1M3A		25,4002	2,1369	200	0,545	0,536	0,525	0,480	0,469	0,456	93,692	0,008	0,8
C1M3B		25,4	1,5144	200	0,548	0,572	0,569	0,484	0,513	0,510	100,452	0,006	0,6



*Fortsettelse tabell B.4: Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for midstispykker av lammekjøtt fra høsten 2013. Verdiene er funnet høsten 2013. "IF" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" og "2M" indikerer paralleller av samme superkjølte stykke. "C" indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Standardligninger for utregninger er hentet fra tabell B.1. Utregninger er forklart i teksten.*

Prøve	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	For- tynnings- faktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]			Gjennomsnitt * fortynnings- faktor	Protein i løsning [g/g våtvakt]	Protein i løsning [% av våtvakt]
					1	2	3	1	2	3			
IF4	5,65	10,0238	25	32	0,327	0,31	0,313	0,209	0,191	0,194	6,333	0,016	1,6
CIF4A		20,7064	1,32	200	0,414	0,422	0,38	0,304	0,312	0,267	58,852	0,004	0,4
CIF4B		20,7244	0,8106	200	0,459	0,466	0,465	0,353	0,360	0,359	71,458	0,003	0,3
IM4		10,3304	25	32	0,379	0,383	0,386	0,266	0,270	0,273	8,628	0,021	2,1
CIM4A	5,56	20,5235	2,5362	200	0,496	0,503	0,445	0,393	0,400	0,337	75,370	0,009	0,9
CIM4B		20,574	1,98	200	0,431	0,428	0,421	0,322	0,319	0,311	63,488	0,006	0,6
IF5	5,52	10,2037	25	32	0,338	0,356	0,32	0,202	0,221	0,183	6,471	0,016	1,6
CIF5A		18,3451	1,5484	200	0,546	0,49	0,534	0,425	0,365	0,412	80,143	0,007	0,7
CIF5B		18,4316	1,537	200	0,498	0,511	0,501	0,374	0,388	0,377	75,859	0,006	0,6
IM5		10,1986	25	32	0,438	0,336	0,374	0,309	0,200	0,241	8,002	0,020	2,0
CIM5A	5,66	20,0446	2,8962	200	0,49	0,527	0,472	0,365	0,405	0,346	74,359	0,011	1,1
CIM5B		20,0866	2,5481	200	0,563	0,569	0,531	0,443	0,450	0,409	86,783	0,011	1,1
IF6	5,61	10,3776	25	32	0,327	0,292	0,317	0,285	0,244	0,273	8,560	0,021	2,1
CIF6A		20,2801	1,4607	200	0,432	0,451	0,414	0,406	0,428	0,386	81,358	0,006	0,6
CIF6B		20,5603	1,4043	200	0,376	0,376	0,409	0,342	0,342	0,380	70,864	0,005	0,5
IM6		10,2886	25	32	0,355	0,361	0,355	0,317	0,324	0,317	10,227	0,025	2,5
CIM6A	5,63	20,0683	3,447	200	0,466	0,439	0,466	0,446	0,415	0,446	87,068	0,015	1,5
CIM6B		20,1854	3,3781	200	0,485	0,498	0,486	0,468	0,483	0,469	94,630	0,016	1,6

**Fortsettelse tabell B.4:** Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for midtstykker av lammekjøtt fra høsten 2013. Verdiene er funnet høsten 2013. "1F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" og "2M" indikerer paralleller av samme superkjølte stykke. "C" indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Standardligninger for utregninger er hentet fra tabell B.1. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	Fortynningsfaktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]			Gjennomsnitt * fortynningsfaktor	Protein i løsning [g/g våtvekt]	Protein i løsning [% av våtvekt]
					1	2	3	1	2	3			
1F7	5,66	10,2435	25	25	0,322	0,297	0,32	0,233	0,204	0,231	5,571	0,014	1,4
C1F7A		15,4631	1,154	200	0,392	0,44	0,408	0,314	0,370	0,333	67,772	0,005	0,5
C1F7B		15,6812	0,7844	200	0,411	0,41	0,413	0,336	0,335	0,338	67,309	0,003	0,3
1M7	5,61	10,2119	25	25	0,364	0,411	0,365	0,282	0,336	0,283	7,508	0,018	1,8
C1M7A		21,3752	3,6854	200	0,443	0,424	0,427	0,373	0,351	0,355	71,935	0,012	1,2
C1M7B		21,2151	3,6154	200	0,398	0,368	0,414	0,321	0,286	0,340	63,146	0,011	1,1
1F8	5,7	10,2098	25	20	0,427	0,456	0,451	0,355	0,388	0,382	7,502	0,018	1,8
C1F8A		20,5795	1,1168	300	0,255	0,279	0,284	0,156	0,184	0,189	52,853	0,003	0,3
C1F8B		20,8818	1,3021	300	0,27	0,254	0,221	0,173	0,155	0,116	44,410	0,003	0,3
1M8	5,55	10,1991	25	20	0,379	0,356	0,364	0,299	0,273	0,282	5,690	0,014	1,4
C1M8A		19,0648	3,5487	300	0,266	0,25	0,253	0,168	0,150	0,153	47,186	0,009	0,9
C1M8B		19,0948	3,5873	300	0,297	0,242	0,261	0,204	0,141	0,163	50,771	0,010	1,0
1M9	5,57	10,0209	25	20	0,489	0,507	0,514	0,426	0,447	0,455	8,859	0,022	2,2
C1M9A		20,2563	2,5903	150	0,59	0,56	0,573	0,543	0,508	0,524	78,759	0,010	1,0
C1M9B		20,4435	3,1204	150	0,581	0,611	0,589	0,533	0,567	0,542	82,113	0,013	1,3
2M9	5,6	10,2038	25	20	0,509	0,554	0,539	0,449	0,502	0,484	9,568	0,023	2,3
C2M9A		20,0168	2,5618	150	0,649	0,634	0,662	0,611	0,594	0,626	91,596	0,012	1,2
C2M9B		20,1274	2,9261	150	0,684	0,704	0,632	0,652	0,675	0,592	95,933	0,014	1,4

**Fortsettelse tabell B.4:** Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for midtstykker av lammekjøtt fra høsten 2013. Verdiene er funnet høsten 2013. "1F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" og "2M" indikerer paralleller av samme superkjølte stykke. "C" indikerer at prøven er CTF og ikke homogen. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Standardligninger for utregninger er hentet fra tabell B.1. Utregninger er forklart i teksten.

Prove	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	For- tynnings- faktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]			Gjennom- snitt * fortynnings- faktor	Protein i løsning [g/g våttvekt]	Protein i løsning [% av våttvekt]
					1	2	3	1	2	3			
1M10	5,66	10,0389	25	20	0,531	0,574	0,575	0,475	0,525	0,526	10,170	0,025	2,5
C1M10A	5,66	19,426	1,7837	150	0,574	0,613	0,619	0,525	0,570	0,577	83,558	0,008	0,8
C1M10B	5,66	19,3402	2,4878	150	0,599	0,606	0,554	0,554	0,502	0,498	83,443	0,011	1,1
1M11	5,6	10,063	25	20	0,555	0,554	0,551	0,503	0,502	0,498	10,015	0,025	2,5
C1M11A	5,6	15,0833	2,7484	150	0,6	0,616	0,608	0,555	0,573	0,564	84,599	0,015	1,5
C1M11B	5,6	15,016	2,9194	150	0,614	0,598	0,604	0,571	0,552	0,559	84,136	0,016	1,6

**Tabell B.5:** Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for ytterkanter av lammekjøtt fra høsten 2013. Verdiene er funnet høsten 2013. "2F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1Y" og "2Y" indikerer paralleller av samme superkjølte stykke. "C" indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "Y" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Standardligninger for utregninger er hentet fra tabell B.1. Utregninger er forklart i teksten. Verdiene er brukt til utregninger i Vedlegg C.

Prøve	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	Fortynningsfaktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]			Gjennomsnitt * fortynningsfaktor	Protein i løsning [g/g våtvekt]	Protein i løsning [% av våtvekt]
					1	2	3	1	2	3			
2F1	5,56	10,2281	25	40	0,293	0,298	0,321	0,207	0,213	0,238	8,773	0,021	2,144
C2F1A		15,1108	1,1352	200	0,556	0,506	0,516	0,497	0,442	0,453	92,790	0,007	0,697
C2F1B		15,1381	0,7057	200	0,573	0,607	0,589	0,516	0,553	0,533	106,821	0,005	0,498
1Y1	5,57	10,0746	25	40	0,298	0,283	0,273	0,213	0,196	0,185	7,921	0,020	1,966
C1Y1A		15,3605	1,6993	200	0,573	0,551	0,541	0,516	0,491	0,480	99,181	0,011	1,097
C1Y1B		15,3828	1,5767	200	0,592	0,642	0,611	0,537	0,592	0,558	112,404	0,012	1,152
2F2	5,62	10,0072	25	32	0,337	0,291	0,289	0,246	0,199	0,197	6,847	0,017	1,71
C2F2A		19,4545	0,4821	200	0,49	0,519	0,483	0,402	0,432	0,395	81,998	0,002	0,20
C2F2B		19,4572	0,5186	200	0,535	0,518	0,528	0,449	0,431	0,441	88,065	0,002	0,23
1Y2	5,55	10,2	25	32	0,356	0,364	0,308	0,265	0,274	0,216	8,058	0,020	1,98
C1Y2A		20,0406	2,1954	200	0,615	0,607	0,596	0,530	0,522	0,511	104,224	0,011	1,14
C1Y2B		20,0163	1,28	200	0,602	0,59	0,577	0,517	0,505	0,491	100,883	0,006	0,65
2F3	5,71	10,0773	25	32	0,318	0,325	0,331	0,203	0,211	0,219	6,754	0,017	1,68
C2F3A		20,1072	0,64	200	0,494	0,502	0,519	0,418	0,428	0,449	86,280	0,003	0,27
C2F3B		20,1164	0,9855	200	0,467	0,472	0,454	0,385	0,391	0,369	76,343	0,004	0,37
1Y3	5,66	10,1013	25	32	0,307	0,364	0,363	0,189	0,259	0,258	7,536	0,019	1,87
C1Y3A		18,9453	1,757	200	0,538	0,566	0,572	0,472	0,506	0,513	99,393	0,009	0,92
C1Y3B		18,9688	1,7074	200	0,523	0,552	0,55	0,453	0,489	0,486	95,239	0,009	0,86

Prøve	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	For- tynnings- faktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]			Gjennomsnitt * fortynnings- faktor	Protein i løsning [g/g våtekt]	Protein i løsning [% av våtekt]
					1	2	3	1	2	3			
2F4	5,78	10,0476	25	0,421	0,419	0,452	0,311	0,309	0,345	8,045	0,020	2,00	
C2F4A		15,3491	0,6336	0,463	0,466	0,465	0,357	0,360	0,359	71,748	0,003	0,30	
C2F4B		15,3381	0,6165	0,458	0,438	0,488	0,351	0,330	0,384	71,023	0,003	0,29	
1Y4		10,1654	25	0,378	0,361	0,362	0,265	0,246	0,247	8,083	0,020	1,99	
C1Y4A	5,61	15,0373	1,5972	0,475	0,482	0,498	0,370	0,378	0,395	76,167	0,008	0,81	
C1Y4B		15,4817	1,6675	0,518	0,469	0,453	0,417	0,363	0,346	75,081	0,008	0,81	
2F5		10,1736	25	0,312	0,329	0,333	0,174	0,193	0,197	6,014	0,015	1,48	
C2F5A	5,65	16,3584	1,0682	0,485	0,512	0,498	0,360	0,389	0,374	74,788	0,005	0,49	
C2F5B		16,4008	1,1315	0,563	0,545	0,506	0,443	0,424	0,382	83,285	0,006	0,57	
1Y5		10,0677	25	0,322	0,328	0,363	0,185	0,192	0,229	6,459	0,016	1,60	
C1Y5A	5,65	16,1047	2,0605	0,558	0,547	0,537	0,438	0,426	0,415	85,284	0,011	1,09	
C1Y5B		16,1117	1,8395	0,552	0,565	0,567	0,431	0,445	0,447	88,283	0,010	1,01	
2F6		10,3025	25	0,225	0,3	0,303	0,167	0,254	0,257	7,227	0,018	1,75	
C2F6A	5,63	20,12	1,3187	0,422	0,449	0,459	0,395	0,426	0,438	83,904	0,005	0,55	
C2F6B		20,3145	1,0922	0,426	0,43	0,447	0,399	0,404	0,424	81,821	0,004	0,44	
1Y6		10,5171	25	0,257	0,307	0,291	0,204	0,262	0,243	7,560	0,018	1,80	
C1Y6A	5,67	17,9839	2,5108	0,477	0,474	0,497	0,458	0,455	0,482	93,009	0,013	1,30	
C1Y6B		18,0121	2,6542	0,465	0,473	0,438	0,445	0,454	0,413	87,454	0,013	1,29	

*Fortsettelse tabell B.5: Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for ytterkanter av lammekjøtt fra høsten 2013. Verdiene er funnet høsten 2013. "2F" i prøvekode indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1Y" og "2Y" indikerer paralleller av samme superkjølte stykke. "C" indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "Y" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Standardligninger for utregninger er hentet fra tabell B.1. Utregninger er forklart i teksten. Verdiene er brukt til utregninger i Vedlegg C.*



**Fortsettelse tabell B.5:** Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for ytterkanter av lammekjøtt fra høsten 2013. Verdiene er funnet høsten 2013. "2F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1Y" og "2Y" indikerer paralleller av samme superkjølte stykke. "C" indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "Y" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Standardligninger for utregninger er hentet fra tabell B.1. Utregninger er forklart i teksten. Verdiene er brukt til utregninger i Vedlegg C.

Prøve	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	Fortynningsfaktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]			Gjennomsnitt * fortynningsfaktor	Protein i løsning [g/g våtvekt]	Protein i løsning [% av våtvekt]
					1	2	3	1	2	3			
2F7	5,77	10,3898	25	25	0,286	0,289	0,319	0,192	0,195	0,230	5,137	0,012	1,2
C2F7A		18,1003	0,9303	200	0,419	0,44	0,448	0,345	0,370	0,379	72,938	0,004	0,4
C2F7B		18,1023	1,1415	200	0,426	0,452	0,455	0,354	0,384	0,387	74,942	0,005	0,5
1Y7	5,64	10,4576	25	25	0,371	0,376	0,418	0,290	0,296	0,344	7,749	0,019	1,9
C1Y7A		17,0024	2,5294	200	0,432	0,453	0,448	0,360	0,385	0,379	74,942	0,011	1,1
C1Y7B		17,2734	2,1778	200	0,415	0,422	0,433	0,341	0,349	0,362	70,085	0,009	0,9
1Y8	5,65	10,1927	25	20	0,425	0,41	0,398	0,352	0,335	0,321	6,723	0,016	1,6
C1Y8A		18,1085	3,1172	300	0,294	0,299	0,29	0,201	0,207	0,196	60,370	0,010	1,0
C1Y8B		18,1663	3,1618	300	0,262	0,238	0,264	0,164	0,136	0,166	46,608	0,008	0,8
1Y9	5,65	10,1201	25	20	0,484	0,461	0,444	0,421	0,394	0,374	7,926	0,020	2,0
C1Y9A		15,633	2,2409	150	0,599	0,6	0,607	0,554	0,555	0,563	83,558	0,012	1,2
C1Y9B		16,0178	2,3048	150	0,618	0,623	0,681	0,576	0,581	0,648	90,266	0,013	1,3
1Y10	5,69	10,1443	25	20	0,494	0,551	0,563	0,432	0,498	0,512	9,614	0,024	2,4
C1Y10A		15,0082	1,8729	150	0,614	0,613	0,634	0,571	0,570	0,594	86,739	0,011	1,1
C1Y10B		14,8747	1,4915	150	0,604	0,568	0,641	0,559	0,518	0,602	83,963	0,008	0,8
1Y11	5,68	10,1353	25	20	0,624	0,609	0,605	0,582	0,565	0,561	11,388	0,028	2,8
C1Y11A		14,7788	2,536	150	0,632	0,615	0,612	0,592	0,572	0,569	86,623	0,015	1,5
C1Y11B		14,7107	2,5273	150	0,652	0,65	0,645	0,615	0,613	0,607	91,712	0,016	1,6

**Tabell B.6:** Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for svinekjøtt fra våren 2014. "FS" i prøvekoden indikerer at prøven er ferskt svinekjøtt, "IUS" indikerer at prøven er fra svinekjøtt lagret ved 4 °C i 1 uke etter kjøp og "Frs" indikerer at prøven er fra frysst svinekjøtt tmt over natten ved 4 °C. "D" indikerer at ekstraksjonsvæsken brukt ved tilagning av homogenat var destillert vann, mens "B" indikerer at ekstraksjonsvæsken var en buffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten. Urtregninger er forklart i teksten.

Prove	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	Fortynnings- faktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]	Gjennom- snitt * fortynnings- faktor	Protein ! løsnng [g/g våtekt]	Protein ! løsnng [% av våtekt]		
					1	2	3						
FSD	5,58	10,0904	25	32	0,57	0,573	0,577	0,512	0,516	0,520	16,515	0,041	4,1
FSB	5,6	10,0871	25	32	0,643	0,647	0,645	0,593	0,597	0,595	19,042	0,047	4,7
IUSD	5,6	10,0946	25	32	0,505	0,5	0,49	0,441	0,435	0,424	13,871	0,034	3,4
IUSB	5,6	10,05	25	32	0,521	0,535	0,521	0,458	0,474	0,458	14,835	0,037	3,7
FrsD	5,6	10,042	25	32	0,549	0,556	0,565	0,489	0,497	0,507	15,928	0,040	4,0
FrsB	5,6	10,0158	25	32	0,564	0,568	0,558	0,506	0,510	0,499	16,163	0,040	4,0

**Tabell B.7:** Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for midtstykker av lammekjøtt fra våren 2014. "F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt lammekjøtt, "S" indikerer at prøven er fra superkjølt lammekjøtt. Prøvekoden "T1" indikerer at prøven var fryst og tint ved 4 °C, "VT1" at den var fryst og tint i rennende vann. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A", "B" "C" og "D" indikerer paralleller. Utrengninger er forklart i teksten.

Prøve	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	Fortynningsfaktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]			Gjennomsnitt * fortynningsfaktor	Protein i ekstrakt [g/g våtvekt]	Protein i ekstrakt [% av våtvekt]
					1	2	3	1	2	3			
F1	5,82	10,0575	25	32	0,372	0,383	0,388	0,286	0,297	0,302	9,430	0,023	2,3
C1F1A		20,2945	0,9771	200	0,625	0,643	0,635	0,541	0,559	0,551	110,114	0,005	0,5
C1F1B		20,2033	1,1954	200	0,554	0,58	0,6	0,469	0,496	0,516	98,734	0,006	0,6
CF1C		20,3223	1,0858	200	0,661	0,622	0,64	0,578	0,538	0,556	111,461	0,006	0,6
CF1D		20,2515	1,0165	200	0,63	0,634	0,648	0,546	0,550	0,564	110,721	0,006	0,6
S1	5,52	10,171	25	32	0,447	0,447	0,462	0,361	0,361	0,376	11,725	0,029	2,9
CS1A		20,3917	2,4166	200	0,517	0,497	0,548	0,432	0,412	0,463	87,152	0,010	1,0
CS1B		20,1252	1,9822	200	0,583	0,624	0,576	0,499	0,540	0,492	102,034	0,010	1,0
CS1C		20,4723	2,4709	200	0,602	0,613	0,572	0,518	0,529	0,488	102,303	0,012	1,2
CS1D		20,1091	1,9377	200	0,535	0,573	0,587	0,450	0,489	0,503	96,108	0,009	0,9
F2	5,82	10,1094	25	32	0,397	0,429	0,431	0,314	0,347	0,349	10,778	0,027	2,7
CF2A		20,3589	1,4858	200	0,441	0,521	0,522	0,360	0,442	0,443	82,996	0,006	0,6
CF2B		20,2832	1,436	200	0,612	0,6	0,605	0,536	0,524	0,529	105,934	0,007	0,7
CF2C		20,3623	1,5638	200	0,529	0,534	0,548	0,450	0,456	0,470	91,744	0,007	0,7
CF2D		20,2487	1,499	200	0,595	0,611	0,519	0,519	0,535	0,440	99,597	0,007	0,7
S2	5,63	10,1441	25	32	0,336	0,318	0,329	0,251	0,232	0,244	7,758	0,019	1,9
CS2A		20,1427	2,3915	200	0,509	0,571	0,537	0,430	0,494	0,459	92,158	0,011	1,1
CS2B		20,0428	2,5111	200	0,547	0,54	0,549	0,469	0,462	0,471	93,467	0,012	1,2
CS2C		20,0061	2,4299	200	0,429	0,447	0,474	0,347	0,366	0,394	73,766	0,009	0,9
CS2D		20,0071	2,2883	200	0,412	0,441	0,405	0,330	0,360	0,322	67,429	0,008	0,8



*Fortsettelse tabell B.7: Rådata og beregnede verdier fra biorad-metoden for midtstykker av lammekjøtt fra våren 2014. "F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt lammekjøtt, "S" indikerer at prøven er fra superkjølt lammekjøtt. Prøvekoden "T1" indikerer at prøven var frysst og tint ved 4 °C, "VT1" at den var frysst og tint i rennende vann. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A", "B", "C" og "D" indikerer paralleller. Utrekninger er forklart i teksten.*

Prøve	pH	Vekt [g]	Volum [mL]	For- tynnings- faktor	Absorbans ved 595 nm			Konsentrasjon [mg/mL]	Gjennomsnitt * fornyings- faktor	Protein i ekstrakt [g/g våtvekt]	Protein i ekstrakt [% av våtvekt]	
					1	2	3					
F3	10,1234	25	32	0,397	0,427	0,438	0,306	0,336	0,347	10,551	0,026	2,6
CF3A	20,3413	1,5446	200	0,577	0,568	0,546	0,489	0,479	0,457	95,004	0,007	0,7
CF3B	20,0254	1,8486	200	0,509	0,496	0,517	0,419	0,406	0,428	83,556	0,008	0,8
CF3C	20,0818	1,8891	200	0,529	0,533	0,511	0,440	0,444	0,422	87,011	0,008	0,8
CF3D	20,2231	1,2091	200	0,575	0,595	0,584	0,487	0,507	0,496	99,272	0,006	0,6
S3	10,0028	25	32	0,34	0,347	0,352	0,248	0,255	0,260	8,134	0,020	2,0
CS3A	20,1712	3,2395	200	0,477	0,492	0,463	0,387	0,402	0,373	77,460	0,012	1,2
CS3B	20,3271	2,6539	200	0,485	0,496	0,509	0,395	0,406	0,419	81,389	0,011	1,1
CS3C	20,1888	2,5134	200	0,463	0,46	0,469	0,373	0,370	0,379	74,750	0,009	0,9
CS3D	20,0525	3,2013	200	0,49	0,475	0,475	0,400	0,385	0,385	78,002	0,012	1,2
T1	10,2377	25	32	0,446	0,422	0,412	0,355	0,331	0,321	10,746	0,026	2,62
CT1A	20,2467	4,4164	200	0,398	0,394	0,38	0,307	0,303	0,288	59,848	0,013	1,31
CT1B	20,1465	5,1916	200	0,441	0,442	0,427	0,350	0,351	0,336	69,196	0,018	1,78
CT1C	20,2109	5,2543	200	0,393	0,413	0,422	0,302	0,322	0,331	63,641	0,017	1,65
CT1D	20,093	4,913	200	0,468	0,491	0,452	0,378	0,401	0,362	76,037	0,019	1,86
VT1	10,2661	25	32	0,287	0,273	0,316	0,194	0,180	0,223	6,367	0,016	1,55
CVT1A	19,9931	2,3598	200	0,364	0,351	0,372	0,272	0,259	0,280	54,090	0,006	0,64
CVT1B	20,0979	2,5745	200	0,362	0,366	0,336	0,270	0,274	0,244	52,532	0,007	0,67
CVT1C	20,2796	2,4478	200	0,389	0,405	0,377	0,298	0,314	0,285	59,780	0,007	0,72
CVT1D	20,2828	2,1781	200	0,378	0,358	0,333	0,286	0,266	0,241	52,870	0,006	0,57



## Vedlegg C: Aktivitet av kalpain-lignende enzymer

Dette vedlegget gir grunnlaget for kapittel 3.3 i hovedteksten. Her er resultater fra måling av aktivitet av kalpain-lignende enzymer presentert. Rådata og utregnede verdier for aktivitetmålinger i prøver fra lammekjøtt fra høsten 2013 ved bruk av ulike reaksjonsbuffer og betingelser er gitt i tabell C.1, og C.6. Rådata og utregnede verdier for aktivitetmålinger i prøver fra svinekjøtt fra våren 2014 ved bruk av ulike reaksjonsbuffer og betingelser er gitt i tabell C.2, C.3, C.4 og C.5. Utrekninger er forklart etter tabellene.

**Tabell C.1:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetsmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av lammekjøtt fra høsten 2013.

Analysene ble utført i 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 1 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300  $\mu\text{L}$  med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Inkuberingstiden var 15 minutter.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "1F" indikerer at prøven var fra ferskt midtstykke, "2F" var fra fersk ytterkant, "1M" var fra superkjølt midtstykke og "1Y" var fra superkjølt ytterkant. "1" i slutten av prøvekode betyr at prøvene var fra uttak 1. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.4 i Vedlegg B for midtstykkene og i tabell B.5 i Vedlegg B for ytterkantene. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet målt	Reaksjonsbuffer	Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Økning i intensitet			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein* min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein* min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt* min)
				1	2	3	1	2	3							
Total	100 mM bis-Tris, 10 mM $\text{CaCl}_2$ , 2 mM DTT	1F1	12,079	12,248	16,613	16,379	0,169	4,534	4,3	3	2	1,4	0,27	0,13	5	2
		2F1		18,066	17,306	20,245	5,987	5,227	8,166	6	2	0,9	0,49	0,07	11	1
		1M1		15,677	17,206	20,547	3,598	5,127	8,468	6	2	1,4	0,47	0,12	9	2
		1Y1		14,646	14,978	17,747	2,567	2,899	5,668	4	2	1	0,31	0,08	6	2
Ca- uav- hengig	100 mM bis-Tris, 20 mM EDTA, 2 mM DTT	1F1	11,865	11,473	12,029	12,409	- 0,392	0,164	0,544	0,1	0,5	0,3	0,01	0,02	0,2	0,5
		2F1		12,323	12,807	13,523	0,458	0,942	1,658	1	0,6	0,3	0,08	0,03	1,7	0,6
		1M1		14,561	14,791	14,914	2,696	2,926	3,049	2,9	0,2	0,1	0,24	0,01	4,8	0,2
		1Y1		11,987	11,904	12,682	0,122	0,039	0,817	0,3	0,4	0,2	0,03	0,02	0,5	0,4
Ca- av- hengig	-				1F1						0,26	0,13	4,8	2,4		
					2F1						0,41	0,07	8,9	1,5		
					1M1						0,23	0,12	4,7	2,4		
					1Y1						0,28	0,09	5,6	1,7		

**Tabell C.2:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra varen 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 2 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillagning oppbevart ved 4 °C over natten, for analyse. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet, SEM middelfeilen. "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "IUS" var fra svinekjøtt oppbevart ved 4 °C i 1 uke etter kjøp, "FrS" var fra fyst svinekjøtt tint ved 4 °C over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsvesken var destillert vann, "B" indikerer at den var en buffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene.

Aktivitet målt	Prøve (inkubasjons-tid [t])	Blank	Intensitetsmåling																						
			Økning i intensitet					Intensitetsmåling																	
SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt * min)		1	2	3	1	1	2	3	1	1	2	3	1	1	2	3	1	1	2	3					
$\Delta$ int/ (g våtvekt * min)		14,89	0,01	0,36	1	0,36	0,01	14,89	1	0,01	0,36	1	0,36	0,01	14,89	1	0,01	0,36	1	0,01	0,36				
SEM, $\Delta$ int/ (mg protein * min)		103,897	119,269	117,488	89,668	105,04	103,259	99	8	0,87	0,04	41,03	2	103,897	119,269	117,488	89,668	105,04	103,259	99	8	0,87	0,04	41,03	2
FSD (1)	14,229	51,884	10,596	48,67	-3,633	37,655	34,441	36	2	0,36	0,01	14,89	1	51,884	10,596	48,67	-3,633	37,655	34,441	36	2	0,36	0,01	14,89	1
FSD (2)	14,801	224,019	193,986	212,996	209,22	179,19	200	19	11	0,88	0,05	41,40	2	224,019	193,986	212,996	209,22	179,19	200	19	11	0,88	0,05	41,40	2
FSD (1)	13,663	34,268	33,561	33,341	20,605	19,898	19,678	20	0,5	0,24	0,003	8,28	0,12	34,268	33,561	33,341	20,605	19,898	19,678	20	0,5	0,24	0,003	8,28	0,12
IUSB (1)		61,992	63,914	63,145	48,329	50,251	49,482	49	1,0	0,6	0,55	20,46	0,2	61,992	63,914	63,145	48,329	50,251	49,482	49	1,0	0,6	0,55	20,46	0,2
FrSD (1)		37,003	46,431	45,254	23,34	31,591	32,768	29	5,1	3,0	0,31	12,13	1,2	37,003	46,431	45,254	23,34	31,591	32,768	29	5,1	3,0	0,31	12,13	1,2
FrSB (1)		101,905	102,149	101,911	88,242	88,486	88,248	88	0,14	0,08	0,91	36,74	0,03	101,905	102,149	101,911	88,242	88,486	88,248	88	0,14	0,08	0,91	36,74	0,03

**Fortsettelse tabell C.2:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetsmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra våren 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 2 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillaging oppbevart ved 4 °C over natten, før analyser. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet,  $\sigma$  standardavviket, SEM middelfeilen. "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "IUS" var fra svinekjøtt oppbevart ved 4 °C i 1 uke etter kjøp, "FrS" var fra fryst svinekjøtt tint ved 4 °C over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsvæsken var destillert vann, "B" indikerer at den var en buffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene.

Aktivitet målt	Prøve (inkubasjonstid [t])	Blank	Intensitetsmåling			Økning i intensitet			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein * min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein* min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt * min)
			1	2	3	1	2	3							
Ca-uavhengig	FSD (1)	16,128	47,409	42,636	43,31	31,281	26,508	27,182	28	3	1	0,29	0,02	11,70	1
	FSB (1)		100,208	97,446	110,509	84,08	81,318	94,381	87	7	4	0,76	0,03	35,77	2
	FSD (2)	13,817	74,161	73,365	87,692	60,344	59,548	73,875	65	8	5	0,33	0,02	13,34	1
	FSB (2)		226,714	204,672	226,848	212,90	190,855	213,03	206	13	7	0,90	0,03	42,46	2
	1USD (1)	13,246	33,461	34,531	32,951	20,215	21,285	19,705	20	0,8	0,5	0,25	0,01	8,42	0,2
	1USB (1)		63,963	64,29	65,512	50,717	51,044	52,266	51	0,8	0,5	0,58	0,01	21,29	0,2
	FrSD (1)		33,902	38,19	38,929	20,656	24,944	25,683	24	2,7	1,6	0,25	0,02	9,86	0,7
	FrSB (1)		97,555	95,074	82,131	84,309	81,828	68,885	78	8,3	4,8	0,81	0,05	32,59	2,0

**Forsettelse tabell C.2:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra våren 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 2 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillagning oppbevart ved 4 °C over natten, før analyse. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Δ int er gjennomsnittlig endring i intensitet, σ standardavviket, SEM middelfeilen. "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "IUS" var fra svinekjøtt oppbevart ved 4 °C i 1 uke etter kjøp, "FrS" var fra frysst svinekjøtt tint ved 4 °C over natten. "D" i prøvekode indikerer at ekstraksjonsvesken var destillert vann, "B" indikerer at den var en buffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene.

Aktivitet målt	Reaksjons- buffer	Prøve	Δ int/ (mg protein* min)	SEM, Δ int/ (mg protein* min)	Δ int/ (g våtevekt* min)	SEM, Δ int/ (g våtevekt* min)
Ca- avhengig	-	FSD (1 time)	0,08	0,02	3,2	0,82
		FSB (1 time)	0,11	0,05	5,3	2,59
		FSD (2 timer)	0,11	0,05	4,6	1,86
		FSB (2 timer)	-0,02	0,06	-1,1	2,68
		IUSD (1time)	-0,004	0,01	-0,1	0,22
		IUSB (1 time)	-0,022	0,01	-0,8	0,30
		FrSD (1 time)	0,057	0,04	2,3	1,39
		FrSB (1 time)	0,10	0,05	4,2	1,99



**Tabell C.3:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetsmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra våren 2014.

Reaksjonsbufferne er kombinasjon 2 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillaging oppbevart ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  før analyser. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av  $300\text{ }\mu\text{L}$  med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.

Inkuberingstid med substrat var 1 time,  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet.  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "1US" var fra svinekjøtt oppbevart ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 1 uke etter kjøp og "FrS" var fra fryst svinekjøtt tint ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann, "B" at den var en buffer bestående av  $100\text{ mM}$  bis-Tris,  $0,4\text{ mM}$  EDTA og  $10\text{ mM}$  DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten.. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet målt	Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Økning i intensitet			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein* min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein* min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt* min)
			1	2	3	1	2	3							
Total	FSD	13,663	51,936	50,072	51,227	38,273	36,409	37,564	37	0,9	0,5	0,38	0,01	15,45	0,2
	FSB		113,392	103,816	94,861	99,729	90,153	81,198	90	9,3	5,4	0,79	0,05	37,32	2,2
	1USD		28,39	28,461	27,943	14,727	14,798	14,28	15	0,3	0,2	0,18	0,00	6,03	0,07
	1USB		61,526	64,905	63,373	47,863	51,242	49,71	50	1,7	1,0	0,56	0,01	20,57	0,4
	FrSD		26,822	26,303	24,446	13,159	12,64	10,783	12	1,2	0,7	0,13	0,01	5,06	0,3
	FrSB		106,503	97,46	90,087	92,84	83,797	76,424	84	8,2	4,7	0,87	0,05	35,09	2,0
Ca-uavhengig	FSD	13,246	46,483	49,317	44,632	33,237	36,071	31,386	34	2,4	1,4	0,34	0,01	13,86	0,6
	FSB		92,663	81,887	76,909	79,417	68,641	63,663	71	8,1	4,6	0,62	0,04	29,15	1,9
	1USD		25,416	27,756	28,194	12,17	14,51	14,948	14	1,5	0,9	0,17	0,01	5,73	0,4
	1USB		57,359	57,258	58,75	44,113	44,012	45,504	45	0,8	0,5	0,50	0,01	18,47	0,2
	FrSD		25,218	24,653	25,141	11,972	11,407	11,895	12	0,3	0,2	0,12	0,00	4,88	0,07
	FrSB		98,281	87,779	78,404	85,035	74,533	65,158	75	9,9	5,7	0,77	0,06	31,16	2,4



**Fortssettelse tabell C.3:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra varen 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 2 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillagning oppbevart ved -20 °C for analyse. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Inkuberingstid med substrat var 1 time,  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet.  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "IUS" var fra svinekjøtt oppbevart ved 4 °C i 1 uke etter kjøp og "Frs" var fra frysst svinekjøtt tmt ved 4 °C over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann, "B" at den var en buffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet	Prøve	$\Delta$ int/ (mg protein * min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein * min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt* min)
Ca-avhengig	FSD	0,04	0,015	1,59	0,606
	FSB	0,17	0,062	8,17	2,928
	IUSD	0,01	0,011	0,30	0,362
	IUSB	0,06	0,012	2,10	0,451
	FrsD	0,005	0,008	0,18	0,308
	FrsB	0,10	0,077	3,93	3,099

**Tabell C.4:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetsmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra våren 2014.

Reaksjonsbufferne er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillaging oppbevart ved -20 °C før analyser. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.

Inkuberingstid med substrat var 1 time.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "IUS" var fra svinekjøtt oppbevart ved 4 °C i 1 uke etter kjøp og "FrS" var fra fryst svinekjøtt tint ved 4 °C over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann, "B" at den var en buffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten.. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet målt	Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Økning i intensitet			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein* min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein* min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt* min)
			1	2	3	1	2	3							
Total	FSD	12,336	34,827	39,243	36,435	22,491	26,907	24,099	24	2,2	1,3	0,25	0,01	10,12	0,5
	FSB		72,421	71,26	72,06	60,085	58,924	59,724	60	0,6	0,3	0,52	0,00	24,61	0,14
	1USD		17,719	18,715	19,987	5,383	6,379	7,651	6	1,1	0,7	0,08	0,01	2,67	0,3
	1USB		46,513	49,391	49,763	34,177	37,055	37,427	36	1,8	1,0	0,41	0,01	15,02	0,4
	FrSD		15,89	16,713	16,496	3,554	4,377	4,16	4	0,4	0,2	0,04	0,00	1,67	0,10
	FrSB		57,068	56,147	69,096	44,732	43,811	56,76	48	7,2	4,2	0,50	0,04	20,15	1,7
Ca-uavhengig	FSD	11,962	30,04	29,571	27,688	16,794	16,325	14,442	16	1,2	0,7	0,16	0,01	2,64	0,12
	FSB		68,841	67,651	76,547	55,595	54,405	63,301	58	4,8	2,8	0,51	0,02	9,63	0,5
	1USD		18,385	19,309	18,784	5,139	6,063	5,538	6	0,5	0,3	0,07	0,00	0,93	0,04
	1USB		43,26	43,278	46,766	30,014	30,032	33,52	31	2,0	1,2	0,35	0,01	5,20	0,2
	FrSD		20,43	20,408	21,299	7,184	7,162	8,053	7	0,5	0,3	0,08	0,00	1,24	0,05
	FrSB		61,743	55,556	56,714	48,497	42,31	43,468	45	3,3	1,9	0,46	0,02	7,46	0,3

**Forsettelse tabell C.4:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetstestning av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra våren 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillagning oppbevart ved -20 °C for analyse. Blank er intensitetstestning for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Inkuberingstid med substrat var 1 time.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilten. "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "IUS" var fra svinekjøtt oppbevart ved 4 °C i 1 uke etter kjøp og "FrS" var fra frysst svinekjøtt tint ved 4 °C over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann, "B" at den var en buffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet	Prøve	$\Delta$ int/(mg protein * min)	SEM, $\Delta$ int/(mg protein * min)	$\Delta$ int/(g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/(g våtvekt* min)
Ca-avhengig	FSD	0.09	0.01	7.47	0.55
	FSB	0.016	0.02	14.98	0.49
	IUSD	0.011	0.01	1.74	0.27
	IUSB	0.057	0.02	9.82	0.47
	FrSD	-0.036	0.00	0.43	0.11
	FrSB	0.04	0.05	12.69	1.76

**Tabell C.5:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra våren 2014.

Reaksjonsbufferne er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillaging oppbevart ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  før analyser. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av  $300\text{ }\mu\text{L}$  med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.

Inkuberingstid med substrat var 2 timer.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet.  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "1US" var fra svinekjøtt oppbevart ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 1 uke etter kjøp og "FrS" var fra fryst svinekjøtt tint ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann, "B" at den var en buffer bestående av  $100\text{ mM}$  bis-Tris,  $0,4\text{ mM}$  EDTA og  $10\text{ mM}$  DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten.. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet målt	Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Økning i intensitet			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein * min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein * min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt * min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt* min)
			1	2	3	1	2	3							
Total	FSD	14,375	57,295	54,463	76,34	42,92	40,088	61,965	48	11,9	6,9	0,24	0,03	9,98	1,4
	FSB		170,405	161,381	162,633	156,03	147,006	148,26	150	4,9	2,8	0,66	0,01	31,07	1,2
	1USD		23,659	25,844	27,061	9,284	11,469	12,686	11	1,7	1,0	0,07	0,01	2,30	0,4
	1USB		109,894	95,652	111,565	95,519	81,277	97,19	91	8,7	5,0	0,51	0,03	18,93	2,1
	FrSD		19,013	19,436	19,368	4,638	5,061	4,993	5	0,2	0,1	0,03	0,00	1,02	0,05
	FrSB		116,952	166,118	129,549	102,577	151,743	115,17	123	25,5	14,7	0,64	0,08	25,62	6,1
Ca-uavhengig	FSD	16,721	56,016	58,3	51,731	42,77	45,054	38,485	42	3,3	1,9	0,21	0,01	3,51	0,2
	FSB		124,57	113,546	121,425	111,324	100,3	108,18	107	5,7	3,3	0,47	0,01	8,88	0,3
	1USD		22,514	21,767	22,627	9,268	8,521	9,381	9	0,5	0,3	0,05	0,00	0,75	0,02
	1USB		79,9	81,442	76,926	66,654	68,196	63,68	66	2,3	1,3	0,37	0,01	5,51	0,11
	FrSD		19,341	19,854	20,228	6,095	6,608	6,982	7	0,4	0,3	0,03	0,00	0,55	0,02
	FrSB		105,81	126,407	108,929	92,564	113,161	95,683	100	11,1	6,4	0,52	0,03	8,37	0,5

**Fortsettelse tabell C.5:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetstest av kalpain-lignende enzymer i homogenater av svinekjøtt fra våren 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Homogenatene ble etter tillagning oppbevart ved -20 °C før analyse. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Inkuberingstid med substrat var 2 timer.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet.  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen "FS" indikerer at prøven var fra ferskt svin, "IUS" var fra svinekjøtt oppbevart ved 4 °C i 1 uke etter kjøp og "FRS" var fra frysst svinekjøtt tint ved 4 °C over natten. "D" i prøvekoden indikerer at ekstraksjonsbufferen var destillert vann, "B" at den var en buffer bestående av 100 mM bis-Tris, 0,4 mM EDTA og 10 mM DTT, se avsnitt 2.5 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregning, og kan finnes i tabell B.6 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet	Prøve	$\Delta$ int/ (mg protein * min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein * min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt * min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt * min)
Ca-avhengig	FSD	0,03	0,04	6,47	1,43
	FSB	0,19	0,02	22,19	1,20
	IUSD	0,01	0,01	1,55	0,41
	IUSB	0,14	0,03	13,42	2,10
	FRSD	-0,01	0,00	0,47	0,06
	FRSB	0,12	0,08	17,25	6,16

**Tabell C.6:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetsmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av lammekjøtt fra høsten 2013.

Analysene ble gjort i 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300  $\mu$ L med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Inkuberingstiden med substrat var 2 timer.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "1F" indikerer at prøven var fra ferskt midtstykke, "2F" var fra fersk ytterkant, "1M" var fra superkjølt midtstykke og "1Y" var fra superkjølt ytterkant. Tallet i slutten av prøvekodene indikerer hvilket uttak prøvene er fra. Uttakstider etter slakt er beskrevet i tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.4 i Vedlegg B for midtstykkene og i tabell B.5 for ytterkantene. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet målt	Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Økning i intensitet			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein* min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein* min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt* min)
			1	2	3	1	2	3							
Total	1F1	15,207	21,712	25,634	31,29	6,505	10,427	16,083	11	5	3	0,98	0,25	18	5
	2F1		15,57	19,285	29,85	0,363	4,078	14,643	6	7	4	0,48	0,33	10	7
	1M1		18,78	19,289	21,006	3,573	4,082	5,799	4	1	1	0,37	0,06	7	1
	1Y1		17,782	20,013	26,394	2,575	4,806	11,187	6	4	3	0,52	0,22	10	4
	1F8		27,8	27,794	26,362	12,593	12,587	11,155	12	1	0	1,08	0,04	20	1
	1M8		13,893	15,351	18,77	-1,314	0,144	3,563	1	3	1	0,09	0,17	1	2
	1Y8		27,886	24,361	24,485	12,679	9,154	9,278	10	2	1	1,03	0,11	17	2
	1M11		14,68	17,209	17,283	-0,527	2,002	2,076	1	1	1	0,11	0,08	2	1
	1Y11		23,504	24,06	27,409	8,297	8,853	12,202	10	2	1	1,15	0,14	16	2



**Forsettelse tabell C.6:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av lammekjøtt fra høsten 2013. Analysene ble gjort i 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Inkuberingstiden med substrat var 2 timer. Δ int er gjennomsnittlig endring i intensitet, σ er standardavviket, SEM er middelfeilen. "IF" indikerer at prøven var fra ferskt midstykke, "2F" var fra fersk ytterkant, "1M" var fra superkjølt midstykke og "1Y" var fra superkjølt ytterkant. Tallet i slutten av prøvekodene indikerer hvilket uttak prøvene er fra. Uttakssteder etter slakt er beskrevet i tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.4 i Vedlegg B for midstykkene og i tabell B.5 for ytterkantene. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet målt	Prøve	Blank	Intensitetsmåling										SEM, Δ int/(g våtvekt* (min))		
			1	2	3	1	2	3	Δ int	σ	SEM	Δ int/(mg protein* (min))			
IF1			13,473	14,083	15,8	1,828	2,438	4,155	3	1,2	0,7	0,25	0,06	5	1,2
2F1			28,575	15,32	13,654	16,93	3,675	2,009	3	1,2	0,7	0,22	0,05	5	1,1
1M1			14,168	14,461	15,156	2,523	2,816	3,511	3	0,5	0,3	0,24	0,02	5	0,5
1Y1			15,652	16,179	17,814	4,007	4,534	6,169	5	1,1	0,7	0,41	0,05	8	1,1
IF8			23,088	22,229	24,969	11,443	10,584	13,324	12	1,4	0,8	1,05	0,07	19	1,3
1M8			13,483	13,281	13,183	1,838	1,636	1,538	2	0,2	0,09	0,20	0,01	3	0,14
1Y8			20,373	22,164	22,799	8,728	10,519	11,154	10	1,3	0,7	1,00	0,07	17	1,2
1M11			13,682	13,675	14,359	2,037	2,03	2,714	2	0,4	0,2	0,20	0,02	4	0,4
1Y11			21,78	18,298	22,398	10,135	6,653	10,753	9	2,2	1,3	1,08	0,15	15	2,1

**Fortsettelse tabell C.6:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetsmåling av kalpain-lignende enzymer i homogenater av lammekjøtt fra høsten 2013. Analysene ble gjort i 2014. Reaksjonsbufferne er kombinasjon 3 fra tabell 2.6.1 i delkapittel 2.6 i hovedteksten. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300  $\mu$ L med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Inkuberingstiden med substrat var 2 timer.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "1F" indikerer at prøven var fra ferskt midtstykke, "2F" var fra fersk ytterkant, "1M" var fra superkjølt midtstykke og "1Y" var fra superkjølt ytterkant. Tallet i slutten av prøvekodene indikerer hvilket uttak prøvene er fra. Uttakstider etter slakt er beskrevet i tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.4 i Vedlegg B for midtstykkene og i tabell B.5 for ytterkantene. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene. Utregninger er forklart i teksten.

Aktivitet	Prøve	$\Delta$ int/ (mg protein* min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein* min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt* min)
Ca-avhengig	1F1	0,73	0,26	13,6	4,75
	2F1	0,27	0,33	5,7	7,06
	1M1	0,13	0,06	2,5	1,21
	1Y1	0,11	0,22	2,1	4,40
	1F8	0,03	0,08	0,5	1,53
	1M8	-0,10	0,17	-1,4	2,37
	1Y8	0,02	0,14	0,4	2,23
	1M11	-0,10	0,08	-1,8	1,47
	1Y11	0,07	0,21	1,0	2,90



I tabellene er standardavviket,  $\sigma$ , funnet ved formelen:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2},$$

der  $N$  er antall målinger av en prøve,  $x_i$  er verdien for økning i intensitet for en parallell og  $\bar{x}$  er gjennomsnittet av alle målinger for en prøve ( $\Delta$  int i tabellene).

SEM (standard error of the mean, middelfeil) i tabeller funnet ved formelen:

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{N}},$$

der  $\sigma$  er standardavviket og  $N$  er antall målinger av en prøve.

I tabellene er  $\Delta$  int/(mg protein\*min), endring i fluorescens-intensitet per mg protein og min, funnet ved:

$$\frac{\Delta \text{ int}}{\text{Volum prøve tatt ut i kyvette [mL]} \cdot \text{inkubasjonstid med substrat [min]} \cdot \text{proteinkonsentrasjon i løsning} \left[ \frac{\text{mg protein}}{\text{mL}} \right]}$$

der  $\Delta$  int er gitt i tabellene, volum prøve tatt ut i kyvette er 0,1 mL, inkuberingstid med substrat er gitt i tabellene, og proteinkonsentrasjon i løsning er gitt i vedlegg B. For midtstykker av lammekjøtt fra høsten 2013 er proteinkonsentrasjonen gitt i tabell B.4, for ytterkanter av lammekjøtt fra høsten 2013 er den gitt i tabell B.5 og for svinekjøtt fra våren 2014 er den gitt i tabell B.6.

$\Delta$  int/(g våtvekt\*min), endring i fluorescens-intensitet per g våtvekt og min, er funnet ved:

$$\frac{\Delta \text{ int}}{\text{g våtvekt} \cdot \text{inkubasjonstid med substrat [min]}}$$

der  $\Delta \text{ int}$  er gjennomsnittlig økning i intensitet i prøven, som er gitt i tabellene over, inkuberingstiden er gitt i tabellene over og vekt er gitt i de samme tabellene som proteinkonsentrasjonene i vedlegg B.

”SEM,  $\Delta \text{ int} (\dots)$ ” for hver prøve er funnet ved å ta SEM av de tre målingene og gange dette tallet med samme faktorer som gjennomsnittlig økning i intensitet i prøven blir ganget med for å få henholdsvis endring i intensitet per mg protein og minutt og endring i intensitet per g våtvekt og minutt. ”SEM,  $\Delta \text{ int} (\dots)$ ” for total aktivitet og kalsiumuavhengig aktivitet slås deretter sammen ved å addere i kvadratur og ta kvadratroten av verdien for å få ”SEM,  $\Delta \text{ int} (\dots)$ ” for kalsiumavhengig aktivitet. Feilfeltene i figurene i delkapittel 3.3 i hovedteksten er ”SEM,  $\Delta \text{ int} (\dots)$ ” for kalsiumavhengig aktivitet.

## Vedlegg D: Aktivitet av katepsin B-lignende enzymer

Dette vedlegget gir grunnlaget for avsnitt 3.4 i hovedteksten. Resultater fra måling av aktivitet av katepsin B-lignende enzymer er her presentert. Rådata og utregnede verdier for aktivitetmålinger i prøver fra lammekjøtt fra høsten 2013 er gitt i tabell D.1. Målingene er gjort ved 30 °C. Tilsvarende verdier for lammekjøtt våren 2014 er gitt i tabell D.2. I tillegg er resultater av målinger ved 30 °C for samme prøver ved tilsats av salt gitt i tabell D.3. Verdier funnet for lammekjøttet våren 2014 ved inkuberingstemperatur på 14 °C uten og med salt i reaksjonsbufferen er gitt i henholdsvis tabellene D.4 og D.5. Tilsvarende verdier ved 4 °C uten og med salt i reaksjonsbufferen er gitt i henholdsvis tabellene D.6 og D.7. Utrekninger er forklart etter tabellene.

**Tabell D.1:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling ved 30 °C av katepsin B-lignende enzymer for lammekjøtt fra høsten 2013.

Inkuberingstiden var 15 minutter. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet.  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "1F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" og "2M" indikerer paralleller av samme superkjølte kjøttstykke. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.4 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Endring i intensitet			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein *min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein *min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt* min)
		1	2	3	1	2	3							
1F1	28,979	385,747	371,082	342,28	356,768	342,103	313,301	337	22	13	30	1,14	559	21
C1F1A		45,972	48,268	50,207	16,993	19,289	21,228	19	3	2	0,1	0,01	0,8	0,08
C1F1B		43,705	50,327	47,588	14,726	21,348	18,609	18	3	2	0,1	0,01	1,3	0,14
1M1		257,47	275,637	263,422	228,491	246,658	234,443	237	9	5	19	0,44	390	9
C1M1A		57,515	59,835	54,724	28,536	30,856	25,745	28	3	1,5	0,2	0,01	1,6	0,08
C1M1B		60,629	59,791	53,471	31,65	30,812	24,492	29	4	2	0,2	0,02	1,2	0,09
1F2		271,684	282,277	258,566	242,705	253,298	229,587	242	12	7	15	0,42	401,868	11,39
C1F2A		49,115	44,954	45,128	20,136	15,975	16,149	17	3	2	0,1	0,02	0,890	0,12
C1F2B		49,194	48,752	49,888	20,215	19,773	20,909	20	1	0,3	0,1	0,002	0,955	0,02
1M2		327,342	337,102	336,046	298,363	308,123	307,067	305	5	3	21	0,21	481,080	4,89
C1M2A		58,561	63,455	63,522	29,582	34,476	34,543	33	3	2	0,2	0,01	0,802	0,04
C1M2B		46,375	53,521	42,608	17,396	24,542	13,629	19	6	3	0,1	0,02	0,821	0,14
1F3	25,345	286,285	288,494	319,912	260,94	263,149	294,567	273	19	11	24	1	454,604	18,09
C1F3A		72,581	63,583	62,525	47,236	38,238	37,18	41	7	5	0,3	0,04	2,165	0,28
C1F3B		75,943	71,868	68,297	50,598	46,523	42,952	47	4	2	0,4	0,02	2,069	0,10

*Fortsettelse tabell D.1: Rådata og beregnede verdier fra aktivitetstestmåling ved 30 °C av katepsin B-lignende enzymer for lammekjøtt fra høsten 2013. Inkuberingstiden var 15 minutter. Blank er intensitetstestmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet.  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelseilen. "IF" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" og "2M" indikerer paralleller av samme superkjølte kjøststykke. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.4 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.*

Prøve	Blank	Intensitetstestmåling			Endring i intensitet, $\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ protein (mg protein*min)	SEM, $\Delta$ int/ protein (mg protein*min)	$\Delta$ int/ våtekt*min (g våtekt*min)	SEM, $\Delta$ int/ våtekt*min (g våtekt*min)			
		1	2	3										
1M3		342,2	310,223	363,796	316,855	284,878	338,451	313	27	16	20	1,02	521,834	25,91
C1M3A		50,379	52,129	58,685	25,034	26,784	33,34	28	4	3	0,2	0,02	1,592	0,14
C1M3B		45,716	52,139	64,82	20,371	26,794	39,475	29	10	6	0,2	0,04	1,148	0,22
1F4		357,555	369,848	325,86	332,21	344,503	300,515	326	23	13	34	1,38	541,615	21,79
C1F4A		62,503	53,902	60,15	37,158	28,557	34,805	34	6	4	0,4	0,05	1,424	0,19
C1F4B		68,923	64,538	69,316	43,578	39,193	43,971	42	3	2	0,4	0,01	1,102	0,04
1M4		311,457	288,584	244,22	286,112	263,239	218,875	256	34	20	20	1,53	413,142	31,84
C1M4A	25,345	71,204	71,542	61,851	45,859	46,197	36,506	43	6	3	0,4	0,03	3,530	0,26
C1M4B		81,426	78,141	77,269	56,081	52,796	51,924	54	2	1	0,6	0,01	3,439	0,08
1F5		640,588	734,359	651,095	615,243	709,014	625,75	650	51	30	67	3,06	1061,710	48,45
C1F5A		93,867	95,275	92,207	68,522	69,93	66,862	68	2	1	0,6	0,01	3,851	0,05
C1F5B		84,695	75,255	99,484	59,35	49,91	74,139	61	12	7	0,5	0,06	3,399	0,39
1M5		307,321	250,121	321,287	281,976	224,776	295,942	268	38	22	22	1,81	437,257	35,58
C1M5A		48,409	53,826	55	23,064	28,481	29,655	27	4	2	0,2	0,02	2,607	0,20
C1M5B		54,363	48,531	54,959	29,018	23,186	29,614	27	4	2	0,2	0,02	2,306	0,17

**Fortsettelse tabell D.1:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetsmåling ved 30 °C av katepsin B-lignende enzymer for lammekjøtt fra høsten 2013. Inkuberingstiden var 15 minutter. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet.  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "1F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" og "2M" indikerer paralleller av samme superkjølte kjøttstykke. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.4 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Endring i intensitet, $\Delta$ int			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein* min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein* min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/(g våtvekt *min)
		1	2	3	1	2	3							
1F6	28,979	349,355	355,769	354,476	320,376	326,79	325,497	324	3	2	25	0,15	520,706	3,15
C1F6A		68,926	73,552	87,738	39,947	44,573	58,759	42	12	7	0,3	0,06	2,029	0,33
C1F6B		95,268	81,974	90,599	66,289	52,995	61,62	60	7	4	0,6	0,04	2,746	0,18
1M6	28,979	389,132	403,44	366,845	360,153	374,461	337,866	357	18	11	23	0,69	579,109	17,25
C1M6A		90,537	90,922	96,869	61,558	61,943	67,89	64	4	2	0,5	0,02	7,305	0,23
C1M6B		106,311	94,199	100,457	77,332	65,22	71,478	71	6	3	0,5	0,02	7,960	0,39
1F7		379,495	299,601	351,369	350,516	270,622	322,39	315	41	23	38	2,80	511,722	38,07
C1F7A		90,438	95,791	96,413	61,459	66,812	67,434	65	4	3	0,6	0,03	3,246	0,15
C1F7B		81,104	81,563	85,578	52,125	52,584	56,599	54	2	1	0,5	0,01	1,793	0,05
1M7		449,473	435,454	427,959	420,494	406,475	398,98	409	11	6	36	0,56	666,950	10,29
C1M7A		80,01	85,58	76,634	51,031	56,601	47,655	52	5	3	0,5	0,02	5,950	0,30
C1M7B		79,837	76,048	82,045	50,858	47,069	53,066	50	3	2	0,5	0,02	5,718	0,20
1F8		333,589	358,501	370,304	304,61	329,522	341,325	325	19	11	29	0,96	530,785	17,67
C1F8A		78,846	81,283	81,907	49,867	52,304	52,928	52	2	1	0,7	0,01	1,870	0,03
C1F8B		94,184	91,008	88,512	65,205	62,029	59,533	62	3	2	0,9	0,02	2,588	0,07
1M8		319,212	308,221	326,069	290,233	279,242	297,09	289	9	5	34	0,61	472,027	8,49

**Forsettelse tabell D.1:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling ved 30 °C av katepsin B-lignende enzymer for lammekjøtt fra høsten 2013. Inkuberingstiden var 15 minutter. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet.  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "1F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt kjøtt, "1M" og "2M" indikerer paralleller av samme superkjølte kjøttstykke. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. Tall etter "F" og "M" indikerer hvilket uttak prøven er fra. "A" og "B" indikerer paralleller. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.4 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Prove	Blank	Intensitetsmåling			Endring i intensitet, $\Delta$ int			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ protein * (mg min)	SEM, $\Delta$ int/ protein * (mg min)	$\Delta$ int/ våtekt* (g min)	SEM, $\Delta$ int/(g våtekt* min)
		1	2	3	1	2	3							
C1M8A	28,979	87,498	71,795	84,774	58,519	42,816	55,795	52	8	5	0,7	6,500	0,60	
C1M8B	28,979	92,013	72,761	71,997	63,034	43,782	43,018	50	11	7	0,7	6,255	0,82	
1M9		288,543	347,049	350,245	259,564	318,07	321,266	300	35	20	23	1,51	33,36	
2M9		442,074	394,433	399,698	413,095	365,454	370,719	383	26	15	27	1,05	24,63	
C2M9A		107,773	114,269	108,506	78,794	85,29	79,527	81	4	2	0,6	6,928	0,18	
C2M9B		117,762	124,427	117,519	88,783	95,448	88,54	91	4	2	0,6	8,812	0,22	
1M10		428,696	458,398	442,895	399,717	429,419	413,916	414	15	9	27	0,56	14,24	
C1M10A	28,979	101,054	90,381	67,574	72,075	61,402	38,595	57	17	10	0,5	3,511	0,60	
C1M10B	28,979	93,549	94,878	95,629	64,57	65,899	66,65	65	1	1	0,5	5,594	0,06	
1M11		329,734	367,266	353,773	300,755	338,287	324,794	321	19	11	21	0,73	18,18	
C1M11A		84,948	76,188	72,904	55,969	47,209	43,925	49	6	4	0,4	5,957	0,44	
C1M11B		93,556	83,304	87,431	64,577	54,325	58,452	59	7	5	0,5	7,706	0,66	

**Tabell D.2:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling ved 30 °C av katepsin B-lignende enzymer i lammekjøtt fra våren 2014 uten salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstiden var 15 minutter. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Δ int er gjennomsnittlig endring i intensitet i prøven, σ er standardavviket, SEM er middelfeilen. "F" i prøvekoden indikerer at prøven var fra ferskt lammekjøtt, "S" var fra superkjølt lammekjøtt, "T1" var fra fryst lam tint ved 4 °C, "VT1" var fra fryst lam tint i rennende vann. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. "A", "B" og "C" indikerer hvilken parallell som er brukt. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.7 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Endring i intensitet			Δ int	σ	SEM	Δ int/ (mg protein * min)	SEM, Δ int/ (mg protein* min)	Δ int/ (g våtvekt* min)	SEM, Δ int/(g våtvekt* min)
		1	2	3	1	2	3							
F1	24,891	169,851	188,928	182,876	144,96	164,037	157,985	156	10	5,63	11	0,40	257,951	9,33
CF1C		21,834	19,844	22,274	-3,057	-5,047	-2,617	-4	1	0,75	-0,02	0,005	-0,127	0,03
S1		262,288	214,148	184,959	237,397	189,257	160,068	196	39	22,55	11	1,28	320,477	36,94
CS1C		48,319	44,914	41,152	23,428	20,023	16,261	20	4	2,07	0,2	0,02	1,602	0,17
F2		194,375	213,362	210,405	169,484	188,471	185,514	181	10	5,90	11	0,36	298,660	9,72
CF2B		24,29	23,782	25,774	-0,601	-1,109	0,883	-0,3	1	0,60	-0,002	0,005	-0,013	0,03
S2		262,427	224,402	231,781	237,536	199,511	206,89	215	20	11,64	18	1,00	352,661	19,13
CS2B		47,088	45,836	48,53	22,197	20,945	23,639	22	1	0,78	0,16	0,006	1,859	0,07
F3		203,142	210,527	185,268	178,251	185,636	160,377	175	13	7,50	11	0,47	287,707	12,34
CF3B		36,836	45,563	55,784	11,945	20,672	30,893	21	9	5,48	0,15	0,04	1,303	0,34
S3		249,029	258,864	253,000	224,138	233,973	228,109	229	5	2,86	19	0,23	381,127	4,76
CS3B		59,387	56,861	58,775	34,496	31,97	33,884	33	1	0,76	0,3	0,007	2,911	0,07
T1		274,048	272,662	275,709	249,157	247,771	250,818	249	2	0,88	15	0,05	405,769	1,43
CT1A		125,132	114,436	113,151	100,241	89,545	88,26	93	7	3,80	1,0	0,04	16,063	0,66
VT1		276,483	259,862	243,688	251,592	234,971	218,797	235	16	9,47	25	0,99	381,709	15,37
CVT1B		102,828	94,154	102,844	77,937	69,263	77,953	75	5	2,89	1,0	0,04	6,039	0,23



**Tabell D.3:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling ved 30 °C av katepsin B-lignende enzymer i lammekjøtt fra våren 2014 med 5 %

salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstiden var 15 minutter. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av

reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet i prøven,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "F"

i prøvekoden indikerer at prøven var fra ferskt lammekjøtt, "S" var fra superkjølt lammekjøtt, "T1" var fra frysst lam tint ved 4 °C, "VT1" var

fra frysst lam tint i rennende vann. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. "B" og "C" indikerer hvilken

parallell som er brukt. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til

utregninger, og kan finnes i tabell B.7 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Endring i intensitet			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein*min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein*min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt*min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt*min)	SEM, $\Delta$ int/ (g våtvekt*min)
		1	2	3	1	2	3								
F1		51,931	53,801	57,057	26,906	28,7755	32,032	29	2,4	1,7	2,1	0,12	48,451	2,79	0,02
CF1C		19,751	19,256	18,199	-5,274	-5,769	-6,826	-6	0,7	0,5	-0,04	0,003	-0,212	0,02	1,73
S1		63,789	61,967	64,482	38,764	36,942	39,457	38	1,5	1,1	2,2	0,06	62,904	1,73	0,02
CS1C		26,784	27,219	27,278	1,759	2,194	2,253	2	0,3	0,2	0,02	0,002	0,166	0,02	1,70
F2		70,301	68,418	68,077	45,276	43,393	43,052	44	1,5	1,0	2,7	0,06	72,386	1,70	0,03
CF2B		19,465	20,691	20,06	-5,56	-4,334	-4,965	-5	0,9	0,6	-0,04	0,005	-0,234	0,03	5,86
S2		63,497	68,124	73,959	38,472	43,099	48,934	44	5,0	3,6	3,7	0,31	71,473	5,86	0,05
CS2B		28,75	26,633	28,028	3,725	1,608	3,003	3	1,1	0,6	0,02	0,00	0,232	0,05	0,05
F3		79,227	81,434	80,843	54,202	56,409	55,818	55	1,1	0,7	3,5	0,04	91,334	1,09	0,03
CF3B		27,123	27,233	28,849	2,098	2,208	3,824	3	1,0	0,6	0,02	0,004	0,167	0,03	0,03
S3		81,22	79,531	85,648	56,195	54,506	60,623	57	3,2	1,8	4,7	0,15	95,153	3,04	0,05
CS3B		41,479	39,694	40,321	16,454	14,669	15,296	15	0,9	0,5	0,13	0,004	1,347	0,05	0,05
T1		80,783	100,821	101,583	55,758	75,796	76,558	69	11,8	6,8	4,3	0,42	112,933	11,09	0,47
CT1C		70,911	71,888	79,515	45,886	46,863	54,49	49	4,7	2,7	0,5	0,03	8,506	0,47	6,05
VT1		78,37	87,254	90,916	53,345	62,229	65,891	60	6,5	3,7	6,3	0,39	98,201	6,05	0,17
CVT1C		63,921	59,872	56,835	38,896	34,847	31,81	35	3,6	2,1	0,4	0,03	2,831	0,17	0,17

**Tabell D.4:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling ved 14 °C av katepsin B-lignende enzymer i lammekjøtt fra våren 2014 uten salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstiden var 60 minutter. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Δ int er gjennomsnittlig endring i intensitet i prøven, σ er standardavviket, SEM er middelfeilen. "F" i prøvekode indikerer at prøven var fra ferskt lammekjøtt, "S" var fra superkjølt lammekjøtt, "T1" var fra fryst lam tint ved 4 °C, "VT1" var fra fryst lam tint i rennende vann. "C" først i prøvekode indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. "B" og "C" indikerer hvilken parallell som er brukt. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.7 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallellene

Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Endring i intensitet, Δ int			Δ int	σ	SEM	Δ int/ (mg protein *min)	SEM, Δ int/ (mg protein *min)	Δ int/ (g våtvekt* min)	SEM, Δ int/(g våtvekt * min)
		1	2	3	1	2	3							
F1	28,885	374,962	324,136	281,422	346,077	295,251	252,537	298	47	27,04	5	0,48	123,438	11,20
CF1C		39,178	36,296	41,236	10,293	7,411	12,351	10	3	1,79	0,02	0,00	0,080	0,01
S1		555,948	444,912	440,693	527,063	416,027	411,808	452	65	37,73	6	0,54	185,016	15,46
CS1C		101,92	94,694	76,196	73,035	65,809	47,311	62	13	7,66	0,12	0,01	1,226	0,15
F2		445,453	432,834	22,207	416,568	403,949	-6,678	410	9	6,31	6	0,10	169,091	2,60
CF2B		50,211	57,61	21,134	21,326	28,725	-7,751	25	5	3,70	0,05	0,01	0,304	0,04
S2		472,769	421,919	12,949	443,884	393,034	-15,936	418	36	25,43	9	0,55	171,881	10,44
CS2B		97,647	92,456	76,196	68,762	63,571	47,311	66	4	2,60	0,12	0,00	1,309	0,05
F3	30,804	419,981	411,261	371,042	389,177	380,457	340,238	370	26	15,07	6	0,24	152,270	6,20
CF3B		67,911	72,785	79,543	37,107	41,981	48,739	43	7	4,06	0,07	0,01	0,539	0,05
S3		610,815	476,103	564,819	580,011	445,299	534,015	520	68	39,53	11	0,81	216,512	16,47
CS3B		96,112	118,263	99,316	65,308	87,459	68,512	74	12	6,91	0,2	0,01	1,974	0,19
T1	34,598	411,156	484,959	517,427	376,558	450,361	482,829	437	54	31,44	7	0,49	177,686	12,80
CT1C		197,528	212,156	228,544	162,93	177,558	193,946	178	16	8,96	0,5	0,02	6,476	0,33
VT1		542,867	477,394	482,72	508,269	442,796	448,122	466	36	20,99	12	0,55	189,294	8,52
CVT1C		168,287	140,782	152,84	133,689	106,184	118,242	119	14	7,96	0,4	0,03	2,549	0,17

**Tabell D.5:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetmåling ved 14 °C av katepsin B-lignende enzymer i lammehjott fra våren 2014 med 5 % salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstiden var 60 minutter. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat. Δ int er gjennomsnittlig endring i intensitet i prøven, σ er standardavviket, SEM er middelfeilen. "F" i prøvekoden indikerer at prøven var fra ferskt lammehjott, "S" var fra superkjølt lammehjott, "T1" var fra frysst lam tint ved 4 °C, "VT1" var fra frysst lam tint i rennende vann. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. "B" og "C" indikerer hvilken parallell som er brukt. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.7 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten. Røde tall er sett bort fra grunnet kjente feil med parallelle

Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Endring i intensitet, Δ int		Δ int	σ	SEM	Δ int/ (mg protein)* (min)	Δ int/ (mg protein)* (min)	Δ int/ (g våtvekt)* (min)	SEM, Δ int/ (g våtvekt)* (min)	SEM, Δ int/ (g våtvekt)* (min)
		1	2	3	1	2								
F1		110,183	93,482	14,354	82,329	65,628	-13,5	74	12	1,31	0,21	30,648	4,89	0,002
CF1C		24,519	24,028	3,202	-3,335	-3,826	-24,652	-4	0,3	0,2	-0,01	0,00	-0,029	1,93
S1		130,134	120,71	10,911	102,28	92,856	-16,943	98	7	1,39	0,07	39,970	1,93	0,04
CS1C		40,58	44,672	5,526	12,726	16,818	-22,328	15	3	0,03	0,00	0,292	0,04	0,04
F2		113,476	106,559	15,734	85,622	78,705	-12,12	82	5	1,27	0,05	33,864	1,43	0,02
CF2B		29,445	26,767	25,596	1,591	-1,087	-2,258	0	2	1	0,00	0,003	0,02	0,02
S2		138,15	153,363	118,246	110,296	125,509	90,392	118	11	8	3	48,428	3,12	0,06
CS2B		46,101	40,565	50,628	18,247	12,711	22,774	18	5	2,91	0,03	0,35	0,06	0,06
F3		146,049	142,013	144,255	117,125	113,089	115,331	115	2	1,17	1,82	47,41	0,48	0,04
CF3B		48,026	40,281	39,227	19,102	11,357	10,303	14	5	2,77	0,02	0,17	0,04	0,04
S3		185,64	179,431	166,931	156,716	150,507	138,007	148	10	5,50	3,04	61,82	2,29	0,03
CS3B		74,739	71,609	72,107	45,815	42,685	43,183	44	2	0,97	0,09	1,17	0,03	0,03
T1		181,531	163,928	154,299	154,395	136,792	127,163	139	14	7,97	2,16	56,76	3,24	0,25
CT1C		124,247	103,084	104,268	97,111	75,948	77,132	83	12	6,87	0,23	3,03	0,25	0,25
VT1		153,731	138,226	154,124	126,595	111,09	126,988	122	9	5,24	3,18	49,34	2,12	2,12
CVT1C		100,254	97,699	102,878	73,118	70,563	75,742	73	3	1,50	0,23	1,56	0,03	0,03

**Tabell D.6:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetsmåling ved 4 °C av katepsin B-lignende enzymer i lammekjøtt fra våren 2014 uten salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstiden var 120 minutter. Blank er intensitetsmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet i prøven,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "F" i prøvekode indikerer at prøven var fra ferskt lammekjøtt, "S" var fra superkjølt lammekjøtt, "T1" var fra fryst lam tint ved 4 °C, "VT1" var fra fryst lam tint i rennende vann. "C" først i prøvekode indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. "B" og "C" indikerer hvilken parallell som er brukt. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.7 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve	Blank	Intensitetsmåling			Endring i intensitet, $\Delta$ int			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein* min)	SEM, $\Delta$ int/ (mg protein* min)	$\Delta$ int/ (g våtvekt* min)	SEM, $\Delta$ int/(g våtvekt* min)
		1	2	3	1	2	3							
F1	27,288	366,705	365,104	339,336	339,417	337,816	312,048	330	15	9	3	0,08	68,307	1,84
CF1C		32,57	25,212	28,572	5,282	-2,076	1,284	1,5	5	3	0,0011	0,002	0,006	0,01
S1		452,663	429,173	397,346	425,375	401,885	370,058	399	33	19	2,8	0,14	81,749	3,96
CS1C		65,832	58,322	66,372	38,544	31,034	39,084	36	6	3	0,03	0,00	0,358	0,03
F2		404,326	396,617	386,092	377,038	369,329	358,804	368	11	6	2,8	0,05	75,917	1,31
CF2B		46,47	36,795	37,13	19,182	9,507	9,842	13	7	4	0,013	0,00	0,078	0,03
S2		494,98	458,395	434,217	467,692	431,107	406,929	435	38	22	4,7	0,24	89,387	4,55
CS2B		77,659	86,925	88,254	50,371	59,637	60,966	57	8	4	0,05	0,00	0,564	0,04
F3	26,179	244,257	282,24	336,685	218,078	256,061	310,506	262	56	32	2,1	0,25	53,825	6,63
CF3B		63,762	57,957	65,225	37,583	31,778	39,046	36	5	3	0,03	0,00	0,229	0,02
S3		475,78	430,661	450,943	449,601	404,482	424,764	426	32	18	4,4	0,19	88,784	3,84
CS3B		91,445	83,085	94,712	65,266	56,906	68,533	64	8	4	0,07	0,00	0,851	0,06
T1	26,453	520,873	592,144	598,872	494,42	565,691	572,419	544	58	33	4,2	0,26	110,738	6,79
CT1C		195,784	191,177	189,239	169,331	164,724	162,786	166	4	2	0,2	0,00	3,010	0,05
VT1		517,681	476,419	544,042	491,228	449,966	517,589	486	43	25	6,4	0,32	98,679	5,02
CVT1C		212,127	153,578	187,588	185,674	127,125	161,135	158	42	24	0,3	0,04	1,686	0,26



**Tabell D.7:** Rådata og beregnede verdier fra aktivitetstestmåling ved 4 °C av katepsin B-lignende enzymer i lammekjøtt fra våren 2014 med 5 % salt i reaksjonsbufferen. Inkuberingstiden var 120 minutter. Blank er intensitetstestmåling for en prøve bestående av 300 µL med like deler av reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet i prøven,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "F" i reaksjonsbuffer, destillert vann og substrat.  $\Delta$  int er gjennomsnittlig endring i intensitet i prøven,  $\sigma$  er standardavviket, SEM er middelfeilen. "F" i prøvekoden indikerer at prøven var fra ferskt lammekjøtt, "S" var fra superkjølt lammekjøtt, "T1" var fra frysst lam tint ved 4 °C, "VT1" var fra frysst lam tint i rennende vann. "C" først i prøvekoden indikerer at prøven er CTF og ikke homogenat. "B" og "C" indikerer hvilken parallell som er brukt. Tall etter "F" og "S" indikerer hvilket uttak prøven er fra. Vekt, volum og mengde protein i ekstrakt er brukt til utregninger, og kan finnes i tabell B.7 i Vedlegg B. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve	Blank	Intensitetstestmåling			Endring i intensitet, $\Delta$ int			$\Delta$ int	$\sigma$	SEM	$\Delta$ int/ (mg protein*)	$\Delta$ int/ (mg protein*)	$\Delta$ int/ (g våtvekt*)	$\Delta$ int/ (g våtvekt*)
		1	2	3	1	2	3				(min)	(min)	(min)	(min)
F1		106,028	124,72	122,854	77,843	96,535	94,669	90	10	5,94	0,8	0,05	18,577	1,23
CF1C		24,594	24,556	24,447	-3,591	-3,629	-3,738	-4	0	0,05	-0,003	3,9E-05	-0,015	0,0002
S1		168,196	151,743	158,952	140,011	123,558	130,767	131	8	4,76	0,9	0,03	26,924	0,98
CS1C		50,214	51,245	47,499	22,029	23,06	19,314	21	2	1,12	0,02	0,0011	0,212	0,011
F2		144,17	117,901	112,679	115,985	89,716	84,494	97	17	9,74	0,7	0,08	19,934	2,01
CF2B		32,401	29,689	29,491	4,216	1,504	1,306	2	2	1,26	0,002	0,0013	0,014	0,008
S2		134,928	176,91	145,982	106,743	148,725	117,797	124	22	12,56	1,3	0,13	25,553	2,58
CS2B		54,106	53,749	53,873	25,921	25,564	25,688	26	0	0,10	0,02	9,5E-05	0,255	0,0010
F3		135,369	138,599	129,973	100,082	103,312	94,686	99	4	2,52	0,8	0,02	20,448	0,52
CF3B		33,525	35,756	34,859	-1,762	0,469	-0,428	-1	1	0,65	-0,001	0,0006	-0,004	0,004
S3		157,499	147,333	137,113	122,212	112,046	101,826	112	10	5,88	1,1	0,06	23,333	1,23
CS3B		61,113	68,394	62,099	25,826	33,107	26,812	29	4	2,28	0,03	0,002	0,383	0,03
T1		192,12	190,844	196,698	164,069	162,793	168,647	165	3	1,78	1,3	0,014	33,611	0,36
CT1C		126,679	103,43	100,853	98,628	75,379	72,802	82	14	8,21	0,11	0,011	1,495	0,15
VT1		177,625	170,451	166,384	149,574	142,4	138,333	143	6	3,29	1,9	0,04	29,108	0,67
CVT1C		92,605	96,951	102,585	64,554	68,9	74,534	69	5	2,89	0,11	0,005	0,740	0,03

I tabellene er standardavviket,  $\sigma$ , funnet ved formelen:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2},$$

der  $N$  er antall målinger av en prøve,  $x_i$  er verdien for økning i intensitet for en parallell og  $\bar{x}$  er gjennomsnittet av alle målinger for en prøve ( $\Delta$  int i tabellene).

SEM (standard error of the mean, middelfeil) i tabeller funnet ved formelen:

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{N}},$$

der  $\sigma$  er standardavviket og  $N$  er antall målinger av en prøve.

I tabellene er  $\Delta$  int/(mg protein\*min), endring i fluorescens-intensitet per mg protein og min, funnet ved:

$$\frac{\Delta \text{ int}}{\text{Volum prøve tatt ut i kyvette [mL]} \cdot \text{inkubasjonstid med substrat [min]} \cdot \text{proteinkonsentrasjon i løsning} \left[ \frac{\text{mg protein}}{\text{mL}} \right]}$$

$\Delta$  int er gitt i tabellene, volum prøve tatt ut i kyvette er 0,1 mL, inkuberingstid med substrat er gitt i tabellene, og proteinkonsentrasjon i løsning er gitt i vedlegg B. For lammekjøtt fra høsten 2013 er proteinkonsentrasjonen gitt i tabell B.4, for lammekjøtt fra våren 2014 er proteinkonsentrasjonen gitt i tabell B.7.

$\Delta$  int/(g våtvekt\*min), endring i fluorescens-intensitet per g våtvekt og min, er funnet ved:

$$\frac{\Delta \text{ int}}{\text{g våtvekt} \cdot \text{inkubasjonstid med substrat [min]}}$$

der  $\Delta \text{ int}$  er gjennomsnittlig økning i intensitet i prøven, som er gitt i tabellene over, inkuberingstiden er gitt i tabellene over og vekt er gitt i de samme tabellene som proteinkonsentrasjonene i vedlegg B.

”SEM,  $\Delta \text{ int} (\dots)$ ” for hver prøve er funnet ved å ta SEM av de tre målingene og gange dette tallet med samme faktorer som gjennomsnittlig økning i intensitet i prøven blir ganget med for å få henholdsvis endring i intensitet per mg protein og minutt og endring i intensitet per g våtvekt og minutt. Ved tegning av grafer for CTF-prøver i hovedteksten, ble ”SEM, økning i intensitet” for paralleller av CTF slått sammen ved å addere i kvadratur og ta kvadratroten av verdien.





## Vedlegg E: Frie aminosyrer

Dette vedlegget utgjør grunnlaget for delkapittel 3.5 i hovedteksten.

Rådata og utregnede verdier for uttak av lammekjøtt fra høsten 2013, samt for fryst/tint lam fra våren 2014, er vist i tabell E.1-20. HPLC-analyse ble utført i 2014 av ingeniør Siri Stavrum. Utregninger er forklart etter tabellene.

***Tabell E.1:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykke av ferskt lam fra uttak 1 fra høsten 2013 (1F1). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utregninger er forklart i teksten.*

Prøve: 1F1	Våtvekt:	10,0609 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	0,5573	0,064	0,005
Glu	129	5,0327	0,649	0,050
Asn	114	1,4374	0,164	0,013
His	137	1,0728	0,147	0,011
Ser	87	3,9788	0,346	0,027
Gln	128	43,4603	5,563	0,432
Gly/Arg	98	32,4678	3,182	0,247
Thr	101	6,0559	0,612	0,047
Ala	71	44,7298	3,176	0,247
Tyr	163	1,1501	0,187	0,015
Aba	85	0,2872	0,024	0,002
Met	131	1,0383	0,136	0,011
Val	99	2,9814	0,295	0,023
Phe	147	1,4182	0,208	0,016
Ile	113	1,7481	0,198	0,015
Leu	113	3,3443	0,378	0,029
Lys	128	3,2628	0,418	0,032
<b>Totalt</b>		154,023	15,747	1,22

*Tabell E.2: Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykke av ferskt lam fra første parallell av uttak 5 fra høsten 2013 (1F5,1). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.*

Prøve: 1F5,1	Våtvekt:	10,2037 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	2,773	0,319	0,024
Glu	129	17,636	2,275	0,174
Asn	114	4,610	0,526	0,040
His	137	3,846	0,527	0,040
Ser	87	17,376	1,512	0,116
Gln	128	46,057	5,895	0,451
Gly/Arg	98	60,643	5,943	0,455
Thr	101	15,989	1,615	0,124
Ala	71	71,362	5,067	0,388
Tyr	163	7,141	1,164	0,089
Aba	85	0,541	0,046	0,004
Met	131	6,871	0,900	0,069
Val	99	14,469	1,432	0,110
Phe	147	7,799	1,146	0,088
Ile	113	9,178	1,037	0,079
Leu	113	17,850	2,017	0,154
Lys	128	17,919	2,294	0,176
<b>Totalt</b>		322,059	33,715	2,581

**Tabell E.3:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykket av ferskt lam fra andre parallell av uttak 5 fra høsten 2013 (1F5,2). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve: 1F5,2	Våtvekt:	10,2037 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	2,9513	0,339	0,026
Glu	129	19,5702	2,525	0,19
Asn	114	4,9604	0,565	0,043
His	137	4,9588	0,679	0,052
Ser	87	18,1206	1,576	0,12
Gln	128	48,5855	6,219	0,48
Gly/Arg	98	64,2589	6,297	0,48
Thr	101	16,1208	1,628	0,12
Ala	71	75,0628	5,329	0,41
Tyr	163	7,4722	1,218	0,093
Aba	85	0,5601	0,048	0,004
Met	131	7,2473	0,949	0,073
Val	99	15,2401	1,509	0,12
Phe	147	8,1666	1,200	0,09
Ile	113	9,8223	1,110	0,08
Leu	113	19,1954	2,169	0,17
Lys	128	19,4341	2,488	0,19
<b>Totalt</b>		341,727	35,850	2,74

**Tabell E.4:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykket av ferskt lam fra tredje parallell av uttak 5 fra høsten 2013 (1F5,3). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.

Prøve: 1F5,3	Våtvekt:	10,2037 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	3,0019	0,345	0,026
Glu	129	19,2018	2,477	0,19
Asn	114	4,8528	0,553	0,042
His	137	4,9459	0,678	0,052
Ser	87	17,6523	1,536	0,12
Gln	128	47,6076	6,094	0,47
Gly/Arg	98	63,5852	6,231	0,48
Thr	101	15,8973	1,606	0,12
Ala	71	74,2158	5,269	0,40
Tyr	163	7,3691	1,201	0,092
Aba	85	0,5264	0,045	0,003
Met	131	7,0625	0,925	0,071
Val	99	15,0297	1,488	0,11
Phe	147	8,2035	1,206	0,09
Ile	113	9,6501	1,090	0,08
Leu	113	18,7308	2,117	0,16
Lys	128	18,6075	2,382	0,18
<b>Totalt</b>		336,140	35,243	2,70

**Tabell E.5:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykket av ferskt lam fra fjerde parallell av uttak 5 fra høsten 2013 (1F5,4). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve: 1F5,4	Våtvekt:	10,2037 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	2,958	0,340	0,026
Glu	129	18,766	2,421	0,185
Asn	114	4,878	0,556	0,043
His	137	4,066	0,557	0,043
Ser	87	17,847	1,553	0,119
Gln	128	47,052	6,023	0,461
Gly/Arg	98	62,573	6,132	0,470
Thr	101	16,098	1,626	0,124
Ala	71	73,492	5,218	0,400
Tyr	163	7,301	1,190	0,091
Aba	85	0,355	0,030	0,002
Met	131	7,068	0,926	0,071
Val	99	14,860	1,471	0,113
Phe	147	8,152	1,198	0,092
Ile	113	9,523	1,076	0,082
Leu	113	18,520	2,093	0,160
Lys	128	18,603	2,381	0,182
<b>Totalt</b>		332,113	34,791	2,664

**Tabell E.6:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykket av ferskt lam fra femte parallell av uttak 5 fra høsten 2013 (1F5,5). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve: 1F5,5	Våtvekt:	10,2037 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	2,934	0,337	0,026
Glu	129	19,289	2,488	0,191
Asn	114	4,702	0,536	0,041
His	137	5,380	0,737	0,056
Ser	87	17,708	1,541	0,118
Gln	128	47,784	6,116	0,468
Gly/Arg	98	64,009	6,273	0,480
Thr	101	16,939	1,711	0,131
Ala	71	75,460	5,358	0,410
Tyr	163	7,599	1,239	0,095
Aba	85	0,392	0,033	0,003
Met	131	7,156	0,937	0,072
Val	99	15,139	1,499	0,115
Phe	147	8,313	1,222	0,094
Ile	113	9,782	1,105	0,085
Leu	113	19,100	2,158	0,165
Lys	128	18,448	2,361	0,181
<b>Totalt</b>		340,135	35,652	2,730

*Tabell E.7: Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykket av ferskt lam fra uttak 8 fra høsten 2013 (1F8). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.*

Prøve: 1F8	Våtvekt:	10,2098 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	4,1187	0,474	0,036
Glu	129	20,4338	2,636	0,202
Asn	114	5,7291	0,653	0,050
His	137	5,8822	0,806	0,062
Ser	87	23,3448	2,031	0,155
Gln	128	38,7023	4,954	0,379
Gly/Arg	98	53,8734	5,280	0,404
Thr	101	19,0148	1,920	0,147
Ala	71	74,7656	5,308	0,406
Tyr	163	7,7086	1,256	0,096
Aba	85	0,4620	0,039	0,003
Met	131	7,6963	1,008	0,077
Val	99	15,5128	1,536	0,118
Phe	147	7,9926	1,175	0,090
Ile	113	10,0001	1,130	0,086
Leu	113	18,8776	2,133	0,163
Lys	128	22,4788	2,877	0,220
<b>Totalt</b>		336,593	35,217	2,69

**Tabell E.8:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av ytterkant av ferskt lam fra uttak 1 fra høsten 2013 (2F1). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve: 2F1	Våtvekt:	10,2281 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	0,47	0,054	0,004
Glu	129	3,83	0,493	0,038
Asn	114	1,36	0,156	0,012
His	137	1,22	0,167	0,013
Ser	87	4,53	0,394	0,030
Gln	128	27,25	3,488	0,266
Gly/Arg	98	36,15	3,543	0,271
Thr	101	5,94	0,600	0,046
Ala	71	42,42	3,012	0,230
Tyr	163	1,62	0,264	0,020
Aba	85	0,29	0,025	0,002
Met	131	1,38	0,181	0,014
Val	99	3,66	0,363	0,028
Phe	147	1,97	0,289	0,022
Ile	113	2,14	0,241	0,018
Leu	113	4,35	0,492	0,038
Lys	128	3,97	0,508	0,039
<b>Totalt</b>		142,561	14,271	1,09



**Tabell E.9:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av ytterkant av ferskt lam fra uttak 5 fra høsten 2013 (2F5). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.

Prøve: 2F5	Våtvekt:	10,1736 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	3,56	0,409	0,031
Glu	129	17,87	2,305	0,177
Asn	114	4,78	0,544	0,042
His	137	4,00	0,548	0,042
Ser	87	17,48	1,521	0,117
Gln	128	45,10	5,772	0,443
Gly/Arg	98	57,46	5,632	0,432
Thr	101	15,35	1,551	0,119
Ala	71	71,33	5,064	0,389
Tyr	163	7,09	1,155	0,089
Aba	85	0,53	0,045	0,003
Met	131	6,74	0,882	0,068
Val	99	14,41	1,427	0,110
Phe	147	7,58	1,114	0,086
Ile	113	9,17	1,037	0,080
Leu	113	17,83	2,015	0,155
Lys	128	17,97	2,300	0,177
<b>Totalt</b>		318,25	33,322	2,56

**Tabell E.10:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av ytterkant av ferskt lam fra uttak 7 fra høsten 2013 (2F7). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve: 2F7	Våtvekt:	10,3898 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	3,427	0,394	0,030
Glu	129	20,363	2,627	0,198
Asn	114	5,053	0,576	0,043
His	137	4,644	0,636	0,048
Ser	87	20,362	1,772	0,133
Gln	128	30,212	3,867	0,291
Gly/Arg	98	68,735	6,736	0,507
Thr	101	17,561	1,774	0,133
Ala	71	67,000	4,757	0,358
Tyr	163	7,028	1,146	0,086
Aba	85	0,738	0,063	0,005
Met	131	6,954	0,911	0,068
Val	99	14,533	1,439	0,108
Phe	147	7,760	1,141	0,086
Ile	113	9,660	1,092	0,082
Leu	113	18,110	2,046	0,154
<b>Totalt</b>		302,140	30,975	2,33

**Tabell E.11:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykket av superkjølt lam fra uttak 1 fra høsten 2013 (1M1). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.

Prøve: 1M1	Våtvekt:	10,112 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	0,5828	0,067	0,01
Glu	129	4,0837	0,527	0,04
Asn	114	1,6630	0,190	0,01
His	137	1,5995	0,219	0,02
Ser	87	6,5904	0,573	0,04
Gln	128	26,9683	3,452	0,27
Gly/Arg	98	41,1082	4,029	0,31
Thr	101	8,5523	0,864	0,07
Ala	71	48,5028	3,444	0,27
Tyr	163	2,0657	0,337	0,03
Aba	85	0,2315	0,020	0,00
Met	131	1,8115	0,237	0,02
Val	99	4,3903	0,435	0,03
Phe	147	2,2311	0,328	0,03
Ile	113	2,8640	0,324	0,03
Leu	113	5,4960	0,621	0,05
Lys	128	5,0442	0,646	0,05
<b>Totalt</b>		163,785	16,311	1,26

*Tabell E.12: Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykket av superkjølt lam fra uttak 5 fra høsten 2013 (1M5). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.*

Prøve: 1M5	Våtvekt:	10,1986 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	0,924	0,106	0,01
Glu	129	5,267	0,679	0,04
Asn	114	2,356	0,269	0,01
His	137	2,006	0,275	0,02
Ser	87	8,161	0,710	0,04
Gln	128	56,346	7,212	0,27
Gly/Arg	98	57,286	5,614	0,31
Thr	101	8,496	0,858	0,07
Ala	71	54,055	3,838	0,27
Tyr	163	2,845	0,464	0,03
Aba	85	0,407	0,035	0,00
Met	131	2,547	0,334	0,02
Val	99	5,316	0,526	0,03
Phe	147	2,806	0,413	0,03
Ile	113	3,556	0,402	0,03
Leu	113	7,174	0,811	0,05
Lys	128	6,460	0,827	0,05
<b>Totalt</b>		226,008	23,372	1,790

**Tabell E.13:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykket av superkjølt lam fra uttak 8 fra høsten 2013 (1M8). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.

Prøve: 1M8	Våtvekt:	10,1986 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	0,6619	0,076	0,006
Glu	129	8,9341	1,153	0,088
Asn	114	1,9596	0,223	0,017
His	137	1,6698	0,229	0,018
Ser	87	8,1634	0,710	0,054
Gln	128	81,5758	10,442	0,800
Gly/Arg	98	30,9928	3,037	0,233
Thr	101	9,3000	0,939	0,072
Ala	71	55,3738	3,932	0,301
Tyr	163	2,7619	0,450	0,034
Aba	85	0,9057	0,077	0,006
Met	131	2,6938	0,353	0,027
Val	99	5,9962	0,594	0,045
Phe	147	2,9556	0,434	0,033
Ile	113	3,8032	0,430	0,033
Leu	113	8,0135	0,906	0,069
Lys	128	7,1373	0,914	0,070
<b>Totalt</b>		232,898	24,898	1,90

*Tabell E.14: Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av midtstykke av superkjølt lam fra uttak 11 fra høsten 2013 (1M11). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.*

Prøve: 1M11	Våtvekt:	10,063 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	0,5841	0,067	0,005
Glu	129	8,6364	1,114	0,086
Asn	114	2,5216	0,287	0,022
His	137	2,2609	0,310	0,024
Ser	87	11,0243	0,959	0,074
Gln	128	28,3883	3,634	0,282
Gly/Arg	98	60,2101	5,901	0,458
Thr	101	10,3743	1,048	0,081
Ala	71	47,7391	3,389	0,263
Tyr	163	3,6729	0,599	0,046
Aba	85	0,4162	0,035	0,003
Met	131	3,7107	0,486	0,038
Val	99	8,5976	0,851	0,066
Phe	147	4,2646	0,627	0,049
Ile	113	5,1162	0,578	0,045
Leu	113	10,9300	1,235	0,096
Lys	128	9,4319	1,207	0,094
<b>Totalt</b>		217,879	22,328	1,73

**Tabell E.15:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av ytterkant av superkjølt lam fra uttak 1 fra høsten 2013 (1Y1). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve: 1Y1	Våtvekt:	10,0746 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	0,534	0,061	0,005
Glu	129	4,083	0,527	0,041
Asn	114	1,815	0,207	0,016
His	137	1,642	0,225	0,017
Ser	87	7,030	0,612	0,047
Gln	128	30,899	3,955	0,307
Gly/Arg	98	41,148	4,033	0,313
Thr	101	8,632	0,872	0,068
Ala	71	48,481	3,442	0,267
Tyr	163	2,193	0,357	0,028
Aba	85	0,305	0,026	0,002
Met	131	2,151	0,282	0,022
Val	99	4,829	0,478	0,037
Phe	147	2,427	0,357	0,028
Ile	113	3,096	0,350	0,027
Leu	113	6,059	0,685	0,053
Lys	128	5,779	0,740	0,057
<b>Totalt</b>		171,101	17,207	1,334

*Tabell E.16: Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av ytterkant av superkjølt lam fra uttak 5 fra høsten 2013 (1Y5). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.*

Prøve: 1Y5	Våtvekt:	10,0677 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	1,062	0,122	0,009
Glu	129	10,050	1,296	0,101
Asn	114	3,402	0,388	0,030
Ser	87	10,241	0,891	0,069
Gln	128	79,622	10,192	0,791
Gly/Arg	98	61,170	7,830	0,608
Thr	101	10,540	1,033	0,080
Ala	71	62,004	6,262	0,486
Tyr	163	3,342	0,237	0,018
Aba	85	0,526	0,086	0,007
Met	131	2,920	0,248	0,019
Val	99	6,133	0,803	0,062
Phe	147	3,396	0,336	0,026
Ile	113	4,254	0,625	0,049
Leu	113	8,496	0,960	0,075
Lys	128	9,030	1,020	0,079
<b>Totalt</b>		276,186	32,330	2,509



*Tabell E.17: Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av ytterkant av superkjølt lam fra uttak 8 fra høsten 2013 (1Y8). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.*

Prøve: 1Y8	Våtvekt:	10,1927 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	1,139	0,131	0,010
Glu	129	8,864	1,143	0,088
Asn	114	2,599	0,296	0,023
His	137	2,346	0,321	0,025
Ser	87	10,149	0,883	0,068
Gln	128	55,084	7,051	0,540
Gly/Arg	98	44,884	4,399	0,337
Thr	101	9,482	0,958	0,073
Ala	71	47,693	3,386	0,260
Tyr	163	3,386	0,552	0,042
Aba	85	0,783	0,067	0,005
Met	131	3,422	0,448	0,034
Val	99	7,444	0,737	0,056
Phe	147	3,828	0,563	0,043
Ile	113	4,632	0,523	0,040
Leu	113	9,769	1,104	0,085
Lys	128	9,034	1,156	0,089
<b>Totalt</b>		224,538	23,718	1,82

*Tabell E.18: Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av ytterkant av superkjølt lam fra uttak 11 fra høsten 2013 (1Y11). Se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten for når uttaket ble foretatt etter slakt. Utrekninger er forklart i teksten.*

Prøve: 1Y11	Våtvekt:	10,1353 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	1,070	0,123	0,009
Glu	129	12,932	1,668	0,129
Asn	114	3,965	0,452	0,035
His	137	3,057	0,419	0,032
Ser	87	14,669	1,276	0,098
Gln	128	51,745	6,623	0,511
Gly/Arg	98	83,240	8,158	0,629
Thr	101	15,283	1,544	0,119
Ala	71	91,211	6,476	0,499
Tyr	163	7,251	1,182	0,091
Aba	85	1,823	0,155	0,012
Met	131	5,454	0,714	0,055
Val	99	18,096	1,791	0,138
Phe	147	9,168	1,348	0,104
Ile	113	13,050	1,475	0,114
Leu	113	26,454	2,989	0,230
Lys	128	4,279	0,548	0,042
<b>Totalt</b>		362,748	36,941	2,847

**Tabell E.19:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av fryst lam tint ved 4 °C fra våren 2014 (T1). Se delkapittel 2.3 for mer informasjon om kjøttet..

Utrekninger er forklart i teksten.

Prøve: T1	Våtvekt:	10,2377 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/ mL	mg frie aminosyrer/ g våtvekt
Asp	115	0,259	0,030	0,002
Glu	129	3,112	0,401	0,031
Asn	114	1,495	0,170	0,013
His	137	1,933	0,265	0,020
Ser	87	5,244	0,456	0,035
Gln	128	48,161	6,165	0,470
Gly/Arg	98	81,290	7,966	0,608
Thr	101	5,428	0,548	0,042
Ala	71	53,297	3,784	0,289
Tyr	163	2,081	0,339	0,026
Aba	85	0,206	0,017	0,001
Met	131	1,983	0,260	0,020
Val	99	3,800	0,376	0,029
Phe	147	2,623	0,386	0,029
Ile	113	2,879	0,325	0,025
Leu	113	5,125	0,579	0,044
Lys	128	4,386	0,561	0,043
<b>Totalt</b>		223,299	22,630	1,727

**Tabell E.20:** Rådata og beregnede verdier for mengde frie aminosyrer fra HPLC-analyse av fryst lam tint i rennende vann fra våren 2014 (VT1). Se delkapittel 2.3 for mer informasjon om kjøttet. Utregninger er forklart i teksten.

Prøve: VT1	Våtvekt:	10,2661 g		
Aminosyre	Molarvekt når bundet i protein [g/mol]	µmol frie aminosyrer/L	µg frie aminosyrer/mL	mg frie aminosyrer/g våtvekt
Asp	115	0,834	0,096	0,007
Glu	129	7,495	0,967	0,074
Asn	114	2,190	0,250	0,019
His	137	1,776	0,243	0,019
Ser	87	9,280	0,807	0,061
Gln	128	44,248	5,664	0,431
Gly/Arg	98	53,344	5,228	0,398
Thr	101	7,829	0,791	0,060
Ala	71	54,400	3,862	0,294
Tyr	163	3,413	0,556	0,042
Aba	85	0,212	0,018	0,001
Met	131	2,908	0,381	0,029
Val	99	5,075	0,502	0,038
Phe	147	3,854	0,567	0,043
Ile	113	4,155	0,469	0,036
Leu	113	8,185	0,925	0,070
Lys	128	6,381	0,817	0,062
<b>Totalt</b>		215,580	22,143	1,685

I tabellene er  $\mu\text{mol}$  frie aminosyrer/L (konsentrasjon, molbasis) funnet ved hjelp av HPLC-analyse, etter klargjøring som beskrevet i avsnitt 2.8 i hovedteksten. Molvekten (Mm) [g/mol] for aminosyrene er kjent. Antall  $\mu\text{g}$  frie aminosyrer (konsentrasjon, vektbasis) som finnes i én mL av den fortynnete prøven sendt til HPLC-analyse finnes ved:

$$\frac{\text{Molvekt} \left[ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \cdot \text{konsentrasjon, molbasis} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right]}{1000} = \text{konsentrasjon, vektbasis} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] \quad (\text{E.1})$$

Antall mg frie aminosyrer som var i opprinnelig kjøttstykke finnes ved:

$$\frac{\text{Konsentrasjon, vektbasis} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] \cdot \text{Volum homogenat tillaget} [\text{mL}] \cdot \text{fortynningsfaktor}}{\text{våtvekt, kjøtt innveid} [\text{g}]}, \quad (\text{E.2})$$

der fortynningsfaktoren er faktoren homogenatet fortynnes for analyse på HPLC.

Fortynningen i denne oppgaven var:

$$\left( \frac{1 \text{ mL ekstrakt}}{1 \text{ mL ekstrakt} + 0,25 \text{ mL sulfosalisylysyre}} \right)^2 \cdot \frac{1}{20} = 0,032, \quad (\text{E.3})$$

der tallene er hentet fra avsnitt 2.8 i hovedteksten.

$$\text{Fortynningsfaktoren var dermed } \frac{1}{0,032} = \underline{31,25}$$

Feilen i metoden ble funnet ved å analysere fem paralleller av ferskt lammekjøtt fra uttak 5. Her ble det tatt gjennomsnitt av verdiene for total mengde aminosyrer. Deretter ble middelfeilen (SEM) funnet. Feilen i metoden ble sagt å være prosentandelen SEM utgjorde av gjennomsnittet.

SEM ble funnet ved:

$$\text{SEM} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{N}}, \quad (\text{E.4})$$

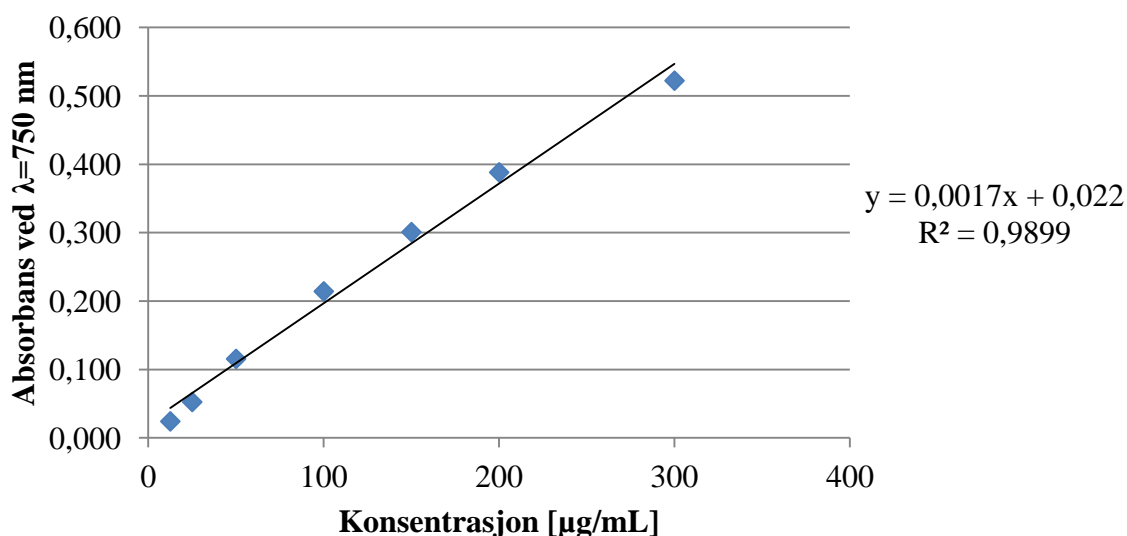
der  $N$  er antall målinger av en prøve,  $x_i$  er verdien for økning i intensitet for en parallell og  $\bar{x}$  er gjennomsnittet av alle målinger for en prøve.

## Vedlegg F: Syreløselige peptider

I dette vedlegget er resultater fra analyser med Lowry—metoden (Lowry et al., 1951) presentert. Vedlegget gir grunnlaget for avsnitt 3.6 i hovedteksten. I tabell F.1 er rådata for absorbansmålinger for bovint serum albumin (BSA) med kjent konsentrasjon presentert. Målingene ble gjort i forbindelse med homogenater av lammekjøtt tillaget høsten 2013. Uttakene ble gjort tiden etter slakt og superkjøling som gitt i tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten. Tilhørende standardkurve for uttak 1, 8 og 11 kan sees i figur F.1. Analysene ble utført våren 2014 av praktikant Caroline D. Høyen.

**Tabell F.1:** Absorbansmålinger ved bølgelengde 750 nm for løsninger av BSA med kjente konsentrasjoner gjort i forbindelse med analyser av lammekjøtt ekstrakter fra høsten 2013 våren 2014. Tilhørende ligning for resulterende standardkurve, samt  $R^2$ -verdi er også presentert. Ligning og  $R^2$ -verdi er funnet ved lineær regresjon i Microsoft Excel.  $y$  er konsentrasjon,  $x$  er absorbans.

Uttak	Konsentra- sjon [µg/mL]	Absorbans ved 750 nm			Gjennom- snitt	Standardligning og $R^2$ -verdi
		1	2	3		
1, 8, 11 (unntatt fersk midt- stykke uttak 8)	12,5	0,026	0,025	0,022	0,024	$y = 0,0017 \cdot x + 0,022$ $R^2 = 0,9899$
	25	0,049	0,054	0,055	0,053	
	50	0,110	0,113	0,124	0,116	
	100	0,214	0,211	0,218	0,214	
	150	0,31	0,298	0,295	0,301	
	200	0,379	0,394	0,392	0,388	
	300	0,523	0,521	0,523	0,522	
5, 7 og fryst/tint	12,5	0,041	0,041	0,039	0,040	$y = 0,002 \cdot x + 0,0319$ $R^2 = 0,9961$
	25	0,073	0,073	0,075	0,074	
	50	0,136	0,134	0,142	0,137	
	100	0,251	0,254	0,25	0,252	
	150	0,336	0,347	0,346	0,343	
	200	0,429	0,439	0,435	0,434	
	300	0,62	0,618	0,622	0,620	
Fersk midt- stykke uttak 8	12,5	0,029	0,032	0,034	0,032	$y = 0,0017 + 0,0266$ $R^2 = 0,9918$
	25	0,06	0,057	0,062	0,060	
	50	0,122	0,122	0,118	0,121	
	100	0,216	0,179	0,22	0,205	
	150	0,307	0,321	0,317	0,315	
	200	0,379	0,371	0,38	0,377	
	300	0,556	0,517	0,511	0,528	



**Figur F.1:** Standardkurve for konsentrasjon mot absorbans med tilhørende ligning og  $R^2$ -verdi. Verdier er gitt i tabell F.1, og ble funnet i forbindelse med analyser av uttak 1, 8 og 11 fra lammekjøtt høsten 2013.

Rådata og utregnede verdier for prøver fra lammekjøtt høsten 2013 og fryst/tint lammekjøtt fra våren 2014 er presentert i tabell F.2. Konsentrasjonene er funnet ved hjelp av standardligningene i tabell F.1. I tabellen er for eksempel konsentrasjonen av parallell 1 av prøve ”1F1”, første uttak av ferskt midtstykke, funnet ved hjelp av standardligningen for uttak 1 i tabell F.1 som:

$$y = 0,0017 \cdot x + 0,022, \text{ som vil si:}$$

$$\text{Målt absorbans} = 0,0017 \cdot \text{konsentrasjon} + 0,022 \quad (\text{F.1})$$

Ligning (F.1) kan omgjøres til:

$$\text{Konsentrasjon} = \frac{\text{Målt absorbans} - 0,022}{0,0017} \quad (\text{F.2})$$

Fra ligning (F.2) får en at:

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasjon i prøve 1F1, parallell 1} &= \frac{0,247 - 0,022}{0,0017} \\ &= 239,484 \text{ (uten avrundningene)} \end{aligned} \quad (\text{F.3})$$



Resten av konsentrasjonene i tabellene er funnet på tilsvarende måte som i ligning F.2, men ut fra standardligningen til tilhørende uttak. For å finne mengde protein som g protein per g våtvekt av opprinnelig prøve, er gjennomsnittet av konsentrasjonene i parallellene ganget med faktoren for hvor mye prøven er fortynnet, samt med volum i mL av opprinnelig prøve. Volumet i mL av opprinnelig prøve er 25 mL, se vedlegg B, tabell B.4. Det er deretter delt på våtvekten av opprinnelig prøve. For å finne mengde protein i løsning som % av våtvekt, er verdien for g protein per g våtvekt ganget med 100.

Standardavviket,  $\sigma$ , er funnet ved:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} , \quad (\text{F.4})$$

der  $N$  er antall målinger av en prøve,  $x_i$  er verdien for konsentrasjonen for en parallell og  $\bar{x}$  er gjennomsnittet av alle målinger for en prøve.

SEM (standard error of the mean, middelfeilen) er funnet ved formelen:

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} , \quad (\text{F.5})$$

der  $\sigma$  er standardavviket og  $N$  er antall målinger av en prøve. ”SEM, protein i løsning” er funnet ved å gange SEM med samme faktorer som gjennomsnittet ble ganget med for å få ”protein i løsning” med enhet mg/g våtvekt

**Tabell F.2:** Rådata og beregnede verdier fra Lowry-metoden for lammekjøtt fra høsten 2013. "1F" i prøvekoden indikerer at prøven er fra ferskt midtstykke, "2F" er fra fersk ytterkant, "1M" er fra superkjølt midtstykke og "1Y" er fra superkjølt ytterkant. "T1" og "VT1" er fra fryst lam fra våren 2014 tint henholdsvis ved 4 °C og i rennende vann. "M" og "Y" indikerer hvilket uttak prøven er fra, se tabell 2.1.1 i delkapittel 2.1 i hovedteksten. Standardligninger for utregninger er hentet fra tabell F.1.

Prøve	Fortynningsfaktor	Absorbans ved 750 nm			Konsentrasjon [ $\mu\text{g/mL}$ ]			Gjennomsnitt * fortynningsfaktor	SD	SEM	Protein i løsning [mg/g våtvekt]	SEM, protein i løsning
		1	2	3	1	2	3					
1F1	2	0,247	0,237	0,231	239,484	241,220	242,262	481,978	1,404	0,810	1,198	0,004
2F1	2	0,280	0,270	0,269	233,754	235,490	235,664	469,938	1,056	0,610	1,149	0,003
1M1	2	0,298	0,278	0,290	230,628	234,101	232,017	464,497	1,748	1,009	1,148	0,005
1Y1	2	0,299	0,493	0,321	230,454	196,767	226,634	435,903	18,446	10,650	1,082	0,053
1F5	2	0,530	0,540	0,532	248,734	253,727	249,732	501,462	2,642	1,526	1,229	0,007
2F5	2	0,525	0,535	0,536	246,237	251,230	251,730	499,465	3,037	1,754	1,227	0,009
1M5	2	0,346	0,397	0,375	156,855	182,322	171,336	340,342	12,773	7,375	0,834	0,036
1Y5	2	0,336	0,335	0,343	151,862	151,363	155,357	305,721	2,177	1,257	0,759	0,006
2F7	2	0,476	0,482	0,479	221,769	224,765	223,267	446,535	1,498	0,865	1,074	0,004
T1	2	0,350	0,348	0,377	158,853	157,854	172,335	326,028	8,088	4,669	0,796	0,023
VT1	2	0,355	0,351	0,338	161,349	159,352	152,861	315,708	4,438	2,562	0,769	0,012
1F8	10	0,141	0,143	0,156	257,890	257,543	255,286	2569,064	1,414	0,817	6,291	0,020
1M8	2	0,363	0,378	0,396	219,341	216,736	213,611	433,125	2,869	1,656	1,062	0,008
1Y8	2	0,417	0,426	0,440	209,964	208,401	205,970	416,223	2,013	1,162	1,021	0,006
1M11	2	0,434	0,454	0,468	207,012	203,539	201,108	407,773	2,967	1,713	1,013	0,009
1Y11	2	0,449	0,466	0,486	204,407	201,455	197,982	402,563	3,216	1,857	0,993	0,009