



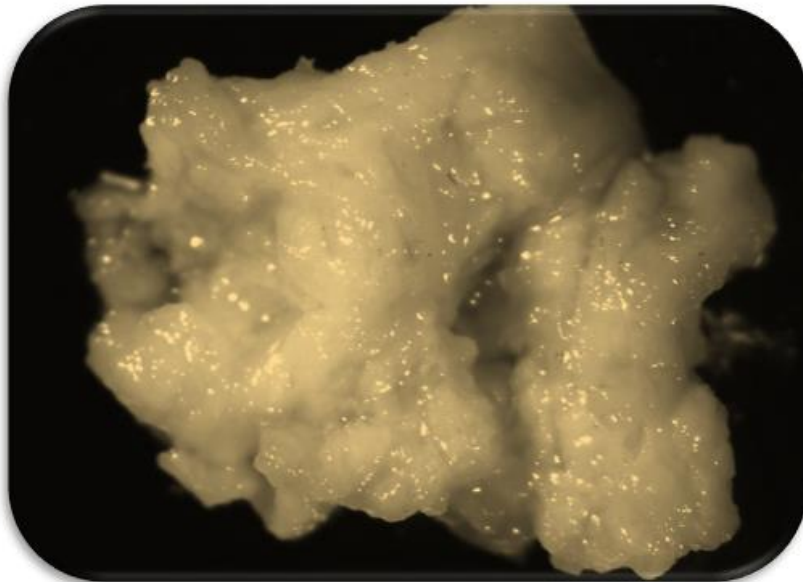
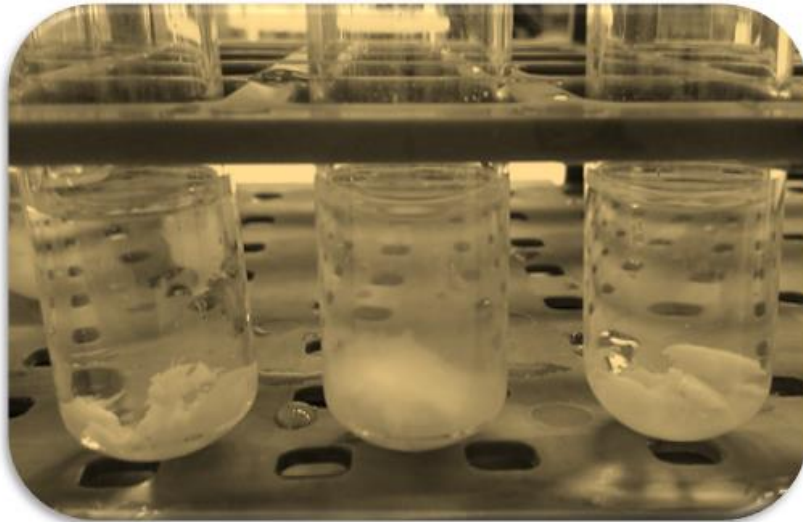
Universitetet  
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

## MASTEROPPGAVE

Studieprogram/spesialisering: Biologisk kjemi	Høst 2014 - vår 2015 Åpen / <del>Konfidensiell</del>
Forfatter: Emilie Thori Lima	..... (signatur forfatter)
Fagansvarlig: Peter Ruoff Veileder(e): Line Bach Christensen og Dagbjørn Skipnes	
Tittel på masteroppgaven: Varmeindusert denaturering og proteolytisk nedbrytning av collagen og bindevev i oksehøyrygg ( <i>Trapezius</i> ) under LTLT-behandling Engelsk tittel: Heat induced denaturation and proteolytic degradation of collagen and connective tissue in bovine <i>Trapezius</i> during LTLT treatment	
Studiepoeng: 60	
Emneord: LTLT-behandling Bindevev Collagen Collagenase Actinidin	Sidetall: 41 + vedlegg/annet: 4  Stavanger, 12. juni 2015

Varmeindusert denaturering og proteolytisk nedbrytning av collagen og bindevev i oksehøyrygg (*Trapezius*) under LTLT-behandling



## SAMMENDRAG

Kjøttets mørhet betraktes ofte som den viktigste sensoriske faktoren i kunders vurdering av kvalitet. Ved varmebehandling på lav temperatur over et lengre tidsrom, LTLT-behandling, vil kjøttet bli mørere samtidig som at saftighet bevares i større grad i forhold til ved tradisjonell behandling ved høyere temperaturer. En viktig bidragsyter til seighet i kjøtt er collagenet i bindevevet og dets kvalitet.

Denatureringen av collagen avhenger hovedsakelig av temperatur og skjer normalt mellom 53°C og 63°C i muskler fra storfe. Ved videre varmebehandling vil collagenet løses opp og gelatinere, noe som vil bidra til økt mørhet i kjøtt. Det er også vist at behandling ved temperaturer helt ned til 50°C også kan indusere denaturering dersom behandlingstiden utvides tilstrekkelig. Samtidig er det vist at kjøttets mørhet øker betraktelig mellom 50°C og 65°C. Graden av varmeindusert denaturering av collagen avhenger også av kryssbindingenes kvalitet, der varmelabile bindinger finnes mest i ungdyr og brytes lettere enn varmestabile bindinger i eldre dyr. Collagenase, et naturlig enzym i sarcoplasma i musklene, angriper collagen spesifikt og kan indusere mer effektiv nedbrytning av collagen ved temperaturer opp til 60°C.

Ved tilstedeværelse av proteolytiske enzymer observeres en tilleggseffekt på oppløsningen av collagen under LTLT-betingelser. Proteolytiske enzymer påvirker collagenets struktur ved å spalte peptidbindinger og kan dermed øke effekten av varmebehandlingen på bindevevet. Proteolytiske enzymer fra frukt har også vist evne til å bryte ned collagen i bindevev, deriblant actinidin fra kiwi.

I dette studiet ble effekten av LTLT-behandling på denaturering av collagen fra oksehøyrygg (*Trapezius*) studert ved tilstedeværelse av collagenase og actinidin. Prøver med kombinasjoner av rent og isolert bindevev og ren og opprenset collagenase ble langtidsvarmebehandlet ved 50°C, 55°C og 60°C i 1, 6 og 24 timer. Bestemmelse av proteinkonsentrasjon og mengde oppløst collagen, i tillegg til zymografiske analyser, gav et inntrykk av collagenaseaktiviteten og effekten av varme og collagenase på denatureringen av collagen. Effekten av forhåndsmarinering i actinidin i 24 timer og LTLT-behandling ved 50°C, 60°C og 90°C i 1 og 24 timer på oppløsningen av collagen i bindevev ble også bestemt, og bindevevet ble studert i stereolupe.

Oppløsningen av rent collagen og collagen i bindevev ble under LTLT-behandlingen påvirket av temperatur, behandlingstid og tilstedeværelse av collagenase. Kombinasjonen av varme og collagenaseaktivitet førte til tilleggseffekter på oppløsningen av collagen. Mangel på flere og mer signifikante tilleggseffekter kan skyldes inhibitorer, redusert affinitet mellom enzymet og substratet, fysiske hindringer i bindevevet eller metodiske årsaker. Resultatene gav indikasjoner på at behandlingene ved 55°C i 24 timer gav mest effekt på collagenoppløsningen. Denatureringstemperaturen til collagen er i dette studiet sannsynligvis redusert på grunn av at bindingene er mer eksponert for påvirkning i rent collagen eller isolert bindevev sammenlignet med behandling av helt kjøtt.

Begge actinidinvariantene viste signifikant effekt på oppløsningen av collagen i isolert bindevev, men resultatene indikerte at OT1005X hadde større effekt enn KFP. Tilleggseffekten på oppløsningen av collagen var tydeligst etter 1 time ved 50 og 60 graders behandling. Mangel på flere signifikante tilleggseffekter skyldes trolig metodiske årsaker. Studiet av bindevev i lupe avslørte at forhåndsmarinering i OT1005X og behandling ved 60°C i 24 timer sannsynligvis førte til det mørreste bindevevet.

## FORORD

Det var en gang, østenfor Sverd i fjell og vestenfor Sørmarka, en liten landsbygd. Bygda var alltid full av liv og røre, livlige folk, dyr av alle slag og gode lukter av både nyklipt gress og svidd kjøtt. Innbyggerne der var svært glad i mat, og de levde godt av jorda de dyrka og av dyra de eide. Men én dag oppdaget innbyggerne at matlagene begynte å bli tomme, spesielt for kjøtt. Landsbygda ble forferdet over oppdagelsen og fryktet syv magre år i vente.

Så hendte det at odelsjenta fra nedi lia skulle bestemme seg for hva hun denne gangen skulle fordype seg i ved landsbygdas slott på toppen av Ullandhaug. Hun ble tilbudt et oppdrag hos Nofima, en gjeng usedvanlig kjekke mennesker som var ekstra glad i kjøtt og fisk, og hun bestemte seg for å takke ja til tilbudet om å utforske løsningen på landsbygdas matmangel. Nofima mente nemlig at kjøttet fra dyra kunne utnyttes bedre dersom det ble behandlet på rett måte.

I løpet av høsten lærte jenta om kjøttets oppbygning og hvordan de ulike delene reagerte på varme. Det ble gjennomført flere tester på kjøtt i de bortgjemte, hemmelige laboratoriene til Nofima, og flere lange og mørke høst- og vinterdager ble tilbrakt her. Fullmånen måtte vise seg hele seks ganger før arbeidet var kommet til veis ende. Heldigvis hadde Den Vennlige Sjelen kommet ridende på sønnavinden hele veien fra nabolandet i sør for å tilby jenta rettledning på veien.

Da våren endelig var kommet begynte jenta å se lyst på fremtiden, i tro om at hun kunne bidra til å hindre de syv magre årene landsbygda hadde i vente. Etter enda fire fullmåner, fem forkjølelser for mye, store mengder sort blekk, og enda mer rødt blekk, ørten kopper ingefærte og hint og inspirasjon fra Vismannen fra Nidaros, Den Vennlige Sjelen fra sør og deres venner, var funnene endelig nedskrevet på Kongens pergamentrull. Jenta syntes det hun hadde lært var svært interessant og oppfordret alle i landsbygda til å gjøre som hun hadde funnet. Den magre tiden lot vente på seg, og innbyggerne i landsbygda levde lykkelige og mette, i hvert fall de neste syv årene.

Jenta takker alle motivatorer og inspiratorer for god hjelp og veiledning på laboratoriet, på kontoret og via Kongens (Peter Ruoff) brevduer. En spesiell takk rettes til Den Vennlige Sjelen fra sør (Line Bach Christensen) og Vismannen fra Nidaros (Dagbjørn Skipnes) for at de gav jenta innblikk i en svært interessant verden full av muligheter hun før ikke visste om. Jenta takker også for fem flotte år på Ullandhaugs slott (Universitetet i Stavanger) og avslutter eventyret med å levere inn sitt siste arbeid på Kongens pergamentrull (Masteroppgaven).

## INNHALDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	I			
FORORD	II			
1	INTRODUKSJON	1		
2	TEORI	3		
	2.1	LTLT-behandling av kjøtt	3	
	2.2	Påvirkning av varme på mørhet	5	
	2.3	Proteolytiske enzymer og deres effekt på mørning av kjøtt	7	
3	METODEBESKRIVELSE	10		
	3.1	LTLT-behandling med collagenase	10	
		3.1.1	Isolering av bindevev	10
		3.1.2	Opprensing av collagenase	10
		3.1.3	Enzymaktivitet i ren og opprenset collagenase	11
		3.1.4	LTLT-behandling	11
		3.1.5	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon	12
		3.1.6	Bestemmelse av mengde oppløst collagen	12
		3.1.7	Zymografi	13
	3.2	Marinering i actinidin og LTLT-behandling	13	
		3.2.1	Marinering i actinidin	13
		3.2.2	LTLT-behandling	14
		3.2.3	Bestemmelse av mengde oppløst collagen	14
		3.2.4	Studie av marinert og LTLT-behandlet bindevev med lupe	14
	3.3	Statistikk	14	
4	RESULTATER	15		
	4.1	LTLT-behandling med collagenase	15	
		4.1.1	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon	15
		4.1.2	Bestemmelse av mengde oppløst collagen	17
		4.1.3	Zymografi	18
	4.2	Marinering i actinidin og LTLT-behandling	20	
		4.2.1	Bestemmelse av mengde oppløst collagen	20
		4.2.2	Studie av marinert og LTLT-behandlet bindevev med lupe	21
5	DISKUSJON	26		
	5.1	LTLT-behandling med collagenase	26	
	5.2	Marinering i actinidin og LTLT-behandling	33	
6	KONKLUSJON	37		
7	LITTERATURLISTE	38		
APPENDIX		i		
	APPENDIX 1: Kombinasjonsoversikt	i		
	APPENDIX 2: Determination of collagenase activity	ii		
	APPENDIX 3: Determination of proteinase activity by digestion of gelatin	iv		
	APPENDIX 4: Produktinformasjon om collagenase	vi		

# 1 INTRODUKSJON

Bærekraft er et sentralt og uunngåelig tema i en verden hvor en minkende ressursmengde må fordeles på et kontinuerlig økende antall konsumenter. En verden preget av populasjonsvekst, urbanisering og høyere inntekter fører til økt etterspørsel av ressurser (Bradford, 1999; van der Zijpp, 1999). Animalske produkter som kjøtt er en viktig kilde for å dekke essensielle næringsbehov. Forskning gjort på barn i Mexico, Egypt og Øst-Afrika viser en sterk positiv korrelasjon mellom mengden animalske produkter i kostholdet og mental og fysisk utvikling (Calloway et al., 1988; Murphy og Allen, 1997). Verdens kjøttforbruk økte rundt 15 kg mellom 1961 og 2003 til omkring 40 kg per innbygger per år. Norge isolert sett hadde i samme periode en økning på over 30 kg opp til omkring 60 kg per innbygger per år (Brunvoll et al., 2009). I 2013 var forbruket på 76 kg per innbygger (Anonym, 2015).

Én måte å øke ressursmengden på, for at også videre generasjoner skal kunne ha tilgang på tilstrekkelige mengder kjøtt, er bedret utnyttelse av dyret. Kjøtt fra eldre dyr og enkelte deler av yngre dyr er i utgangspunktet for seigt til å kunne brukes direkte. I Norge gjøres en større andel av det seige kjøttet om til kjøttdeig enn i for eksempel Danmark og Sverige. Riktig prosessering og utnyttelse av hver muskel kan føre til økt tilfredsstillelse, bærekraft og verdiskapning, da bøndene kan dra nytte av hele dyret.

Mørhet antas oftest som den høyest verdsette faktoren hos kundene, etterfulgt av smak og saftighet, i vurderinger av kjøttets kvalitet (Boleman et al., 1997; Koochmaraie et al., 1995). Studier av Boleman et al. (1997) og Miller et al. (2001) viste at konsumentene klarte å skille mellom varmebehandlet oksekjøtt med ulike mørhetsgrader, og at de var villige til å betale mer for garantert mørkt kjøtt enn for kjøtt av lavere kvalitet. Mørhet i kjøtt er en funksjon av produksjon, prosessering, foredling og tilberedning for kunders konsum, og riktig behandling i alle disse leddene er avgjørende for sluttresultatet (Thompson, 2002).

En tilberedningsmetode av kjøtt som får mer og mer oppmerksomhet er LTLT-behandling, der kjøtt varmebehandles på lavere temperatur over et lengre tidsrom enn normalt. Cover (1937) rapporterte at varmebehandling av roastbiff og høyrygg fra okse ved 124°C i ovn ga mørere kjøtt enn ved 225°C. Bramblett et al. (1959) fant at 63°C varmebehandling i ovn av flere muskler fra okse gav mørere kjøtt enn ved 68°C. Christensen, Ertbjerg et al. (2011) fant en økning i mørhet og mengde oppløst collagen i *Longissimus dorci* og *Semitendinosus* fra svin behandlet i vannbad mellom 53 og 58°C. I dag er det normalt med LTLT-behandling av kjøtt på temperaturer mellom 50 og 65°C fra noen timer til flere døgn (Christensen, Bertram et al., 2011). En fordel ved disse lave temperaturene er at saftigheten i kjøttet opprettholdes bedre enn ved tradisjonell tilberedning på grunn av redusert koketap (Aaslyng et al., 2003; Bendall og Restall, 1983; Vaudagna et al., 2002).

Graden av mørhet i ferskt kjøtt påvirkes av flere faktorer, der post mortem-proteolyse, intramuskulært fett, muskelens kontraksjonstilstand og bindevev regnes som de viktigste (Belew et al., 2003). Ved varmebehandling av kjøtt er det hovedsakelig to faktorer som bidrar i morningsprosessen; bindevev og muskelfibre, der bindevevet hovedsakelig bidrar ved LTLT-temperaturer. Bindevev, bestående hovedsakelig av collagen, omslutter, støtter og beskytter muskelen og dens muskelfibre (Warriss, 2001). Collagen denatureres mellom 53 og 63°C (Martens et al., 1982). Varmen forårsaker denaturering og krymping av strukturen. Collagenfibrene vil ved videre varmebehandling løses opp og gelatinere (Tornberg, 2005). Graden av denaturering påvirkes av muskelens mengde varmestabile kryssbindinger i og mellom collagenfibrene (Lepetit, 2008; Marsh, 1977).

LTLT-behandling kan føre til at generelt seigt kjøtt eller kjøtt fra eldre dyr også kan oppnå ønsket mørhet (Christensen et al., 2013). Muskler fra eldre dyr er som regel seige som følge av økt innhold av varmemestabile kryssbindinger i og mellom collagenfibrene. Kjøtt fra eldre dyr behandles derfor ofte på lavere temperaturer over et lengre tidsrom for mer effektiv mørning (Warriss, 2001). Dyr mellom 12 og 18 måneder antas av Bailey (1972) og Shimokomaki et al. (1972) å være en passende alder for slakt med hensyn på høy mørhetsgrad grunnet få varmemestabile kryssbindinger.

Penfield og Meyer (1975) antyder at på grunn av den lave temperaturen under LTLT-behandling, kunne enzymaktivitet også være en faktor for økt mørhet. Denne påstanden styrkes av resultatet til Laakkonen, Sherbon et al. (1970) som observerte tilstedeværelse av collagenaseaktivitet i kjøtt varmebehandlet opp til 60°C over lang tid og fravær av aktivitet ved hurtigere oppvarming til 70-80°C.

I kjøtt finnes tre kjente proteolytiske enzymesystemer som bidrar i mørningsprosessen; collagenaser, katepsiner og kalpainer. Da calpainer denatureres etter kun få minutters varmebehandling ved 55°C (Ertbjerg et al., 2012), vil ikke disse være relevante for denne oppgaven. Forskning på katepsinenes rolle i mørning av kjøtt har til nå vært mer utbredt, mens det fremdeles finnes hull i forskningen på effekten av LTLT-behandling på denaturering av collagen og mørning av kjøtt ved tilstedeværelse av collagenase.

Tradisjonelt brukes salt, eddik, vin og varme for å mørne kjøtt, men marinering med naturlig forekommende enzymer er også mulig (Warriss, 2001). Effekten av proteolytiske enzymer fra frukt på mørning av kjøtt er blitt studert, og enzymer som papain fra papaia, ficin fra fiken, bromelain fra ananas og actinidin fra kiwi viser seg å ha en betydelig mørnende effekt på bindevev (Christensen et al., 2009; Katsaros et al., 2009; Sugiyama et al., 1997; Wada et al., 2002), både alene og i kombinasjon med trykk eller varmebehandling. Christensen et al. (2009) rapporterte at marinering i actinidin i to døgn verken overmarinerte eller påvirket saftighet, farge, lukt eller overflatetekstur, men at seigheten effektivt ble redusert.

Oppgavens mål er å utforske effekten av enzymatisk nedbrytning og varmeindusert denaturering av collagen fra oksehøyrygg (*Trapezius*). Dette oppnås ved å studere effekten av langtidsvarmebehandling ved lav temperatur på collagen ved tilstedeværelse av collagenase. Varmebehandling med kombinasjoner av temperaturer fra 50 til 60°C og tider fra 1 til 24 timer utføres for å finne hvilke kombinasjoner som viser mest effekt på collagenet. Isolert bindevev og rent collagen LTLT-varmebehandles ved tilstedeværelse og fravær av ren og opprenset collagenase for å kunne se på effekten av både varmebehandling og enzymatisk behandling på denatureringen og nedbrytningen av collagen til gelatin. I tillegg studeres effekten av LTLT-behandling på mørning av bindevev etter marinering i actinidin fra kiwiekstrakt. Mengde oppløst collagen kvantifiseres, og effekten av marinering og varmebehandling på bindevevet studeres i stereolupe.

## 2 TEORI

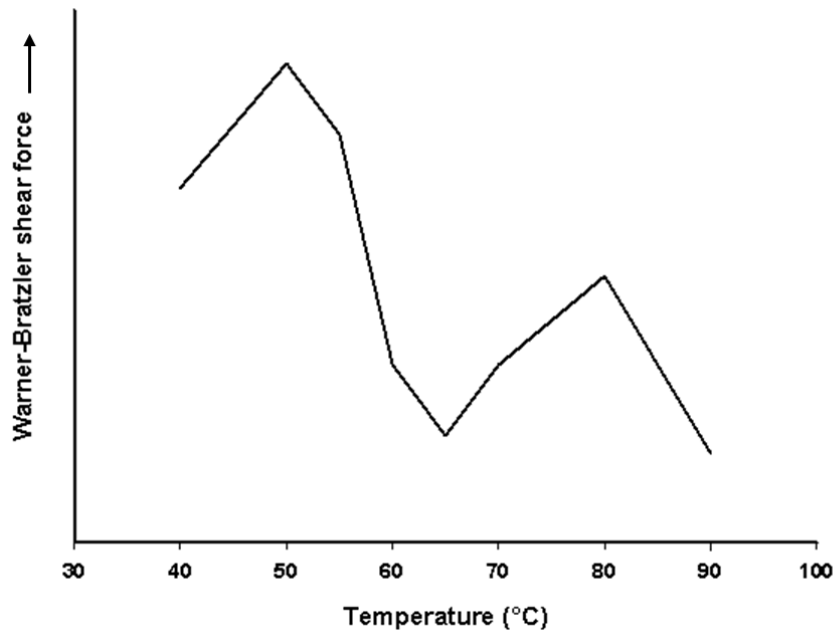
### 2.1 LTLT-behandling av kjøtt

I dagens samfunn tilberedes kjøtt og fisk i større og større grad ved lavere temperaturer over et lengre tidsrom for å oppnå økt kvalitet, hovedsakelig mørhet og saftighet. Metoden kalles LTLT-behandling og brukes i dag både blant profesjonelle kokker og ellers interesserte. Under LTLT-behandling utsettes kjøttet for varme i ovn, på panne eller i vannbad på lav temperatur, vanligvis mellom 50°C og 65°C (Christensen, Bertram et al., 2011). Behandlingsperioden kan variere fra noen timer til flere døgn, avhengig av hvilke egenskaper kjøttet ønskes å ha. Behandling i vannbad gir mer kontrollerte temperaturforhold og jevnere varmeoverføring enn ved behandling i ovn eller på panne (Christensen, 2012). Siden mørhet blir sett på som en av de viktigste sensoriske faktorene (Boleman et al., 1997; Koohmaraie et al., 1995), er det viktig å tilfredsstille kundenes ønsker. Salting, marinering i eddik eller vin og varmebehandling er tradisjonelle og kommersielle metoder til mørning av kjøtt (Warriss, 2001). LTLT-behandling er en metode som får mer og mer oppmerksomhet på grunn av dens evne til å mørne kjøtt kontrollert samtidig som saftigheten bevares i større grad enn ved tradisjonell oppvarming ved høyere temperaturer.

Varmebehandling av kjøtt fører til endringer innen både smak, utseende, saftighet og mørhet (Tornberg, 2005). Et mål på mørhet kan beskrives ved hjelp av Warner-Bratzler shear force (WBSF). Skjærkraftkurven (figur 2.1) illustrerer hvordan seigheten i kjøtt påvirkes av behandlingstemperatur. Mild varmebehandling ved temperaturer mellom 50°C og 65°C har i flere studier vist reduksjon i WBSF i oksekjøtt, noe som indikerer økt mørhet (Bouton et al., 1981; Bouton og Harris, 1981; Bramblett et al., 1959; Christensen, Ertbjerg et al., 2011; Christensen et al., 2013; Christensen et al., 2000; Davey og Gilbert, 1974). Bakgrunnen for redusert WBSF i dette temperaturintervallet er antatt å ligge i reduksjonen i bindevevets styrke etter varmepåvirkning opp til en bestemt temperatur (Bouton og Harris, 1981). Ved 50°C er bindevevets nedbrytning tilnærmet upåvirket av varmetilførselen. Dette stadiet representeres av den første toppen i WBSF-kurven, der kjøttet oppfattes som seigt. Ettersom temperaturen øker vil fibre i bindevevet krympe og gelatinere som en følge av varmeindusert denaturering. WBSF reduseres ned til ~65°C, og kjøttet oppfattes som mørere (Tornberg, 2005). Den andre toppen i WBSF-kurven representerer muskelfibrenes bidrag til seighet. Christensen et al. (2000) observerte økt styrke i muskelfibrene ved 80°C og antar at det skyldes krymping av fibre mellom 60°C og 80°C. Selv om bindevevet er oppløst og gelatinert ved disse temperaturene, vil kjøttet oppfattes som seigt på grunn av muskelfibrenes krympede tilstand.

En fordel ved de lave temperaturene i LTLT-behandling er at saftigheten i kjøttet opprettholdes bedre på grunn av redusert koketap (Aaslyng et al., 2003; Bendall og Restall, 1983; Penfield og Meyer, 1975; Vaudagna et al., 2002). Også behandlinger på mellom 80 og 90°C resulterer i mørt kjøtt, men saftigheten reduseres betraktelig, da koketapet ser ut til å øke med økt behandlingstemperatur (Aaslyng et al., 2003; Christensen et al., 2012; Vaudagna et al., 2002). Krympingen av muskelfibrene kan forklare dette høye koketapet (Baldwin, 2012).





Figur 2.1: Eksempel på en Warner-Bratzler skjærkraftkurve oppnådd ved å måle skjærkraften i kjøtt varmebehandlet på mellom 40°C til 90°C.

De fleste matbårne patogener vokser optimalt ved temperaturer mellom 30 og 40°C, men enkelte kan også vokse ved 50°C, deriblant flere typer *Clostridium* (Bryan, 2004). *Bacillus cereus* er den eneste kjente patogene bakterien som kan vokse helt opp til 55°C (Johnson et al., 1983; McCabe-Sellers og Beattie, 2004). På grunn av deres relativt høye toleranse for varme er patogener en viktig faktor å ta hensyn til under LTLT-behandling av kjøtt ved lavere temperaturer enn 55°C. Så lenge kjøttet behandles over et tilstrekkelig tidsrom, vil videre vekst av patogene bakterier hemmes. I studiet til Christensen et al. (2012) ble kjøtt LTLT-behandlet i minimum 6 timer ved 53°C betraktet som sikkert i forhold til inaktivering av *Listeria monocytogenes* og *Salmonella spp.*

En annen ulempe med LTLT-behandlingens temperaturbegrensninger er at den ikke fører til den brune og smakfulle overflaten som ved tradisjonelle tilberedningsmetoder. Kjøtt som ikke er tilberedt har lite eller ingen aroma, kun en blodaktig smak (Mottram, 1998). Dette kan løses ved å behandle kjøttet på høy temperatur, ved omtrent 120°C, enten før eller etter LTLT-behandlingen (Whitfield og Mottram, 1992). Bruning av kjøtt skjer som følge av varmeinduserte kjemiske reaksjoner mellom aminosyrer, peptider eller proteiner og reduserende sukker (Zamora og Hidalgo, 2005). Den gode kjøttsmaken oppstår ved reaksjoner mellom ikke-flyktige komponenter fra fett ved varmetilførsel (Mottram, 1998; Zamora og Hidalgo, 2005). En fordel er å steke kjøttet før LTLT-behandlingen, da det vil dannes en beskyttende skorpe som reduserer tap av kjøttets saftighet.

I LTLT-behandlinger av kjøtt er fornuftige kombinasjoner av behandlingstid og temperatur viktig for å oppnå ønskelig og nødvendig balanse mellom saftighet, smak, mørhet og patogen inhibering.

## 2.2 Påvirkning av varme på mørhet

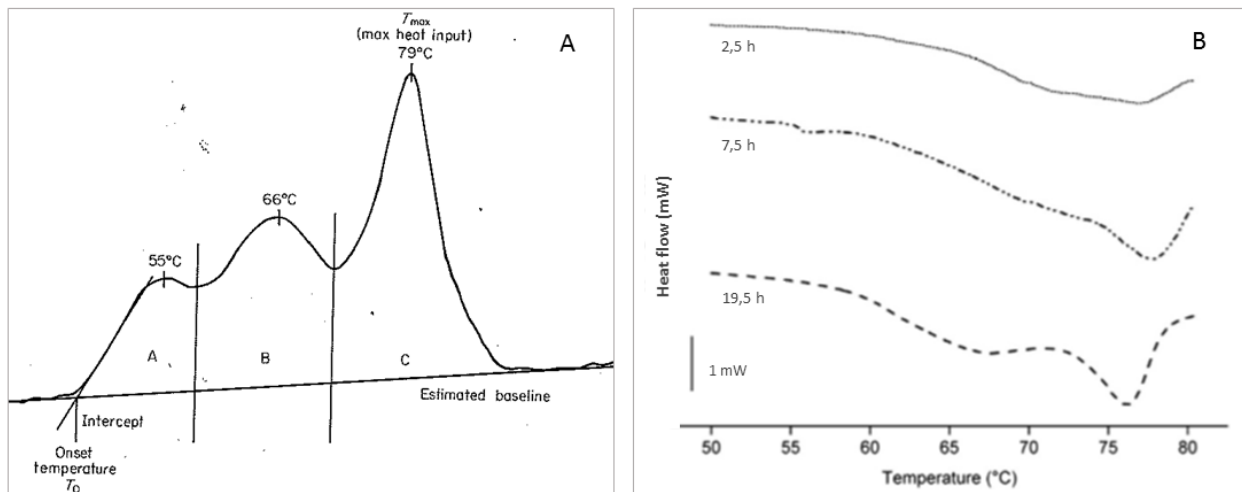
Kjøtt er hovedsakelig muskler bestående av 20% protein og 75% vann. Proteinene deles inn i bindevevsproteiner og myofibrillære og sarkoplasmiske proteiner. Myofibriller utgjør den kontraktile delen av muskelen og er omgitt og beskyttet av bindevev. Proteinene er fibrøse og trekker seg sammen ved varmpåvirkning. De sarkoplasmiske proteinene er for det meste løselige globulære enzymer og myoglobin i sarkoplasma som utvides ved varmpåvirkning (Baldwin, 2012; Tornberg, 2005).

Bindevevet regnes som en sterk påvirkningsfaktor på mørhetsgraden i kjøtt (Marsh, 1977; Tornberg, 2005; Weston et al., 2002). Collagen- og elastin fibre er de viktigste komponentene i bindevev. Fibrene opprettholder en sterk og elastisk støttende struktur rundt musklene og holder muskler, fett og skjelett på plass (Baldwin, 2012; Warriss, 2001). Mengden elastin er mye mindre enn collagen (Baldwin, 2012), og Tuomy et al. (1963) mener at mørhet påvirkes mer av collagen enn av elastin. Tre typer bindevev, endomysium, perimysium og epimysium, omslutter henholdsvis enkle muskelfibre, muskelfiberbunter og hele muskler (Tornberg, 2005). 90% av bindevevet i muskler er perimysium (McCormick, 1999). Collagen finnes i flere varianter. Type I og III er de mest utbredte, da disse hovedsakelig finnes i perimysium (Lepetit, 2008; Tornberg, 2005).

Collagen er bygget opp av tre enkle tropocollagen helisk tvunnet rundt hverandre til en trippel heliks (Baldwin, 2012; Marsh, 1977; Tornberg, 2005). Disse er bundet sammen av kryssbindinger både innad i og mellom collagenmolekylene. I tillegg er collagenmolekylene overlappet på en måte som forhindrer at molekylene sklir fra hverandre når musklene strekkes ved bevegelse (Marsh, 1977). Kjøtt fra unge dyr er mørere enn hos eldre dyr på grunn av flere varmelabile enn varrestabile kryssbindinger i bindevevet, og bindingene brytes lettere ved oppvarming. Ettersom dyret eldes øker stabiliteten til kryssbindingene og gjør bindevevet sterkt (Lepetit, 2008; Tornberg, 2005). Det blir dermed vanskeligere å bryte bindingene grunnet bedret motstandsdyktighet mot varmpåvirkning, og mørningsprosessen kan bli betydelig redusert (Marsh, 1977; Warriss, 2001).

I litteraturen er det fremdeles usikkerheter og uenigheter ved hvilke temperaturer de ulike proteinene i kjøtt denaturerer. Varmeindusert denaturering av proteiner skjer ved bestemte temperaturer der varmen bryter bindingene som holder strukturen sammen, og proteinenes opprinnelige struktur foldes ut og løses opp (Martens et al., 1982). Avhengig av affinitetsendringer mellom molekylene og hva affiniteten resulterer i, aggregering eller oppløsning av molekyler, kan det enten føre til økt mørhet eller økt seighet i kjøtt (Martens et al., 1982).

Denatureringstemperaturene til proteiner i kjøtt kan måles ved hjelp av Differential Scanning Calorimetry (DSC). Metoden går ut på å identifisere temperaturene der en prøve utsatt for varme absorberer energi. Energiabsorpsjonen indikerer denaturering av en eller flere komponenter i kjøttprøven. I et DSC-termogram fra ferskt kjøtt er tre topper til stede, som hver representerer tre ulike temperaturintervaller hvor proteiner denaturerer. Stabursvik og Martens (1980) og Parsons og Patterson (1986) var noen av de første til å tilegne toppene denatureringen av myosin ved  $\sim 55^{\circ}\text{C}$ , collagen, sarcoplasmiske proteiner og myosinfragmenter ved  $\sim 66^{\circ}\text{C}$  og actin ved  $\sim 79^{\circ}\text{C}$  (figur 2.2 A). DSC-målinger av isolerte proteiner hadde da resultert i én topp per termogram.



Figur 2.2: DSC-termogram fra ferskt storfe kjøtt (A) (modifisert fra Parsons og Patterson, 1986) og fra storfe kjøtt LTLT-behandlet på 53°C i 2,5, 7,5 og 19,5 timer (B) (modifisert fra Christensen et al., 2013).

Christensen et al. (2013) viste i deres DSC-termogram fra LTLT-behandlet *Semitendinosus* fra storfe kjøtt (figur 2.2 B) at ved økt behandlingstid vil denaturering av proteiner også kunne skje ved betraktelig lavere temperaturer enn vist i termogrammet til Parsons og Patterson (1986). Etter 19,5 timers behandling av helt kjøtt ved 53°C ble det kun observert en tendens til intakt actin, mens myosin og collagen var denaturert allerede etter 7,5 timers behandling. Resultatene indikerer at muskelproteiner kan denaturere ved lavere temperaturer enn først antatt dersom kjøttet behandles over et lengre tidsrom.

Krymping og gelatinering av collagenfibre er strukturelle konformasjonsendringer som skjer som en konsekvens av varmeindusert denaturering (Bruggemann et al., 2009; Tornberg, 2005). Bruggemann et al. (2009) viste at ubehandlet collagen fra *Biceps femoris* av svin starter denaturering ved 57°C, da de ved hjelp av Second Generation Harmony-mikroskopi (SGH) og Differential Scanning Calorimetry (DSC) (0,2°C/min) observerte krymping av collagenfibre. Ytterligere krymping ble observert ved 59°C. Derimot er det vist at temperaturen der collagen denaturerer avhenger av behandlingstiden (Christensen, Bertram et al., 2011; Christensen et al., 2013). Christensen et al. (2013) fant i *Semitendinosus* fra kalv at ved økt behandlingstid kan collagen denaturere allerede ved 53°C, og at graden av denaturering øker med økt tid.

Krymping av collagenfibre fører i utgangspunktet til at bindevevet blir sterkere, og at mørheten reduseres. Derimot er det i *Semitendinosus* fra okse behandlet i 1 time vist at collagenfiberstyrken øker kun opp til 50°C før den avtar igjen (Christensen et al., 2000). Resultater fra flere studier (Bruggemann et al., 2009; Christensen, Bertram et al., 2011; Christensen, Ertbjerg et al., 2011; Christensen et al., 2013; Christensen et al., 2012) indikerer en negativ korrelasjon mellom krymping og mørhet omkring intervallet der collagen denaturerer. Studiene antyder muligheten for at krympingen ikke er sterk nok til å påvirke mørheten negativt i det aktuelle temperaturintervallet under LTLT-betingelser, og/eller at andre mørningsfaktorer overskygger effekten av krympingen.

Utfallet av varmebehandling på collagenfibrene bestemmes av temperatur og behandlingstid, mengden collagen i kjøttet og i hvilken grad det påvirkes av varmebehandlingen (Martens et al., 1982), der påvirkningsgraden hovedsakelig bestemmes av kvaliteten til collagenets kryssbindinger, og ikke kvantiteten (Marsh, 1977). Varmestabile kryssbindinger er vanskelige å bryte og fører til seigt kjøtt. De varmelabile kryssbindingene gjør mørningsprosessen lettere, da det skal mindre energi til for å bryte

disse (Baldwin, 2012; Tornberg, 2005). Mengdeforholdet mellom varrestabile og varmelabile kryssbindinger har dermed stor innvirkning på seigheten i kjøtt. Varmebehandling av kjøtt med flertall av varmelabile kryssbindinger vil føre til økt krymping. Ved videre varmebehandling vil collagenfibrene løses opp og gelatinere (Tornberg, 2005). Per i dag finnes det ingen litteratur på hvilke temperaturer som fører til krymping av collagen under LTLT-behandling, men Baldwin (2012) skriver at krympingen intensiveres med økt temperatur.

Av metodiske årsaker kan det ikke utelukkes at collagens varmeinduserte denatureringstemperatur kan variere noe fra ett studie til et annet. Varmebehandlet opprenset bindevev vil trolig ha en noe lavere denatureringstemperatur enn hele kjøttbiter fra samme kilde på grunn av færre fysiske barrierer, noe som fører til lavere stabilitet. I tillegg finnes det indikasjoner på at denatureringstemperatur avhenger av kjøtttype; proteiner fra oksekjøtt ser ut til å kreve noe høyere temperatur og lengre behandlingstid for å denaturere enn proteiner fra svinekjøtt (Christensen, Bertram et al., 2011; Christensen et al., 2013).

Blant muskelens tre proteingrupper er bindevevet i mange tilfeller den største årsaken til seighet i kjøtt, men også myofibrillene kan påvirke mørningsprosessen når de blir utsatt for varme (Baldwin, 2012; Marsh, 1977; Martens et al., 1982; Tornberg, 2005). Det er vist at myofibriller krymper ved varmpåvirkning; transversal og longitudinal krymping er observert henholdsvis mellom 40°C og 60°C og mellom 60°C og 90°C (Bendall og Restall, 1983). Christensen et al. (2000) fant en økning i muskelfibrenes styrke mellom 60°C og 80°C og mener, sammen med Bouton og Harris (1972), at bidraget til den andre økningen i seighet i WBSF-kurven skyldes muskelfibrenes krymping. Økt krymping og fiberstyrke gjør at kjøttet blir oppfattet som seigt. Som en konsekvens av krympingen lekker det varmebehandlede kjøttet væske og resulterer i en betraktelig større reduksjon i saftighet enn ved behandling med LTLT-temperaturer (Baldwin 2012; Bendall og Restall, 1983).

Sarkoplasmiske proteiner bidrar også i mørningsprosessen; oppvarming til temperaturer mellom 40°C og 60°C fører til aggregering og gelatinering av proteinene og resulterer i mørere kjøtt (Baldwin, 2012; Tornberg, 2005). Penfield og Meyer (1975) antyder at på grunn av de relativt lave temperaturene i LTLT-behandlinger, kombinert med lang behandlingstid, kan tilstedeværelsen av fremdeles aktive proteolytiske enzymer i sarcoplasma være en av årsakene til økt mørhet.

### **2.3 Proteolytiske enzymer og deres effekt på mørning av kjøtt**

Proteolytiske enzymer er katalytiske proteiner som spalter peptidbindinger ved hjelp av hydrolyse. Enzymene spiller en viktig rolle i en mengde biologiske prosesser. Blant annet katalyserer de nedbrytning av muskelproteiner og bidrar dermed i mørningsprosessen i kjøtt (Tornberg, 2005). Da temperaturen i LTLT-behandlinger normalt ikke overgår 65°C, kan ikke tilstedeværelse og påvirkning av proteolytiske enzymer på mørning utelukkes (Penfield og Meyer, 1975).

I kjøtt finnes to kjente proteolytiske enzymesystemer som er aktive under LTLT-betingelser og som kan bidra til mørere kjøtt; katepsiner (Christensen, Ertbjerg et al., 2011) og collagenaser (Laakkonen, Sherbon et al., 1970). Sammenlignet med katepsinene, finnes det relativt lite informasjon om effekten av collagenaseaktivitet på mørning av kjøtt under LTLT-betingelser. Katepsiner er kjent for å bidra til mørning av kjøtt (Beltrán et al., 1992; Christensen, Ertbjerg et al., 2011; Solvig, 2014) ved å bryte peptidbindinger og svekke strukturen i collagen (Agarwal, 1990). Enzymet har vist høy aktivitet helt opp til 63°C (Christensen, Ertbjerg et al., 2011) og er dermed aktiv også under LTLT-behandling. Beltran et al. (1992) og Solvig (2014) fant at isolert bindevev fra storfe inkubert med katepsiner førte til økt oppløsningen av collagen.

Både Laakkonen, Sherbon et al. (1970) og Penfield og Meyer (1975) observerte proteolytisk aktivitet i LTLT-behandlet kjøtt fra ungdyr av storfe opp til nær 60°C. Ved hurtigere oppvarming til over 70°C var aktiviteten betydelig redusert (Penfield og Meyer, 1975) eller helt borte (Laakkonen, Sherbon et al., 1970). Penfield og Meyer (1975) observerte en økning i proteolytisk aktivitet fra 50°C og et toppunkt ved 60°C. Økningen korrelerte med en reduksjon i WBSF mellom 50 og 60°C. Forfatterne avslår ikke muligheten for aktivitet også mellom 60 og 70°C.

Collagenase er ett av enzymene som har vist positiv effekt på mørning av kjøtt ved nedbrytning av collagen i bindevev (Cronlund og Woychik, 1987; Laakkonen, Sherbon et al., 1970). Enzymet er en del av Matrix Metalloproteinase-familien (MMP) (Daboor et al., 2010) og finnes blant annet i sarkoplasma i musklene hvor det deltar i nedbrytningen av bindevev (Tornberg, 2005). Temperatur og pH regnes som de viktigste påvirkningsfaktorene på collagenaseaktiviteten, men optimumsforholdene avhenger av collagenasekilden, både art og organ (Daboor et al., 2010). pH bør helst være nøytral for å bevare mest mulig av aktiviteten (Cronlund og Woychik, 1987; Daboor et al., 2010). Laakkonen, Sherbon et al. (1970) viste ved 37°C at optimal pH hos collagenase fra storfe var mellom 7 og 8. Collagenase viser aktivitet i et relativt stort temperaturintervall, fra 20 til 40°C (Daboor et al., 2010), med en optimumstemperatur som ved pH 7,7 ligger på 37°C (Laakkonen, Sherbon et al., 1970). Collagenaseaktivitet er likevel observert helt opp til over 60°C (Foegeding og Larick, 1986). Cronlund og Woychik (1987) fant aktivitet av ren og delvis ren collagenase fra *Clostridium histolyticum* etter behandling med isolert bindevev ved 65°C i 30 minutter.

Collagenase angriper collagenfibre ved å bryte peptidbindinger i heliks-strukturen. Enzymene fester seg til ulike områder på collagenfibre, avhengig av collagenasetypen, og induserer heliks-utfolding (Daboor et al., 2010). De fleste collagenasetypene er kalsium- og zink-avhengige og inhiberes ved mangel på disse. Tilstedeværelse av kelatorer, for eksempel EDTA, bidrar også til inhibering ved å binde ionene (Daboor et al., 2010).

Ifølge Daboor et al. (2010) er det svært få enzymer som kan bryte ned collagen, men når heliks-strukturen til collagen først er denaturert og foldet ut, kan flere andre uspesifikke proteolytiske enzymer, i tillegg til collagenase, angripe og bryte ned strukturen (Laakkonen, Sherbon et al., 1970). Enkelte proteolytiske enzymer angriper også muskelfibre i tillegg til collagenfibre, noe som kan føre til uønsket tekstur i kjøttet (Kang og Rice, 1970). Collagenaseenzymet er dermed ideelt til nedbrytning av collagenfibre i forhold til spesifisiteten for collagen. Derimot reduseres collagenaseaktiviteten betydelig når pH senkes til pH-nivået i kjøtt (~5,5) og når temperaturen senkes eller økes når kjøttet skal lagres eller tilberedes (Cronlund og Woychik; 1987). En optimal kombinasjon av temperatur og pH bør derfor brukes for å oppnå høyest mulig collagenaseaktivitet, da det er vist at temperatur og pH korrelerer, og at aktiviteten avhenger av disse parameterne (Laakkonen, Sherbon et al., 1970).

Laakkonen, Sherbon et al., (1970) observerte collagenaselignende aktivitet i *Longissimus*, *Rectus femoris* og *Semitendinosus* fra okse behandlet i 6 timer på mellom 37°C og 59°C. I motsetning til Penfield og Meyer (1975), som fant at den proteolytiske aktiviteten økte fra 50°C til 60°C, observerte Laakkonen, Sherbon et al. (1970) en reduksjon i collagenaseaktiviteten når temperaturen økte til 60°C. Dette kan skyldes at den totale proteolytiske aktiviteten overskygger endringen i collagenaseaktivitet. Den totale proteolytiske aktiviteten var betydelig høyere enn collagenaseaktiviteten, noe som indikerer tilstedeværelse av flere andre aktive proteolytiske enzymer som kan reagere annerledes på temperaturøkningen.

Studier viser at hurtigere varmepenetring har negativ innvirkning på den proteolytiske aktiviteten (Laakkonen, Sherbon et al., 1970; Penfield og Meyer, 1975) og på kjøttets mørhet (Penfield og Meyer, 1975). Laakkonen, Sherbon et al., (1970) fant at hurtig oppvarming til 80°C førte til inaktivering av collagenase, og Penfield og Meyer (1975) fant at kjøtt behandlet langsomt til 70°C var mørere enn ved hurtig oppvarming. Tregere oppvarming fører ifølge Laakkonen, Sherbon et al. (1970) til redusert koketap i forhold til hurtig oppvarming. Som en følge av dette vil mer av collagenaseaktiviteten bevares i kjøttet og bidra til økt mørhet.

Flere studier har vist at marinerings med proteolytiske enzymer fra frukt også har mørnende effekt på kjøtt, deriblant papain fra papaya (Ashie et al., 2002; Ha et al., 2012), bromelain fra ananas (Ha et al., 2012) og actinidin fra kiwi (Christensen et al., 2009; Wada et al., 2002). Enzymene har ikke evnen til å angripe kollagens opprinnelig heliks-struktur før etter varmeindusert denaturering av collagenfibrene (Sugiyama et al., 2005).

Actinidin og annen proteolytisk aktivitet i kiwijuice har dokumentert positiv effekt på mørning av kjøtt fra storfe, lam og svin (Ashie et al., 2002; Christensen et al., 2009; Ha et al., 2013; Han et al., 2009; Rødbotten et al., 2015; Sugiyama et al., 2005; Toohey et al., 2011; Wada et al., 2004; Wada et al., 2002). Proteolytiske enzymer i kiwijuice har ifølge Katsaros et al. (2009) og Sugiyama et al. (1997) høyest aktivitet ved lave pH-verdier. Katsaros et al. (2009) fant at aktiviteten var høyest rundt pH 6 ved 30°C.

Sugiyama et al. (2005) viste at kiwijuice har effekt på mørningen av kjøtt ved nedbrytning av denaturert collagen og ved gelatinering under varmebehandling ved lav temperatur. Det er også vist at actinidin har effekt på oppløsningen av collagen selv uten varmebehandling (Christensen et al., 2009; Wada et al., 2004). Wada et al. (2004) antyder at oppnådde resultater indikerer at actinidin kan bryte kryssbindinger i collagen i *Achilles tendon* fra okse når pH er mellom 3,3 og 6,0. Dette er derimot den eneste artikkelen, forfatteren bekjent, som har antydnet denne egenskapen.

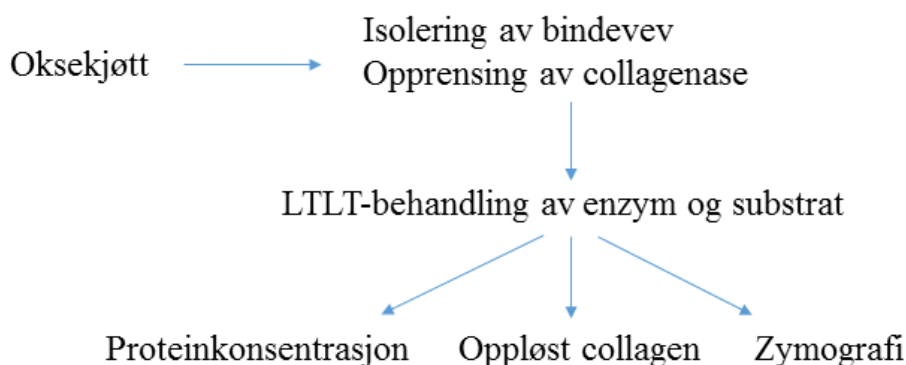
Proteolytiske enzymer fra frukt angriper også muskelfibre (Kang og Rice, 1970) og kan gi kjøttet uønsket tekstur (Cronlund og Woychik, 1987). Derimot har actinidin mindre innvirkning på nedbrytningen av muskelfibre sammenlignet med papain og ficin (Christensen et al., 2009; Aminlari et al., 2009). Christensen et al. (2009) viste at actinidinmarinering av *Biceps femoris* fra svinekjøtt påvirket bindevevet og reduserte WBSF uten at kjøttet ble overmarinert, ettersom det ikke ble observert grøtete overflate. Samtidig forble smak og saftighet upåvirket. Ettersom det kun kreves en liten mengde actinidin, som ikke behøver å være helt ren for å gi effekt på mørning, kan bruk av dette enzymet gi økonomiske fordeler i kjøttindustrien (Aminlari et al., 2009).

Det er vist at oppløsning av collagen avhenger temperatur, behandlingstid og tilstedeværelse av proteolytiske enzymer, der aktiviteten til enzymene også avhenger av temperatur og behandlingstid. De optimale forholdene for å oppnå mest mulig effektiv collagenoppløsning og collagenaseaktivitet, bestemt av temperatur og behandlingstid, gjenstår å utforske i større grad.

### 3 METODEBESKRIVELSE

Kjøttet brukt i eksperimentet var av oksehøyrygg (*Trapezius*) fra Nortura, lagret i syv dager etter slakt ved 4°C før nedkjøling på -80°C. To kommersielle varianter av collagen og collagenase ble benyttet. Enzymvariantene ren collagenase (Collagenase from *Clostridium histocolyticum*) fra Sigma-Aldrich og collagenase opprenset fra oksehøyrygg ble benyttet sammen med rent collagen (Collagen from bovine achilles tendon) fra Sigma-Aldrich og bindevev isolert fra oksehøyrygg som substrat. Se og brett ut Appendix 1 for oversikt over kombinasjonene av substrat og enzym. Det ble benyttet to varianter av actinidin, begge fremstilt fra kiwiekstrakt; OT1005X fra Ingredient Resources Pty Ltd. og KFP (Kiwi Fruit Powder) fra KiwiEnzyme.com Ltd. Eksperimentene ble utført på Nofima sine laboratorier ved Måltidets Hus i perioden september 2014 til mars 2015.

#### 3.1 LTLT-behandling med collagenase



Figur 3.1: Flytdiagram for utførte eksperimenter og analyser i collagenaseeksperimentet.

##### 3.1.1 Isolering av bindevev

50 grams kjøttstykker ble dagen før lagt på kjøll til opptining fra -80°C. 100 g kjøtt om gangen ble kuttet i små biter med en minihakker og homogenisert (Ultra Turrax® IKA® T18 basic) (S25N - 18G) på 24 000 RPM i 45 sekunder i 100 ml 0,05 M CaCl<sub>2</sub>-buffer. Homogenatet ble filtrert med en sil med hull på 1 mm, tre ganger hver. Pelleten ble kuttet opp i enda mindre biter og tilsatt ny kald buffer før hver homogenisering. Ettersom den ble hvitere for hver homogenisering, ble synlige muskelfibre fjernet. Resterende muskelfibre ble fjernet ved inkubering i 1 % SDS-løsning. Etter én time ble pelleten sentrifugert (Sorvall® RC 5C Plus) på 20 000 g i 15 minutter, før enda en SDS-inkubering og ny sentrifugering. Den resterende pelleten ble vasket tre ganger med kald 0,05 M CaCl<sub>2</sub>-buffer og oppbevart på -20°C. Før LTLT-behandlingen ble bindevevet tint og tørket for fukt med filterpapir. Hele prosessen krevde 400 g kjøtt som gav rundt 11 g bindevev.

##### 3.1.2 Opprensing av collagenase

Metoden til Hernández-Herrero et al. (2003) ble brukt til opprensing av collagenase. Alle løsninger og materialer som skulle brukes ble kjølt ned på is før start. 100 g kjøtt ble kuttet opp med minihakker og homogenisert (Ultra Turrax® IKA® T18 basic) (S25N - 18G) i 150 ml kald 0,05 M Tris/HCl-buffer (pH 7,5) med 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Løsningen ble homogenisert på 24 000 RPM i fire intervaller på 15 sekunder med avkjøling på is i 30 sekunder mellom hver homogenisering. Etter avkjøling ble homogenatet sentrifugert (Sorvall® RC 5C Plus) på 20 000 g i 30 minutter ved 4°C. Pelleten gjennomgikk enda en

opprensning, og supernatanten fra begge opprensingene ble forent og filtrert for å fjerne fettlaget på toppen. Supernatanten ble oppbevart på -80°C frem til analysestart.

### 3.1.3 Enzymaktivitet i ren og opprenset collagenase

Før eksperimentet ble to metoder benyttet for å finne ut om opprenset og ren collagenase viste aktivitet. Den første metoden baserte seg på Christensen, Ertbjerg et al. (2011) med modifikasjoner tilpasset collagenase (Appendix 2). Ulike konsentrasjonsforhold mellom enzymløsning (50 mg/l) og aktiveringsbuffer ble utprøvd, og fluorescence ble målt spektrofotometrisk i varmebehandlede løsninger med syntetisk substrat (Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, Bachem AG), aktiveringsbuffer (Tris/HCl) og enzym. Den andre metoden, en kolorimetrisk metode, benyttet Folin & Ciocalteu's fenolreagens (benyttes til bestemmelse av totalprotein, Sigma-Aldrich) til å måle collagenasenes nedbrytning av torskegelatin og oksegelatin (Appendix 3).

Den første metoden viste kun aktivitet hos opprenset collagenase og den andre metoden kun hos ren collagenase. Enzymaktiviteten målt i opprenset collagenase ble da omregnet til Unit og sammenlignet med aktiviteten angitt i Sigma-Aldrich sin produktinformasjon for collagenase. Sigma-Aldrich anbefaler 0,005-0,01 mg collagenase per 25 mg collagen i målinger av enzymatisk aktivitet (Appendix 4). En 0,01 mg/ml løsning med ren collagenase ble dermed fortynnet tre ganger for å kunne bruke 3 ml enzymløsning per 50 mg collagen i eksperimentet. I 3 ml opprenset collagenase ble antall Unit beregnet til å være 2, mens den i 3 ml 3,3 µg/ml ren collagenase var 0,05. På grunn av tilstedeværelse av inhibitorer i opprenset collagenase, vil differansen mellom variantenes Unit reduseres.

### 3.1.4 LTLT-behandling

LTLT-behandlingen ble utført på åtte mulige kombinasjoner av fire enzym- og substratvarianter; rent collagen fra akillesene av okse og ren collagenase fra *Clostridium histolyticum* fra Sigma-Aldrich og isolert bindevev og opprenset collagenase fra *Trapezius* (tabell 3.1). Prøvene ble varmebehandlet i vannbad på ulike temperaturer og tidsintervaller (tabell 3.2).

Tabell 3.1: Oversikt over enzym- og substratkombinasjonene

Komb	Substrat	Enzym	Buffer
1	50 mg rent collagen		5 ml TES-buffer
2	50 mg isolert bindevev		5 ml TES-buffer
3		3 ml ren collagenase	2 ml TES-buffer
4		3 ml opprenset collagenase	2 ml TES-buffer
5	50 mg rent collagen	3 ml ren collagenase	2 ml TES-buffer
6	50 mg isolert bindevev	3 ml opprenset collagenase	2 ml TES-buffer
7	50 mg rent collagen	3 ml opprenset collagenase	2 ml TES-buffer
8	50 mg isolert bindevev	3 ml ren collagenase	2 ml TES-buffer



Tabell 3.2: Antall paralleller varmebehandlet på ulike temperaturer over ulike tidsrom.

Temperatur (°C)	Tidsintervall (timer)			
	0	1	6	24
50	2	3	3	3
55	2	3	3	3
60	2	3	3	3

På forhånd ble 50 mg (+/- 1 mg) isolert bindevev og rent collagen veid ut i rør, og ren collagenase ble fortynnet med Tris/HCl-buffer (pH 7,5) til konsentrasjonen tilsvarte Sigma-Aldrichs anbefalte forhold mellom collagen og collagenase (beskrevet under avsnitt 3.1.3).

På den aktuelle dagen ble ren og opprenset collagenase tint på is. Tre ml enzym ble tilsatt rør med 50 mg collagen og 2 ml 50 mM TES-buffer (pH 7,5) i henhold til tabell 3.1. Løsningene uten enzym (kombinasjon 1 og 2) ble tilsatt 5 ml TES-buffer. Tre paralleller av hver kombinasjon ble varmebehandlet på 50°C, 55°C og 60°C i 1, 6 og 24 timer (tabell 3.2). Etter varmebehandlingen ble prøver av supernatanten lagt i -80°C. I tillegg ble det forberedt nullprøver for hver kombinasjon som ble frøset ned uten varmebehandling.

### 3.1.5 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon

Ved bestemmelse av collagenaseaktiviteten ble flere metoder basert på ninhydrin benyttet, blant annet Worthingtons Collagenase Assay, med enkelte modifikasjoner og variasjoner innen løsningsmidler og konsentrasjoner. Prøver tilsatt ninhydrinløsning ble behandlet i kokende vannbad, avkjølt og tilsatt et alkohol for å stoppe reaksjonen. Absorbansen ble målt ved 570-600 nm. L-leucin og hydroxyprolin ble utprøvd som standard. Dessverre gav ingen av prosedyrevariantene signifikante resultater; ninhydrin ble ikke fullstendig løst, prøvene og standardløsningene ble svært grumsete og en annen farge enn forventet, og absorbansene ble altfor høye. Årsaken er ukjent, og en helt annen metode ble benyttet.

Prøvenes proteinkonsentrasjon ble bestemt ved hjelp av Bio-Rads kolorimetrisk DC Protein Assay. En standardrekke med BSA ble forberedt fra 0,0-3,0 mg/ml i Tris/HCl-buffer. Hver prøve ble fortynnet 3:2 i tre nye rør, og 5 µl av fortynningene og standardløsningene ble tilsatt på multiplate, tre brønner per rør. Deretter ble 25 µl Reagens A og 200 µl Reagens B tilsatt i hver brønn. Platen ble plassert i multiplateleseren, ristet i fem sekunder og inkubert i 15 minutter før absorbansmåling ved 660 nm. For hver plate ble en ny standardkurve laget. Absorbansen ble omregnet til mg protein/ml.

### 3.1.6 Bestemmelse av mengde oppløst collagen

Eksperimentet tok utgangspunkt i Kolar (1990) med noen modifikasjoner. Én ml supernatant fra hver prøve ble varmebehandlet i cryorrør med 1 ml 6 M HCl i om lag 19 timer ved 115°C i varmeskap (dobbelbestemmelse). Prøvene ble satt på frys (-20°C) til analysestart.

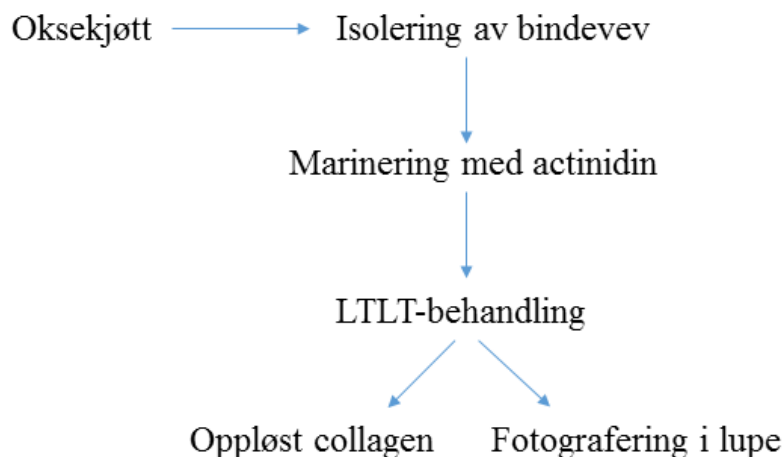
Videre ble noen av prøvene pH-justert til pH 6 med NaOH, og et gjennomsnitt av volumet ble brukt til justering av resterende prøver før analysestart. Sterk base ble brukt for å unngå for høy fortynning av prøvene. En halv ml prøve ble tilsatt 5M NaOH og vann slik at pH ble 6 og volumet ble 1 ml. En standardrekke med 0, 5, 10, 20, 30 µg/ml hydroxyprolin ble også forberedt. En halv ml kloramin-T-løsning (0,7 g kloramin-T i 50 ml citratbuffer) ble tilsatt før inkubering i 20 min ved romtemperatur. 0,5 ml avkjølt fargereagens (5 g 4-dimetylaminobenzaldehyd i 20 ml 2-propanol og 9 ml 60% perklorisyre)

ble tilsatt før ny inkubering i 15 min i vannbad på 60°C. Prøvene ble straks avkjølt i isvann i 60 sekunder og satt til inkubering i romtemperatur i 15 min. Absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 560 nm og omregnet ved bruk av collagenfaktor (7,14) til konsentrasjon oppløst collagen (mg/ml).

### 3.1.7 Zymografi

Prøver av kombinasjon 3, 4, 5, 6, 7 og 8 ble tint og fortynnet 3:1 med sample buffer (65,8 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2,1% SDS, 26,3% (w/v) glyserol, 0,01% bromofenolblå). Femti µl prøve og kontroll ble tilsatt i brønnene på zymogramgelene (10% gelatin, Bio-Rad). Elektroforesen kjørte i 90 minutter i iskaldt miljø på 100V i running buffer (Tris/glycine/SDS, Bio-Rad). Deretter ble gelene inkubert i renaturation buffer (25% Triton X-100, Bio-Rad) på vippebrett. Etter 45 minutter ble de overført til development buffer (5 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5, Bio-Rad) og satt i varmeskap på 37°C over natten. Gelene ble inkubert i omtrent 21,5 timer før de ble farget i Coomassieblått-løsning (80 ml 40% etanol, 20 ml 10% eddiksyre og 0,1 gram 0,05% Coomassieblått) i 2,5 timer. Til slutt ble gelene vasket i nesten 20 timer med milli-Q-vann før de ble tatt bilde av (Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ Imaging System, Bio-Rad).

### 3.2 Marinering i actinidin og LTLT-behandling



Figur 3.2: Flytdiagram for utførte eksperimenter og analyser i actinidinesperimentet.

#### 3.2.1 Marinering i actinidin

Rør med 50 mg (+/- 1 mg) isolert bindevev (fra avsnitt 3.1.1) ble tilsatt 3 ml 50 mM MES-bufferløsning (pH 5,5) med 7 g actinidin/l. Ett sett med rør ble tilsatt actinidinvarianten OT1005X, og ett ble tilsatt KFP. Samtidig ble det forberedt nullprøver tilsatt kun MES-buffer, der ett sett ble lagt på frys umiddelbart og ett sett ble satt i kjøleskap (6°C) i påvente av varmebehandling. Tre paralleller av hver prøve og to av hver nullprøve ble satt til marinering i kjøleskap i 19-20 timer. Nullprøver med actinidin ble lagt på frys uten varmebehandling etter endt marinering.

### 3.2.2 LTLT-behandling

Prøver med og uten actinidin ble varmebehandlet i vannbad ved 50 og 60°C i 1 og 24 timer og ved 90°C i 1 time (tabell 3.3). Etter varmebehandling ble prøver lagt på frys frem til analysestart.

Tabell 3.3: Antall paralleller varmebehandlet på ulike temperaturer over ulike tidsrom.

Temperatur (°C)	Tidsintervall (timer)		
	0	1	24
50	2	3	3
60	2	3	3
90	0	3	0

### 3.2.3 Bestemmelse av mengde oppløst collagen

Cryorrør med 0,5 ml prøve ble tilsatt 0,5 ml 6 M HCl, plassert i skåler med silica gel og varmebehandlet i varmeskap på 115°C i mellom 19 og 20 timer. Resten av eksperimentet ble utført på samme måte som i avsnitt 3.1.5, etter Kolar (1990).

### 3.2.4 Studie av marinert og LTLT-behandlet bindevev med lupe

Bindevevet ble tatt vare på og fryst ned etter endt marinering og varmebehandling. Visuelle forskjeller mellom bindevevsprøvene ble studert i Leica MZ8 stereolupe og fotografert med VisiCam 10.0 (VPR<sup>®</sup>) i programmet Visicam Image Analyser (versjon 7). Forstørrelsene som ble benyttet var 40x og 80x.

## 3.3 Statistikk

Statistiske analyser ble utført i SAS (versjon 9.4). Følgende modeller for faste effekter ble benyttet for analyse av data fra henholdsvis varmebehandlingen med collagenase og varmebehandling etter marinering i actinidin:

$$y = \mu + tid + temperatur + enzym + substrat + tid*temperatur + tid*temperatur*enzym*substrat + \epsilon$$
$$y = \mu + tid + temperatur + enzym + tid*temperatur + tid*temperatur*enzym + \epsilon$$

Substratparameteret er ikke inkludert i den andre oppgitte modellen da kun én type substrat ble benyttet i dette eksperimentet. Minste kvadraters metode ble sammenlignet, og målinger blir ansett for å være signifikant forskjellige når  $P < 0,05$ .

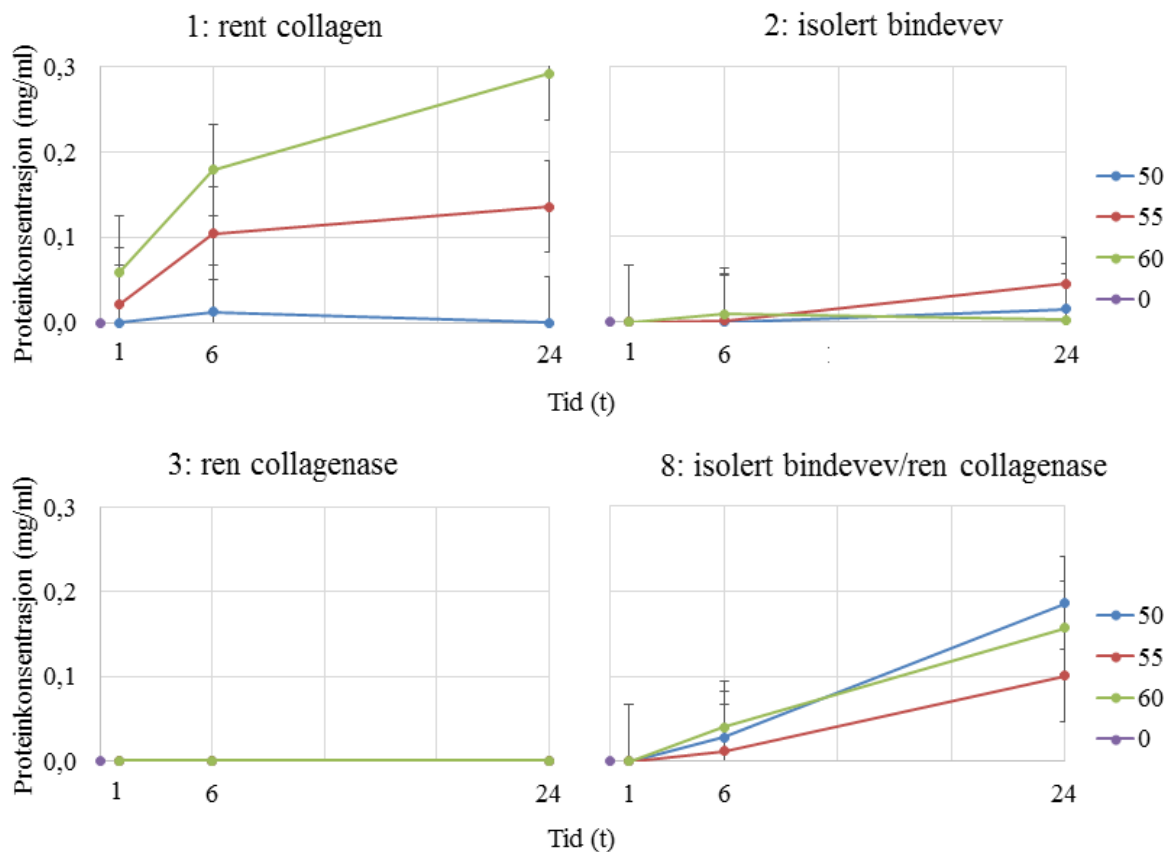
## 4 RESULTATER

### 4.1 LTLT-varmebehandling med collagenase

#### 4.1.1 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon

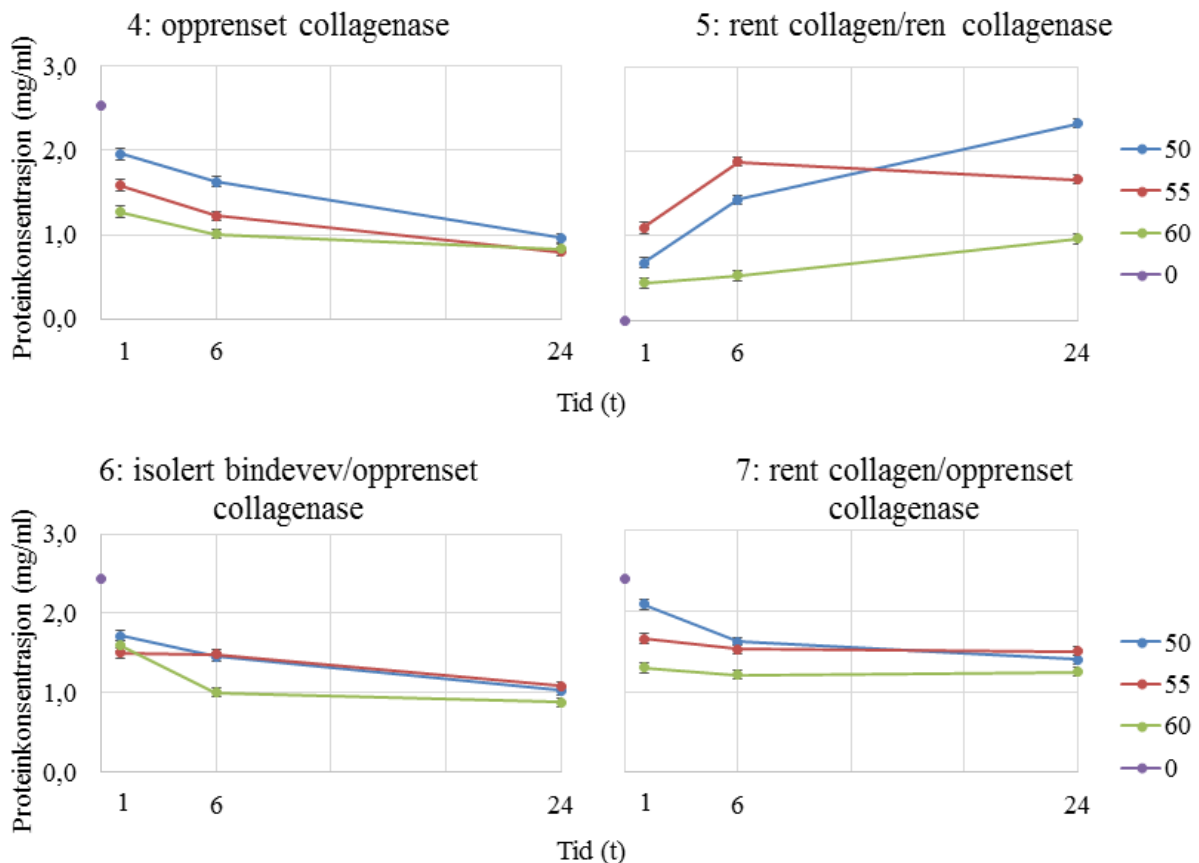
Proteinkonsentrasjonen ble målt i vannfasen i de LTLT-behandlede prøvene og deres parallelle ubehandlede nullprøver. Den isolerte effekten av temperatur, tid, substratvariant, enzymvariant og deres interaksjoner på proteinkonsentrasjon var signifikant ( $P < 0,01$ ).

Kombinasjonene 4, 6 og 7 med opprenset collagenase og kombinasjon 5 viste de høyeste konsentrasjonsverdiene med verdier på mellom 1 og 2 mg protein/ml (figur 4.2). Verdiene hos de resterende kombinasjonene var betydelig lavere, fra 0 til 0,3 mg protein/ml (figur 4.1). Prøvene som ikke ble LTLT-behandlet, nullprøvene, viste i kombinasjonene med opprenset collagenase signifikant høyere proteininnhold enn behandlede prøver. Nullprøvene til kombinasjonene uten opprenset collagenase hadde proteinkonsentrasjon på null.



Figur 4.1: Effekten av LTLT-behandling ved 50, 55 og 60°C i 1, 6 og 24 timer på proteinkonsentrasjonen i kombinasjon 1, 2, 3 og 8 ( $n=3$ ). Vertikale linjer representerer standardavvik.

Kun hos kombinasjon 1 behandlet på 60°C og hos kombinasjon 5 og 8 behandlet på 50°C og 60°C førte økt behandlingstid til signifikant økning i proteinkonsentrasjon. Ved tilsetning av ren collagenase i rent collagen økte proteinkonsentrasjonen signifikant med både behandlingstid og temperatur og førte til høyere proteininnhold ved behandlingene ved 50°C og 55°C enn ved 60°C. I kombinasjon 8 førte tilstedeværelsen av ren collagenase til signifikant økt proteinkonsentrasjon ved 50 og 60 graders behandlingen etter 24 timer. Proteininnholdet i kombinasjon 2 og 3 lå signifikant uforandret nær null uavhengig av behandlingstid og temperatur. Resultatene fra kombinasjon 1, 2, 3 og 8 viste liten eller ingen positiv signifikant effekt ved økning i temperatur, kun i kombinasjon 1 etter 6 og 24 timers behandling, der behandlingen ved 60°C førte til signifikant høyest proteininnhold.



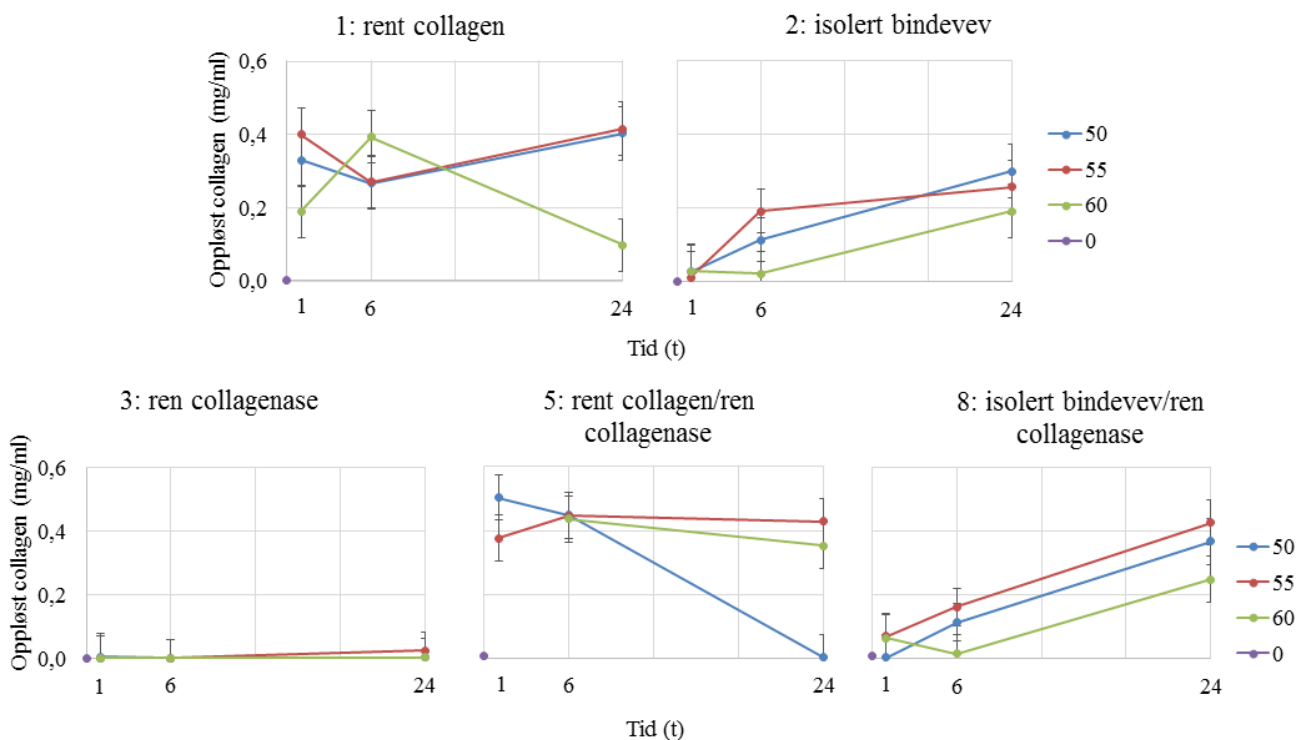
Figur 4.2: Effekten av LTLT-behandling ved 50, 55 og 60°C i 1, 6 og 24 timer på proteinkonsentrasjonen i kombinasjon 4, 5, 6 og 7 (n=3). Vertikale linjer representerer standardavvik.

I kombinasjon 4, 6 og 7 sank proteinkonsentrasjonen signifikant ved de aller fleste temperaturer ved en økning i behandlingstid fra 1 time til 24 timer. Nedgangen var størst mellom 1 og 6 timers behandling. Ved vertikal sammenligning i kombinasjon 4-7 ble det observert nedgang i proteinkonsentrasjonen ved de aller fleste tider når temperaturen ble økt. Behandlingstemperatur på 60°C gav signifikant de laveste konsentrasjonsverdiene.

#### 4.1.2 Bestemmelse av mengde oppløst collagen

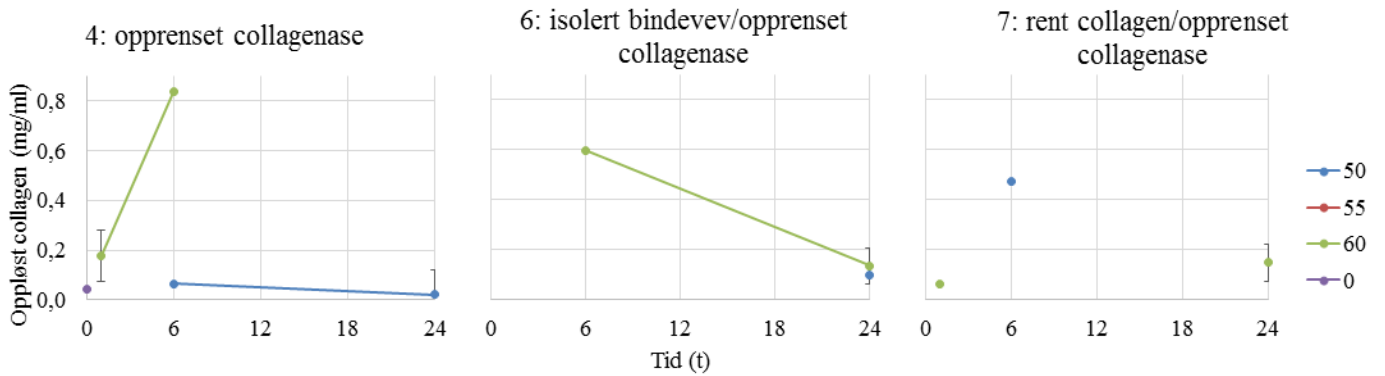
Mengden oppløst collagen i vannfasen i LTLT-behandlede prøver med tilhørende ubehandlede nullprøver ble bestemt. Behandlingstid, temperatur, enzymvariant, substratvariant og interaksjoner mellom disse viste signifikant isolert effekt ( $P < 0,01$ ) på mengden oppløst collagen, bortsett fra temperatur alene.

Prøvene med opprenset collagenase produserte ikke mange nok data til å lage fullstendige kurver, og disse er vist i en egen figur (figur 4.4). Mengden oppløst collagen i kombinasjonene presentert i figur 4.3 viste signifikant effekt hovedsakelig av behandlingstid. Ved vertikal sammenligning ble det observert liten eller ingen påvirkning av temperatur på mengden oppløst collagen. De kjente nullprøvene inneholdt ingen signifikant mengde oppløst collagen.



Figur 4.3: Effekten av LTLT-behandling ved 50, 55 og 60°C i 1, 6 og 24 timer på mengde oppløst collagen i kombinasjon 1, 2, 3, 5 og 8 ( $n=3$ ). Vertikale linjer representerer standardavvik.

Mengden oppløst collagen i LTLT-behandlet isolert bindevev, kombinasjon 2 og 8, ble påvirket likt uavhengig av temperatur, med signifikant stigning når behandlingstiden ble økt. En tendens til større collagenoppløsning ved tilstedeværelse av ren collagenase i kombinasjon 8 ble observert i prøvene behandlet ved 55°C i 24 timer. Ren collagenase i kombinasjon 3 inneholdt ikke substrat og ble ikke signifikant påvirket av en økning i temperatur eller behandlingstid. Oppløsningen av collagen i kombinasjonene med rent collagen forholdt seg stabil mellom 1 og 6 timers behandling, bortsett fra rent collagen behandlet ved 60°C. Mellom 6 og 24 timer sank mengden oppløst collagen ved 60°C i kombinasjon 1 ( $P < 0,002$ ) og ved 50°C i kombinasjon 5 ( $P < 0,005$ ).

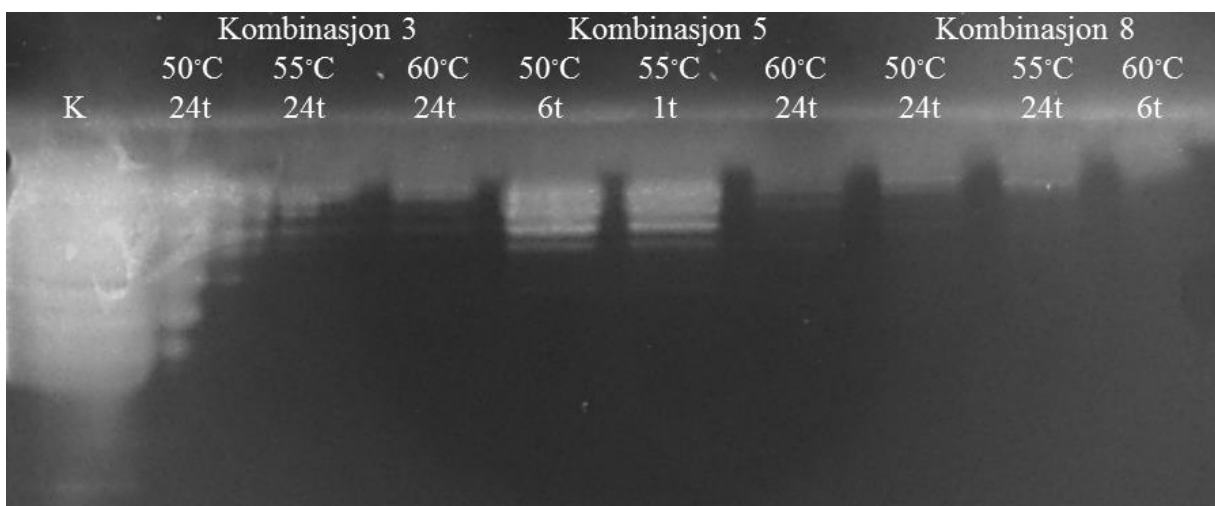


Figur 4.4: Effekten av LTLT-behandling ved 50, 55 og 60°C i 1, 6 og 24 timer på mengde oppløst collagen i kombinasjon 4, 6 og 7. Vertikale linjer representerer standardavvik.

De få dataene som fremkom hos kombinasjon 4-7 (figur 4.4) indikerte at behandlingstiden på 6 timer gir den høyeste mengden oppløst collagen ( $P < 0,01$ ). Verdiene i kombinasjon 4 økte signifikant mellom 1 til 6 timers behandling ved 60°C, selv om løsningen ikke inneholdt substrat. I kombinasjon 6 sank konsentrasjonen signifikant mellom 6 og 24 timers behandling ved 60°C. Videre kommentering av mengden oppløst collagen i kombinasjonene med opprenset collagenase ble vanskelig på grunn av manglende data.

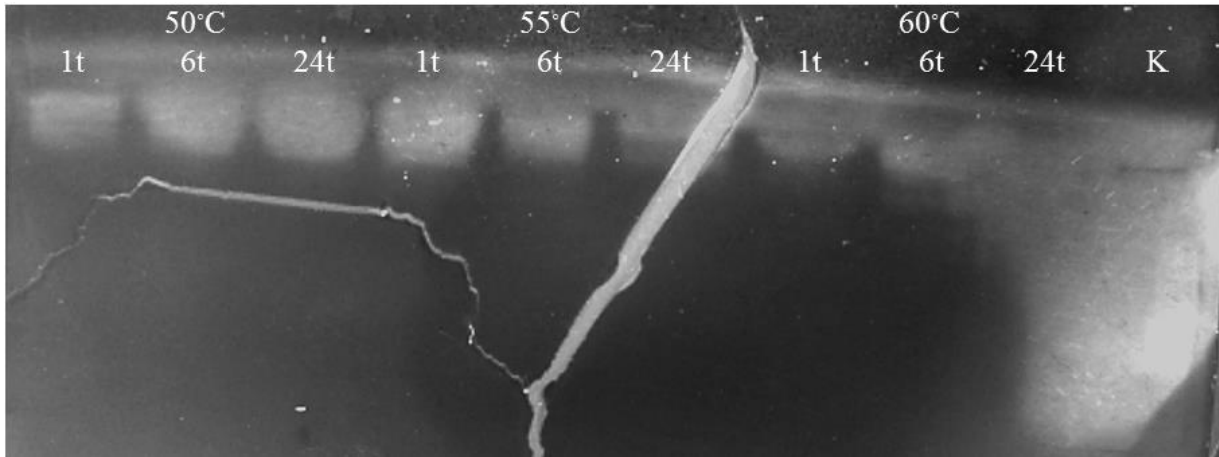
#### 4.1.3 Zymografi

Tilstedeværelsen av protein i prøvene ble også testet zymografisk på geler med gelatin. Av de åtte kombinasjonene som ble testet, gav kun kombinasjon 3, 5, 6 og 8 resultater (figur 4.5, 4.6 og 4.7). Hvite bånd representerer tilstedeværelse av enzymer som har spesifikk evne til å bryte ned gelatin, collagenase, og svarte bånd (figur 4.7) representerer tilstedeværelse av proteiner som ikke har gelatinspesifikke nedbrytningsevner.

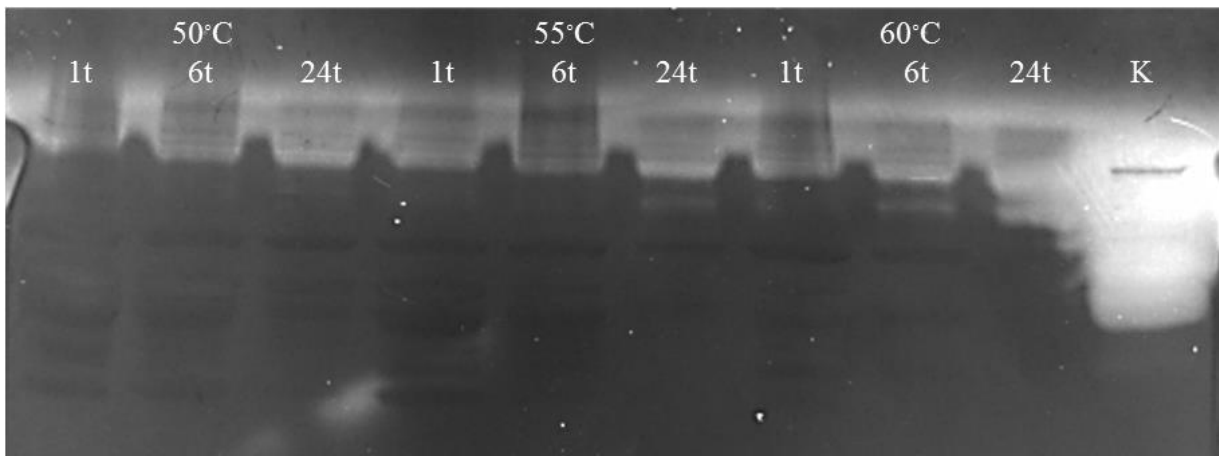


Figur 4.5: Effekten av LTLT-behandling på et utvalg av behandlinger ved 50, 55 og 60°C i 1, 6 og 24 timer på kombinasjon 3, 5 og 8 fremstilt zymografisk. K = kontroll.

Resultatene presentert i figur 4.5 viste høyest collagenaseaktivitet i kombinasjon 5 ved behandling på 50°C og 60°C i henholdsvis 6 timer og 1 time. Kombinasjon 8 viste også noe aktivitet, synkende med redusert behandlingstid og økt temperatur. Kombinasjon 3 var sannsynligvis forurenset av kontrollen, men viser noe aktivitet ved 55°C og 60°C. Zymogrammet indikerte mye av det samme som proteinkonsentrasjonsverdiene (figur 4.1 og 4.2) og mengden oppløst collagen (figur 4.3).



Figur 4.6: Effekten av LTLT-behandling ved 50, 55 og 60°C i 1, 6 og 24 timer på kombinasjon 5 fremstilt zymografisk. K = kontroll.



Figur 4.7: Effekten av LTLT-behandling ved 50, 55 og 60°C i 1, 6 og 24 timer på kombinasjon 6 fremstilt zymografisk. K = kontroll.

Figur 4.6 viste også collagenaseaktivitet hos kombinasjon 5, men tydelige forskjeller mellom behandlingene var vanskelige å skjelle. Det kan se ut som behandlingene på 50°C og 55°C ved de fleste behandlingstidene gav høyest aktivitet. Aktiviteten økte med økt behandlingstid ved 50°C. Behandling ved 60°C viste også aktivitet, men båndene var forurenset av kontrollen.

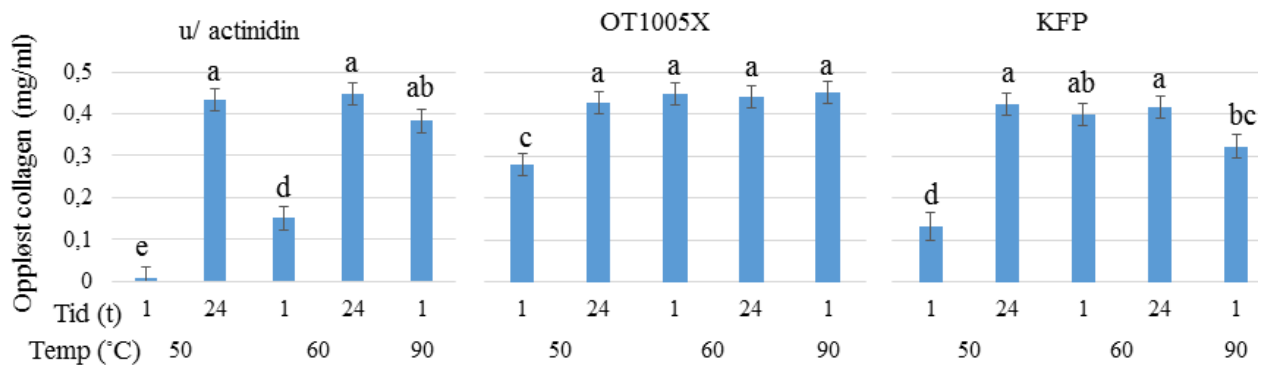
Den høyeste aktiviteten i kombinasjon 6 ble observert hos behandlingene ved 50°C og 55°C i 24 timer og ved 60°C i 6 timer. Også her virket kontrollen forurensende. Flere mørke bånd var synlige, med synkende intensitet med økt behandlingstid og temperatur.



## 4.2 Marinering i actinidin og LTLT-behandling

### 4.2.1 Bestemmelse av mengde oppløst collagen

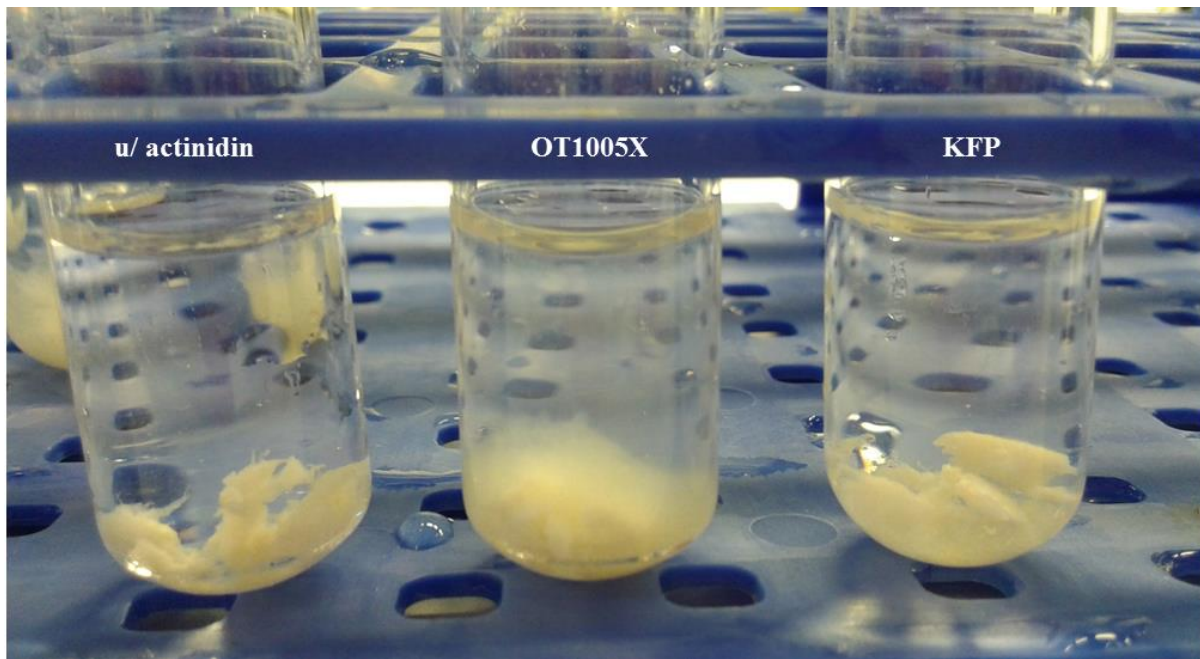
Mengde oppløst collagen i LTLT-behandlede prøver marinert i actinidin ble bestemt. Mengden varierte fra 0 til 0,45 mg oppløst collagen/ml, der behandlinger ved 50 og 60°C i 24 timer viste de høyeste verdiene, uavhengig av marinering. Både temperatur, behandlingstid, enzymvariant og interaksjoner mellom disse viste signifikant isolert effekt ( $P < 0,0001$ ) på mengde oppløst collagen i prøvene.



Figur 4.8: Effekten av LTLT-behandling ved 50, 60 og 90°C i 1 og 24 timer på mengde oppløst collagen i prøver marinert i actinidinvariantene OT1005X og KFP i 19-20 timer og i prøver uten actinidin ( $n=3$ ). Vertikale linjer representerer standardavvik.

Behandling ved 50°C i 1 time uten actinidinmarinering gav ingen signifikant effekt ( $P < 0,008$ ) på prøvenes innhold av oppløst collagen. Små, men signifikante mengder oppløst collagen ble observert i prøver behandlet uten marinering ved 60°C i 1 time og med marinering i KFP ved 50°C i 1 time. Behandling ved 50°C og ved 90°C i 1 time etter marinering i henholdsvis OT1005X og KFP viste også signifikant effekt. De høyeste verdiene ble imidlertid observert ved 50 og 60 graders behandling i 24 timer og ved 90 graders behandling i 1 time, uavhengig av marinering. Behandling ved 90°C i 1 time viste noe varierende innhold av oppløst collagen i de tre marineringsvariantene. Signifikant forskjell ble observert kun mellom prøvene marinert i OT1005X og i KFP. Prøvene marinert i OT1005X hadde gjennomgående høyest innhold, uansett behandlingstid, og skilte seg signifikant fra de fleste prøvene marinert i KFP og ren MES-buffer behandlet i 1 time. Noe mer variasjon ble observert hos prøvene marinert i KFP og hos umarinerte prøver ved varierende behandlingstid.

Figur 4.9 illustrerer tydelig forskjellen mellom effekten av de ulike actinidinmarineringene etter varmebehandling ved 90°C i 1 time. Bindevevet marinert i OT1005X ble mest påvirket, da det så meget oppløst ut. Også bindevevet marinert i KFP og i ren MES-buffer ble påvirket, men ikke i like stor grad som ved marinering i OT1005X. Flere av varmebehandlingene, spesielt ved 50°C i 24 timer og ved 60°C i 1 og 24 timer, gav samme utfall, der OT1005X tilsynelatende hadde størst påvirkning på bindevevets konsistens.



Figur 4.9: Effekten av behandling ved 90°C i 1 time på bindevev marinert henholdsvis i MES-buffer uten actinidin, OT1005X og KFP.

#### 4.2.2 Studie av marinert og LTLT-behandlet bindevev med lupe

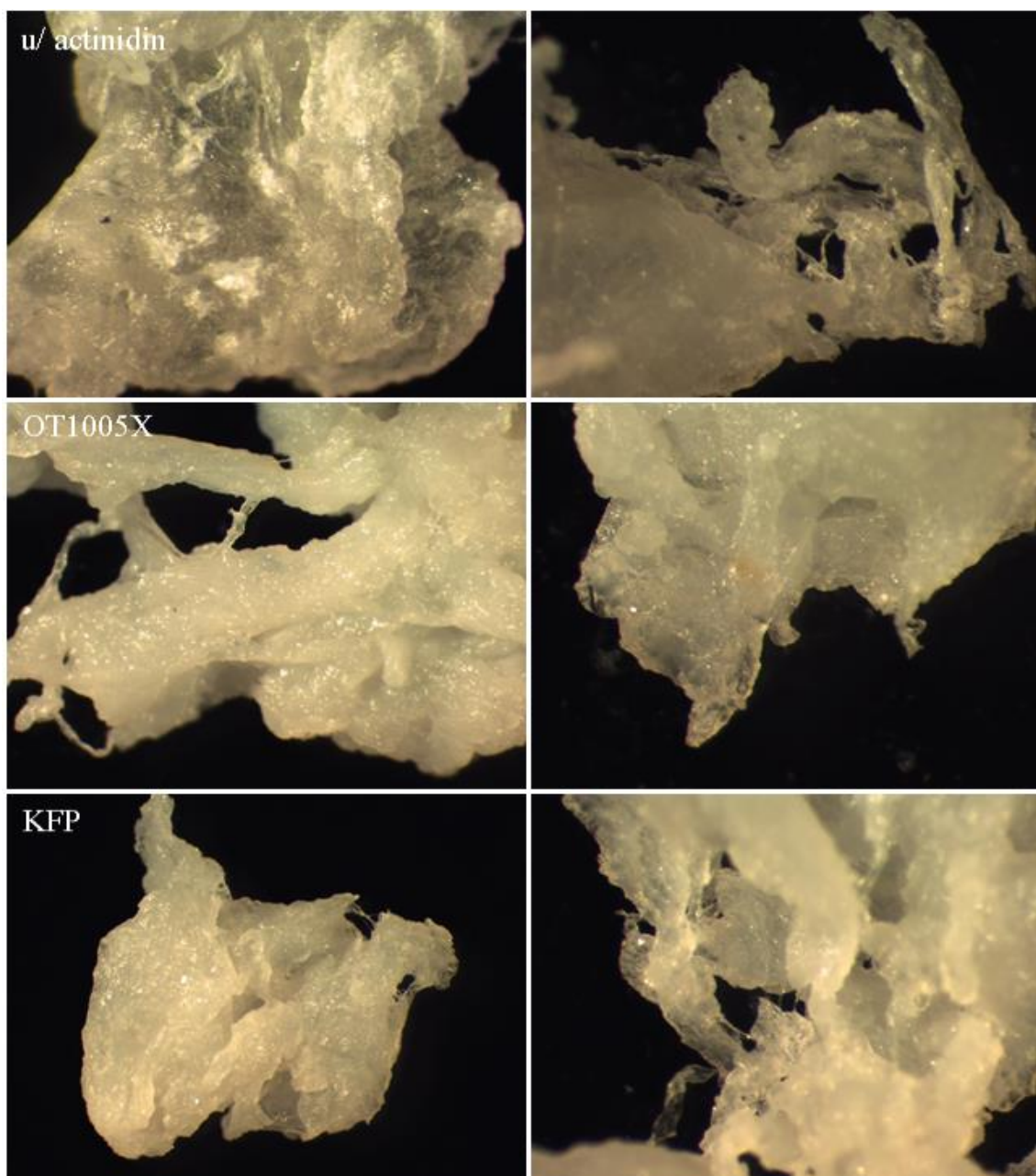
Bindevevet som ble lagret etter marinering i actinidin og LTLT-behandling, ble studert og fotografert gjennom stereolupe. Bildene av bindevevet er satt sammen og presentert i figur 4.11-4.13. Bindevev som ikke ble varmebehandlet (nullprøver) er også inkludert (figur 4.10).

Allerede før LTLT-behandlingen ble det observert forskjell mellom nullprøvene. Bindevevet marinert i OT1005X og KFP var ikke så seigt som det umarinerte bindevevet og hadde en mer grøtete overflate. Likevel inneholdt alle fibrøse områder. Bindevevet uten actinidinmarinering inneholdt spesielt tydelige fibrer, og bitene var vanskeligere å rive fra hverandre. Utseende var ikke preget av tydelig gelatinering, men hadde derimot noen hvite, tette områder.

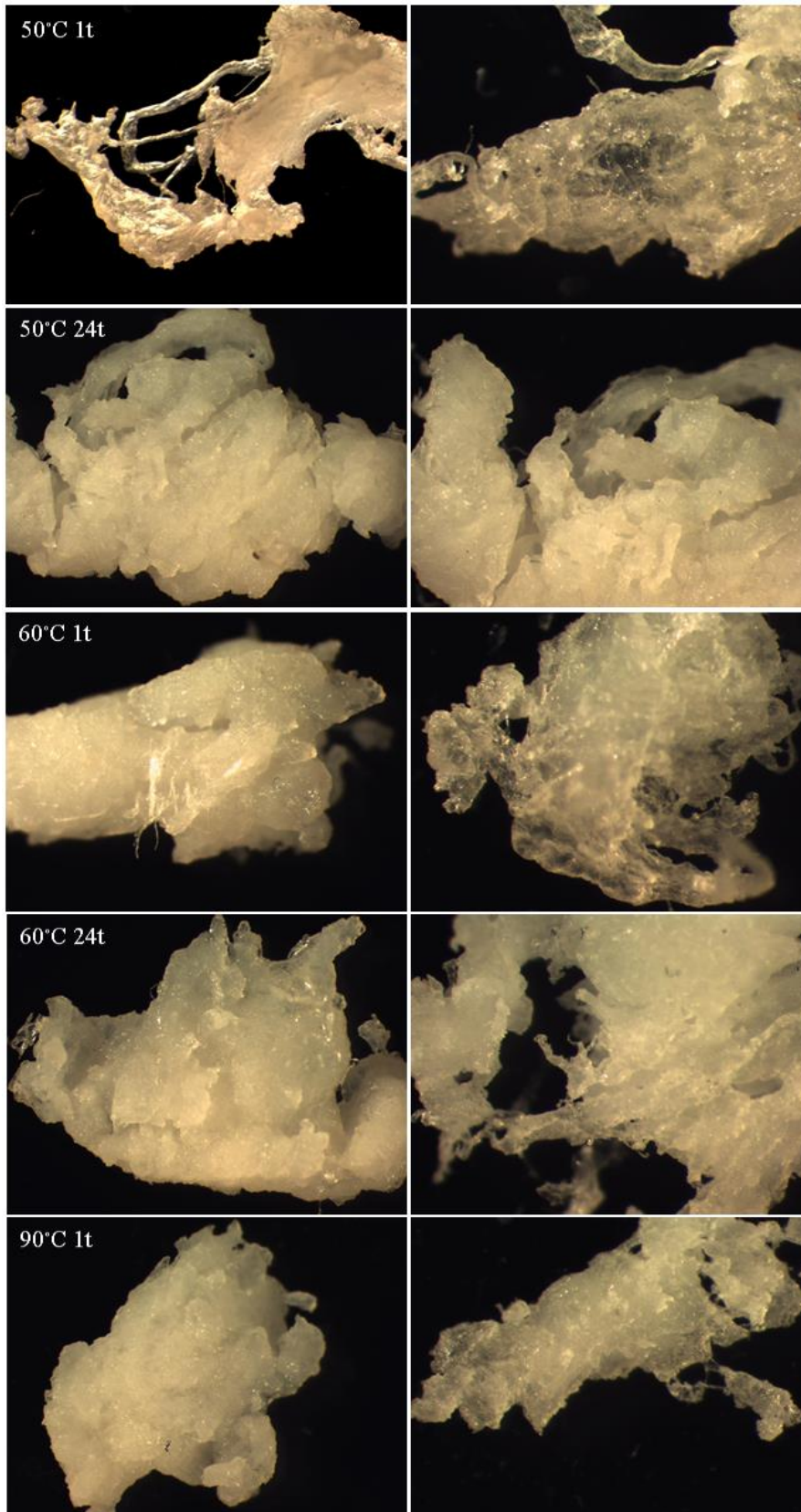
Bindevev kun påvirket av LTLT-behandlingen (figur 4.11) viste noe mer effekt enn hos nullprøvene, da overflaten var noe mindre fibrøs. Behandlingen ved 50°C i 1 time gav derimot for liten effekt på bindevevet til å kunne skille det fra nullprøvene. Det var betydelig seigere enn bindevev behandlet ved de andre temperaturene og tidene. Overflateteksturen var forandret i forhold til nullprøvene, men bindevevet hadde ikke oppnådd så mye gelatinering som det actinidinmarinerte bindevevet.

Effekten av LTLT-behandling etter marinering i OT1005X (figur 4.12) var betydelig størst, spesielt ved behandling ved 50°C i 24 timer, ved 60°C i 1 og 24 timer og ved 90°C i 1 time. Mye gelatinering gjorde overflaten helt eller delvis grøtete, og bitene ble revet fra hverandre uten problem. Enkelte fibrøse områder forekom, spesielt i bindevevet behandlet ved 50°C i 1 time, men også her var overflaten noe gelatinert.

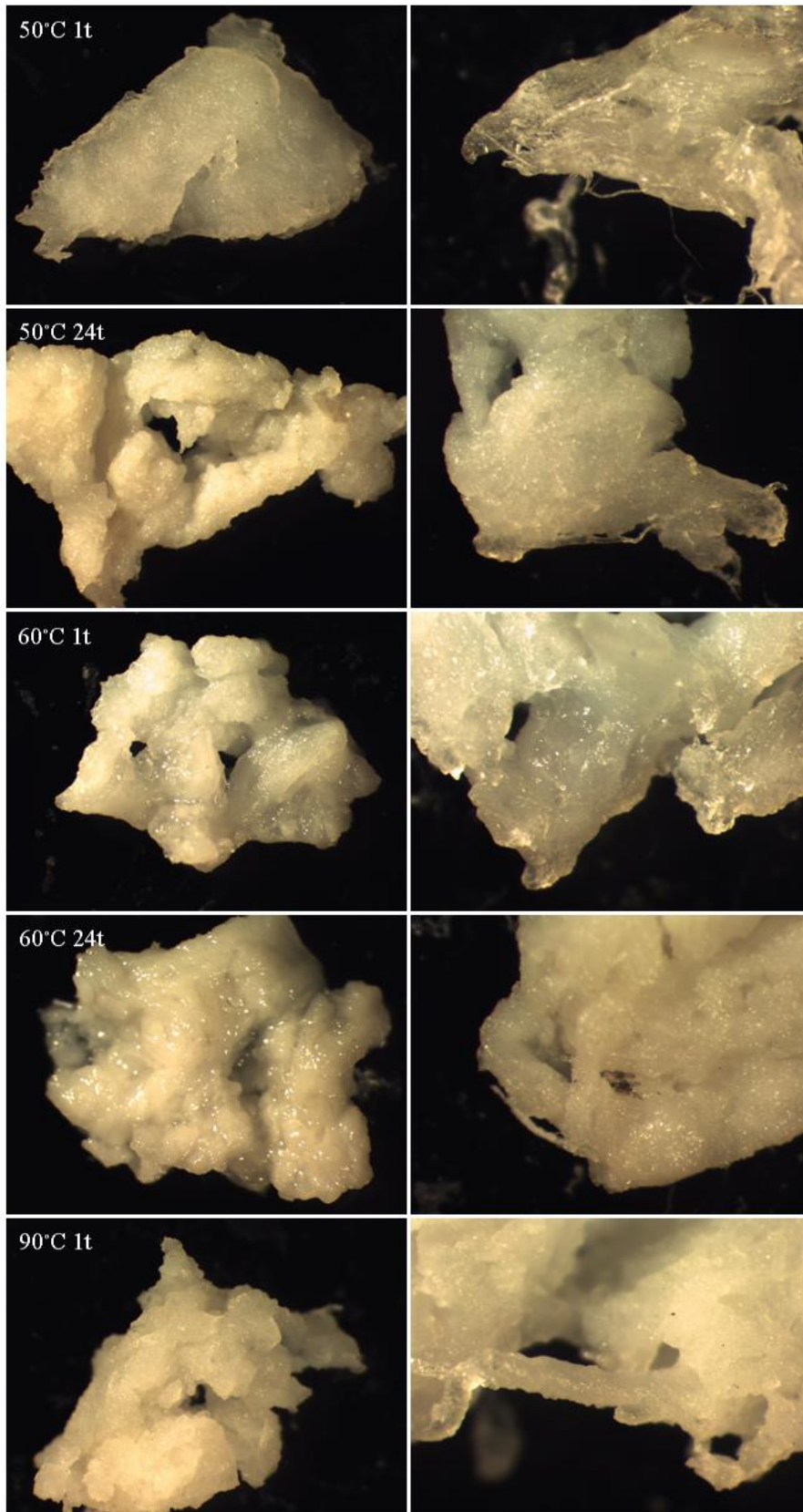
Bindevevet marinert i KFP (figur 4.13) inneholdt også fibrøse områder, mest ved 50 graders behandlingen i 1 time, men fibreene var ikke så seige som i bindevevet uten marinering. Overflaten var noe frynsete og delvis grøtete av gelatinering.



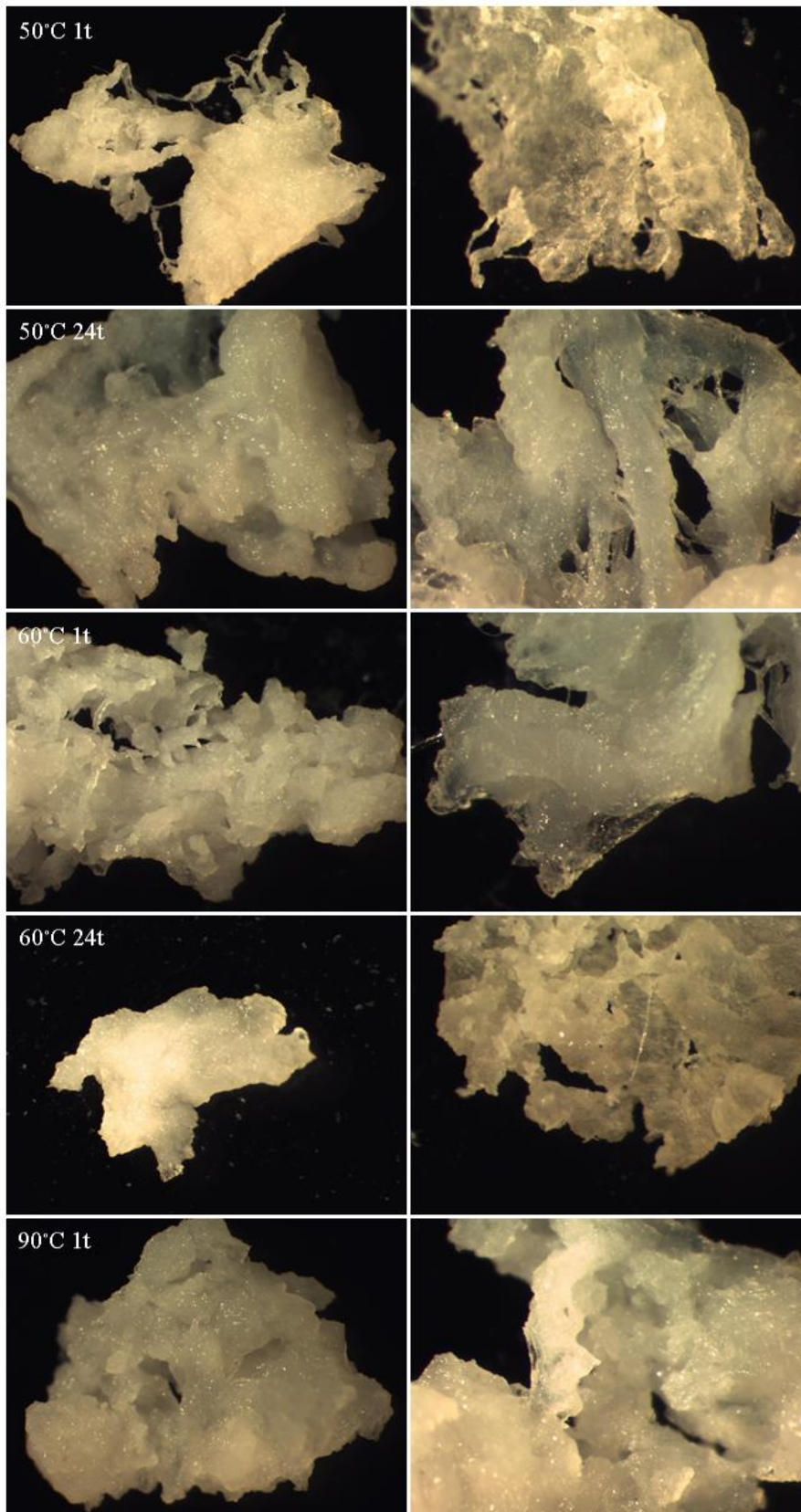
*Figur 4.10: Nullprøver av bindevev som ikke er LTLT-behandlet. Bindevevet er kun marinert i OT1005X og KFP, og i buffer uten actinidin. Bildene til venstre har en forstørrelse på 40x, der bredden på hvert bilde tilsvareer omtrent 5,6 mm. Forstørrelsen på bildene til høyre er 80x, og bildebredden svarer til omtrent 2,8 mm.*



*Figur 4.11: Bindevev LTLT-behandlet ved 50, 60 og 90°C i 1 og 24 timer uten marinering i actinidin. Bildene til venstre har en forstørrelse på 40x, der bredden på hvert bilde tilsvarer omtrent 5,6 mm. Forstørrelsen på bildene til høyre er 80x, og bildebredden svarer til omtrent 2,8 mm.*



*Figur 4.12: Bindevev LTLT-behandlet ved 50, 60 og 90°C i 1 og 24 timer etter marinering i OT1005X i 19-20 timer. Bildene til venstre har en forstørrelse på 40x, der bredden på hvert bilde tilsvarer omtrent 5,6 mm. Forstørrelsen på bildene til høyre er 80x, og bildebredden svarer til omtrent 2,8 mm.*



*Figur 4.13: Bindevev LTLT-behandlet ved 50, 60 og 90°C i 1 og 24 timer etter marinering i KFP i 19-20 timer. Bildene til venstre har en forstørrelse på 40x, der bredden på hvert bilde tilsvarer omtrent 5,6 mm. Forstørrelsen på bildene til høyre er 80x, og bildebredden svarer til omtrent 2,8 mm.*

## 5 DISKUSJON

### 5.1 LTLT-behandling med collagenase

Collagenase viste evne til å bryte ned collagen under LTLT-behandlingen. Dette vises i bestemmelsen av proteinkonsentrasjon, mengde oppløst collagen og i zymogramresultatene. Signifikante tilleggseffekter og tendenser til tilleggseffekter på collagenet og bindevevet ble observert når collagenase ble tilsatt. Proteinkonsentrasjonen ble sett på som et uttrykk for collagenaseaktiviteten og oppløsningen av collagen. Varmeindusert denaturering vil føre til oppløsning av collagenfibre og en økning i proteinkonsentrasjon, mens løselige collagenaseproteiner vil aggregere, felle ut og føre til en reduksjon i proteinkonsentrasjon. Deres bidrag til endring i konsentrasjonen vil påvirke den totale proteinkonsentrasjonen og avhenger av denatureringsgraden under LTLT-betingelser og mengdeforholdet mellom collagen og collagenase.

I bestemmelsen av proteinkonsentrasjon ble det observert signifikante mengder løst protein i alle kombinasjonene utenom i isolert bindevev og i ren collagenase (2, 3). Det skal i utgangspunktet finnes noe løst protein i disse kombinasjonene, avhengig av behandlingstid og temperatur, men verdiene ligger trolig under deteksjonsgrensen. Selv om proteinkonsentrasjonen i kombinasjonen med ren collagenase ikke er mulig å detektere, betyr det ikke at collagenasen ikke bryter ned collagen; i kombinasjonen med isolert bindevev og ren collagenase (8) ble det etter 24 timers behandling ved 50°C og 60°C observert signifikant tilleggseffekt på bindevevet i forhold til kombinasjonen med kun isolert bindevev (2). Dette indikerer at den rene collagenasen viser effektiv nedbrytning av collagen fra bindevev, men at den krever lengre behandlingstid for å oppnå signifikant effekt.

Proteinkonsentrasjonen i kombinasjonen med rent collagen (1) økte signifikant med økning i temperatur og behandlingstid. Resultatet indikerer at 60 graders behandlingen har signifikant størst effekt på oppløsningen av collagen, mens behandlingen ved 50°C i seg selv ikke klarte å løse opp collagenet når enzymer ikke var til stede. Indikasjonene på økt mengde oppløst collagen mellom 50°C og 60°C korrelerer med annen litteratur. Oppløsningen av collagen har vist signifikant økning mellom 53°C og 58°C i svin (Christensen, Erthberg et al., 2011) og i storfe (Christensen et al., 2013). Tilleggseffekten kom tydelig til uttrykk da rent collagen ble tilsatt ren collagenase (5) og førte til en tilnærmet tidobling i proteinkonsentrasjon. Cronlund og Woychik (1987), Foegeding og Larick (1986), Laakkonen, Sherbon et al. (1970) og Penfield og Meyer (1975) har alle observert positiv effekt av tilstedeværelse av collagenolytiske og/eller proteolytiske enzymer på oppløsningen av collagen under LTLT-betingelser eller ved LTLT-temperaturer med kort behandlingstid. Kombinasjonen av varme og collagenase ser dermed ut til å ha signifikant større effekt på oppløsningen av collagen enn varme alene har.

Behandlingen av rent collagen og ren collagenase (5) ved 55°C førte til en økning i proteinkonsentrasjon fra 1 til 6 timer og en redusering etter 24 timer. Den negative endringen kan indikere at collagenasen ikke tåler slike forhold, og collagenasen begynner å denaturere etter lengre tids behandling. Den lave proteinkonsentrasjonen ved 60°C indikerer også collagenasedenaturering. Laakkonen, Sherbon et al. (1970) viste at collagenolytisk aktivitet i kjøtt fra ungokse ble betydelig redusert når temperaturen økte til 60°C. Foegeding og Larick (1986) fant den høyeste collagenaseaktiviteten mellom 40°C og 60°C, mens lite eller ingen aktivitet ble observert over 60°C ved bruk av collagenase fra *Clostridium histolyticum*. Forskjellen i temperatureffekten mellom kombinasjonene med kun rent collagen (1) og med rent collagen tilsatt ren collagenase (5) skyldes derfor trolig collagenasens reduserte toleranse for temperaturer nær og over 60°C, i hvert fall ved lengre behandlinger. Resultatene stemmer overens med funnene gjort av de ovenstående forfatterne.

Det finnes flere mulige årsaker til at proteinkonsentrasjonen til kombinasjonen med rent collagen og ren collagenase (5) er tidoblet i forhold til kombinasjonen med isolert bindevev og ren collagenase (8). Selv om det isolerte bindevevet er rensset kan ikke innholdet av inhibitorer utelukkes. Effekten av collagenasen blir dermed mindre fordi inhibitorene hemmer enzymene i å bryte bindingene i bindevevet (Daboor et al., 2010). Kombinasjon 5 inneholder kun helt rene proteiner og vil ikke kunne bli påvirket av inhibitorer. Collagenasen har teoretisk sett full virkning. Forskjellen i proteinkonsentrasjon kan også skyldes ulik affinitet mellom enzym- og substratvariantene, der affiniteten mellom de to rene proteinene antas å være høyere. I tillegg var overflaten til det rene collagenet mye større og løsere enn overflaten til det kompakte isolerte bindevevet. Collagenasen vil, på grunn av denne fysiske barrieren, ha vanskeligheter med å komme til og bryte bindinger i bindevevet, mens den mye lettere vil kunne angripe det rene collagenet.

Collagenaseaktiviteten kan også inhiberes ved fravær av zink- og kalsiumioner, eller ved tilstedeværelse av kelatorer som fester seg til disse (Daboor et al., 2010). I det isolerte bindevevet og i den opprensede collagenasen finnes sannsynligvis ionene naturlig. I tillegg inneholder bufferne benyttet til opprensing av både bindevev og collagenase  $\text{CaCl}_2$ . Alderton et al. (2004) fant høy proteolytisk aktivitet ved tilstedeværelse av kalsiumioner, både med og uten zinkioner, men fravær av kalsium reduserte aktiviteten. Det må likevel tas hensyn til at collagenaseaktiviteten ikke nødvendigvis reagerer på samme måte som den totale aktiviteten til proteolytiske enzymer ved tilstedeværelse eller fravær av de aktuelle ionene. I tillegg avhenger kravet på zink av collagenasetypen (Daboor et al., 2010).

Proteinkonsentrasjonen i kombinasjonene med opprenset collagenase (4, 6, 7) var høy, men i motsetning til økningen i de andre kombinasjonene, ble den redusert med økt behandlingstid. Den negative endringen skyldes trolig denaturering av andre proteiner og enzymsystemer som finnes i tillegg til collagenase i den opprensede collagenaseløsningen. Den positive effekten av collagenase og varme på oppløsningen av collagen overskygges dermed av den dominerende negative endringen hos proteinene når de denaturerer ved økende behandlingstid og temperatur. Også her gav behandlingen ved  $60^\circ\text{C}$  den signifikant laveste proteinkonsentrasjonen, noe som igjen indikerer at collagenase og eventuelle andre enzymsystemer har lav toleranse for temperaturer omkring  $60^\circ\text{C}$  (Laakkonen, Sherbon et al., 1970; Penfield og Meyer, 1975).

Den betydeligste reduksjonen i proteinkonsentrasjon i kombinasjonene med opprenset collagenase ble observert mellom 1 og 6 timers behandling ved de aller fleste temperaturer. Laakkonen, Sherbon et al. (1970) viste at collagenaseaktiviteten avtar på ulike stadier i varmebehandlingen avhengig av muskelen brukt i eksperimentet, og Christensen, Erthberg et al. (2011) fant at collagen løses opp mer effektivt med økt behandlingstid. Det kan derfor tyde på at denatureringen av collagenasen hovedsakelig skjedde i tidlige stadier av behandlingen, at mer effektiv varmeindusert denaturering av collagen ble indusert av økt behandlingstid, eller en kombinasjon av disse.

Proteinkonsentrasjonen i kombinasjonen med kun opprenset collagenase flater ut noe mindre mellom 6 og 24 timers behandlingen enn kombinasjonene med opprenset collagenase og substrat. Dette skyldes sannsynligvis collagenasens bidrag til oppløsning av collagen. Differansen mellom kombinasjon 7 og 4 resulterer i en økning i proteinkonsentrasjon med økt tid og illustrerer den «reelle» effekten av varmeindusert denaturering og enzymatisk nedbrytning av rent collagen. Her førte 24 timers behandlingen ved  $55^\circ\text{C}$  til størst effekt på proteinkonsentrasjonen og korrelerte noenlunde med effekten av tid og temperatur på konsentrasjonen i kombinasjonen med rent substrat og enzym (5). Videre tolkninger og sammenligninger av kombinasjon 4, 6 og 7 blir vanskelig, da den opprensede collagenasen inneholder for mange forstyrrende faktorer.



Før LTLT-behandlingen ble aktiviteten i ren og opprenset collagenase bestemt og sammenlignet ved hjelp av to metoder for å finne et mengdeforholdet som kunne brukes i de ulike kombinasjonene. Sammenligningen ble vanskelig, da enzymvariantene viste aktivitet på hvert sitt substrat. I metoden basert på Christensen, Ertbjerg et al. (2011) ble flere ulike konsentrasjonsforhold mellom enzymløsning (50 mg/l) og aktiveringsbuffer utprøvd, fra 1:149 til 100:50, men ingen av dem gav signifikante resultater for ren collagenase. Det er mulig at det syntetiske substratet ikke var spesifikt nok til at den rene collagenasen reagerte. Metoden som målte collagenasens evne til nedbrytning av torskegelatin viste ingen signifikant aktivitet hos opprenset collagenase. Gelatin fra oksekjøtt ble også utprøvd, med den hensikt å teste en eventuell bedring i affinitet til produkter fra samme dyr, men med samme utfall. En økning i temperatur og/eller behandlingstid eller bruk av et annet substrat hadde muligens ført til signifikante resultater.

Flere forstyrrende faktorer gjør at aktiviteten i ren og opprenset collagenase ikke direkte kan sammenlignes. I motsetning til ren collagenase inneholder opprenset collagenase mange flere proteiner og enzymesystemer, i tillegg til inhibitorer som også vil påvirke aktiviteten. På grunn av innholdet av inhibitorer i opprenset collagenase vil differansen i Unit mellom enzymvariantene kunne reduseres, da opprenset collagenase viste mest aktivitet. Varierende grad av enzymenes affinitet til de ulike substratene oppfattes også som en forstyrrende faktor. I tillegg er ikke nødvendigvis enzymenes optimumstemperatur den samme.

Signifikante mengder oppløst collagen ble observert i nesten alle de LTLT-behandlede prøvene. Temperaturparameteret hadde i de fleste tilfeller liten eller ingen innvirkning på oppløsningen av collagen, mens behandlingstiden gav noe mer signifikant bidrag. Oppløsningen av collagen i kombinasjonene med rent collagen (1) og rent collagen med ren collagenase (5) ble lite signifikant påvirket av endringer i behandlingstid eller temperatur. Tendenser til tilleggseffekt ( $P < 0,1$ ) ble observert i kombinasjon 5, trolig på grunn av den større kombinerte effekten av varme- og enzympåvirkning, som også er funnet i annen litteratur (Cronlund og Woychik, 1987). Tidligere forskning har funnet at økt behandlingstid fører til økt mengde oppløst collagen (Christensen, Ertbjerg et al., 2011; Christensen et al., 2013). Årsaken til at behandlingstiden ikke fører til signifikant økt mengde oppløst collagen i de aktuelle kombinasjonene i dette eksperimentet er usikker. Laakkonen, Sherbon et al. (1970) fant at collagenaseaktiviteten avtar på ulike stadier i varmebehandlingen avhengig av muskeltypen. Det kan derfor hende at mesteparten av collagenoppløsningen har skjedd på et tidlig stadium i behandlingen.

Behandlingstiden hadde signifikant positiv effekt på mengden oppløst collagen i kombinasjonene med isolert bindevev (2) og isolert bindevev med ren collagenase (8) ved alle temperaturer. Resultatene stemmer overens med tidligere funn gjort i kjøtt fra svin (Christensen, Ertbjerg et al., 2011), ku og ungokse (Christensen et al., 2013). I tillegg ble det observert en tendens til tilleggseffekt ved tilsetning av ren collagenase (8) ved 55°C etter 24 timers behandling. Dette indikerer økt collagenoppløsning som følge av collagenaseaktivitet og korrelerer med tidligere funn (Cronlund og Woychik, 1975; Laakkonen, Sherbon et al., 1970).

Allerede etter 1 times behandling inneholdt kombinasjon 5 mye oppløst collagen, mens kombinasjon 8 krevde 24 timers behandling før mengden nådde samme nivå. Årsaken kan ha vært høyere affiniteten mellom rent collagen og ren collagenase enn mellom isolert bindevev og ren collagenase. Som tidligere beskrevet var det rene collagenet veldig løst og overflaten stor, mens det isolerte bindevevet var kompakt og kan ha skapt fysiske hindringer som har gjort det vanskelig for collagenasen å angripe peptidbindingene. I tillegg kan eventuelle inhibitorer i det isolerte bindevevet ha svekket collagenasens aktivitet (Daboor et al., 2010). Men på grunn av den lave tilleggseffekten av collagenase i kombinasjon 5 i forhold til 1, er det mest sannsynlig at overflateforskjeller og affinitet bidrar mest til forskjellen i mengden oppløst collagen.

Som forventet ble ikke ren collagenase (3) påvirket signifikant av verken behandlingstid eller temperatur, da løsningen ikke inneholdt substrat. Siden opprenset collagenase (4) heller ikke inneholdt bindevev, men fremdeles viste signifikante verdier, er det mulig at noen av verdiene er feilmålinger. Resultatet fra resten av kombinasjonene med opprenset collagenase (6, 7) mangler en god del målinger, og de oppnådde verdiene oppfattes som svært usikre. Videre sammenligninger mellom kombinasjonene med opprenset collagenase utføres derfor ikke. En interessant observasjon er at av alle kombinasjonene med opprenset collagenase fantes det ingen resultater fra behandlingene ved 55°C. Høy grad av hydrolysering i cryorrørene gjorde at prøvene lakk ut av rørene. Dette kan tyde på størst effekt på bindevevet ved 55 graders behandling.

Flere av resultatene gav også indikasjoner på at behandling ved 55°C etter bestemte behandlingstider førte til større effekt på oppløsning av collagen enn ved 60 graders behandling. I kombinasjonen med rent collagen (1) var mengden oppløst collagen signifikant større ved 55°C enn ved 60°C etter 1 times behandling. Tendenser til forskjell mellom de to behandlingene ble også observert i kombinasjonene med isolert bindevev (2) og med isolert bindevev og ren collagenase (8), henholdsvis etter 6 og 24 timers behandling. Verdiene fra 50 graders behandlingene gav derimot ingen indikasjoner ved noen av tidsintervallene på økt eller redusert effekt på bindevevet i forhold til de andre behandlingene. Bruggemann et al. (2009) viste ved hjelp av DSC (0,2°C/min) og SGH-mikroskopi at ubehandlet collagen fra *Biceps femoris* fra svin starter denaturering ved 57°C. Det er også funnet at collagen kan denaturere ved 53°C dersom behandlingstiden forlenges (Christensen, Ertbjerg et al., 2011). Likevel burde prøvene behandlet ved 50°C hatt det laveste innholdet av oppløst collagen, men dette ble ikke observert i dette studiet. I studiet til Christensen et al. (2013) ble det i *Semitendinosus* fra ungekse observert mindre forskjeller mellom temperaturens påvirkning på bindevevets effekt på seigheten sammenlignet med kukjøtt. Dette kan tyde på at kjøttet brukt i dette studiet kom fra ungekse, og at kryssbindingene var såpass lite varmestabile at også behandlingene ved 50°C kunne bryte dem.

Måten økt mengde oppløst collagen relateres til redusert WBSF og økt mørhet er fremdeles uklar, men flere studier har funnet sammenhenger mellom disse parameterne i *Longissimus dorsi* og *Semitendinosus* fra svin (Christensen, Ertbjerg et al., 2011) og *Pectoralis*, *Semitendinosus* og *Longissimus dorsi* (Bouton og Harris, 1981), *Adductor*, *Biceps femoris*, *Gracilis*, *Semitendinosus* og *Semimembranosus* (Bramblett et al., 1959), *Semitendinosus* (Christensen et al., 2013), *Semitendinosus* (Christensen et al., 2000), *Trapezius* (Cronlund og Woychik, 1987), *Longissimus*, *Rectus femoris*, *Semitendinosus* (Laakkonen, Wellington, et al., 1970) ) og *Semitendinosus* (Penfield og Meyer, 1975) fra storfe. Ut ifra de nevnte studiene er det forventet at mengden oppløst collagen korrelerer negativt med WBSF.

Christensen, Ertbjerg et al., (2011) og fant at WBSF sank betraktelig mellom 53°C og 58°C i *Longissimus dorci* og *Semitendinosus* fra svin, samtidig som de observerte en signifikant økning i mengden oppløst collagen. Penfield og Meyer (1975) fant en økning i oppløsningen av collagen mellom 50°C og 60°C i *Semitendinosus* fra ungokse da WBSF sank i samme intervall. WBSF var i *Longissimus dorci* fra ungdyr av storfe lavest ved 60 graders behandling etter både 1 og 24 timer (Bouton og Harris, 1981). Det er også vist at WBSF reduseres helt til 65°C (Vaudagna et al., 2002). Det er dermed uklart hvorfor mengden oppløst collagen i dette studiet viste tendenser til mer påvirkning av 55 graders behandlingene enn behandlingene ved 60°C. Det kan tenkes at kjøttet benyttet i eksperimentene kom fra et ungdyr, der behandlingstemperaturen hadde mindre å si for nedbrytningen av kryssbindingene i collagen. Derimot er det funnet at også WBSF i ungdyr varierer med behandlingstemperatur (Bouton og Harris, 1981). En annen årsak kan være at tilstedeværelsen av collagenase har påvirket collagenet i større grad ved 55°C, da det er vist at collagenaseaktiviteten avtar ved temperaturer nær 60°C (Foegeding og Larick, 1986; Laakkonen, Sherbon et al., 1970).

I bestemmelsen av mengde oppløst collagen i prøvene ble det under varmebehandlingen på 115°C mistet flere paralleller. Varmebehandlingen gikk mest utover de prøvene som inneholdt opprenset collagenase (4, 6, 7) (figur 4.4). Ved enkelte behandlinger ble alle parallellene fra en kombinasjon mistet. Grunnet praktiske årsaker ble cryorrørene varmebehandlet liggende. En kombinasjon av syrens styrke og høy grad av hydrolysering gjorde at væsken lakk ut mellom røret og korken. Oppnådde verdier betraktes som usikre på grunn av et minimalt antall paralleller. Det ukomplette datasettet gjør dermed at statistikken blir usikker, og at flere av behandlingene ikke kan sammenlignes. Ved videre behandlinger i varmeskap på så høye temperaturer bør rørene stå oppreist i for eksempel sand. Tapet av flere paralleller førte til at standardavvikene ble relativt store. Antall signifikante forskjeller mellom effekten av behandlingene er dermed i fåtall. Årsaken kan være mangel på tilleggseffekter av tilstedeværelse av enzym. Dette vil bli diskutert senere sammen med den samme problemstillingen i actinidineksperimentet. Det ble observert en uventet reduksjon i mengden oppløst collagen i kombinasjon 1, 5 og 6, henholdsvis ved 60°C, 50°C og 60°C, etter 24 timers behandling. Ettersom nedbrytningen av collagen til mindre peptider er en irreversibel reaksjon, som i diagrammene kun kan vises som stabile eller økende kurver, blir verdiene antatt som åpenbare feilmålinger.

Resultatene fra collagenaseeksperimentet ble også fremstilt zymografisk (figur 4.5-4.7). Kombinasjonene med rent collagen (1) og isolert bindevev (2) ble ikke inkludert, da disse ikke inneholdt tilsatt collagenase med evne til å angripe gelen. Av usikre årsaker gav ikke kombinasjonene med opprenset collagenase (4) eller rent collagen og opprenset collagenase (7) resultater. Resultatene fra resten av kombinasjonene (3, 5, 6 og 8) korrelerte betydelig med mange av de parallelle resultatene fra bestemmelsen av proteinkonsentrasjon og mengden oppløst collagen.

Tegn til gelatinnedbrytning med kun ren collagenase (3) ble observert ved 55°C og 60°C da gelen fungerte som substrat for collagenasen. Dessverre var det ikke mulig å sammenligne effekten av de ulike behandlingene på nedbrytningen av gelen på grunn av forurensninger fra kontrollen. Som forventet viste ren collagenase ingen signifikante verdier i bestemmelsen av oppløst collagen på grunn av mangel på substrat. Proteinkonsentrasjonen var heller ikke signifikant, som tidligere diskutert trolig var på grunn av lav deteksjonsgrense. Likevel ble tilstedeværelsen av aktiv collagenase i kombinasjon 3 påvist grunnet de synlige hvite båndene i zymogrammet.

I motsetning til mengden oppløst collagen, korrelerte proteinkonsentrasjonen i kombinasjonen med rent collagen og ren collagenase (5) svært bra med de tilhørende zymogrammene (figur 4.5 og 4.6). Behandlingen ved 50°C og 55°C hadde størst effekt både på proteinkonsentrasjonen og på nedbrytning av gelen, da disse båndene var mest intense og i flertall. I tillegg indikerte båndene i figur 4.6 en økning i collagenaseaktivitet ved 50°C og en reduksjon ved 55°C når behandlingstiden ble økt fra 1 til 24 timer. Den samme endringen ble observert i resultatene fra bestemmelsen av proteinkonsentrasjon. Behandlingen ved 60°C gav færrest og svakest bånd, noe som kan indikere redusert collagenaseaktivitet rundt denne temperaturen. Resultatet styrkes av tilsvarende observasjoner i proteinkonsentrasjon i tillegg til observasjoner gjort av Foegeding og Larick (1986) og Laakkonen, Sherbon et al. (1970), som fant redusert collagenaseaktivitet over 60°C.

Også i zymogrammet til kombinasjonen med isolert bindevev og ren collagenase (8) viste 60 graders behandlingen minst effekt på nedbrytningen av gelen og indikerer igjen redusert collagenaseaktivitet med økt temperatur. På grunn av de relativt store standardavvikene i bestemmelsen av mengde oppløst collagen og proteinkonsentrasjon var det ikke mulig å finne signifikante forskjeller mellom effekten av temperaturene på collagenaseaktiviteten og på oppløsningen av collagen. Zymogrammet indikerer derimot mest effekt på nedbrytningen av collagen ved behandling ved 50°C og 55°C og minst effekt ved 60°C. Det skal tas hensyn til at behandlingstidene er ulike, da det er mulig at 60 gradersbåndet hadde vært tydeligere etter 24 timers behandling enn etter 6 timer. De tre behandlingene produserte relativt svake bånd i forhold til hos kombinasjon 5 og 6 og tyder på liten nedbrytning av collagen i bindevevet og gelatin i gelen. Observasjonen korrelerer med funnene gjort i bestemmelsen av proteinkonsentrasjon og mengde oppløst collagen, der resultatene gav indikasjoner på at affinitets- og overflateforskjeller førte til redusert collagenaseaktivitet og oppløsning av collagen.

De hvite båndene i zymogrammet til kombinasjonen med isolert bindevev og opprenset collagenase (6) indikerte en økning i collagenaseaktivitet med økt behandlingstid, der aktiviteten var høyest etter 24 timer. I motsetning til kombinasjonene med ren collagenase (5 og 8) viste kombinasjon 6 like høy collagenaseaktivitet i zymogrammet ved 60°C etter 24 timers behandling som ved 50°C og 55°C. Dette kan skyldes innholdet av mange andre proteiner, fra både bindevevet og den opprensede collagenasen, som på en eller annen måte har dannet fysiske hindringer omkring collagenasen slik at den ikke blir denaturert av varmen like effektivt. Zymogrammet påviste tilstedeværelse av mange andre proteiner i den opprensede collagenaseløsningen, da flere mørke bånd var synlige på gelen (figur 4.7). Som tidligere nevnt har sannsynligvis proteinenes negative effekt på proteinkonsentrasjonen overskygget den positive effekten av collagenaseaktivitet og varme på oppløsningen av collagen og dermed ført til at summen av proteininnholdet i stedet ble redusert med økt behandlingstid. På grunn av at aktiviteten hos collagenasen og proteinene i zymogrammet er ulikt farget, viser den isolerte effekten av collagenaseaktivitet at oppløsningen av collagen øker med økt behandlingstid.

Resultatene fra de ulike analysene viste at rent collagen og isolert bindevev påvirkes av både behandlingstid og temperatur, både med og uten tilstedeværelse av collagenase. Flere studier har vist at oppløsningen av collagen påvirkes positivt av tilstedeværelsen av collagenase i storfe (Cronlund og Woychik, 1987; Foegeding og Larick, 1986; Laakkonen, Sherbon et al., 1970) og av andre proteolytiske enzymer i storfe (Penfield og Meyer, 1975). Signifikante tilleggseffekter og tendenser til tilleggseffekter ble observert i flere av kombinasjonene med tilstedeværelse av collagenase. Dette gir indikasjoner på at collagenase kan indusere oppløsning av collagen, og at kombinasjonen av varme- og enzympåvirkning gir større effekt på oppløsningen enn varme kan alene.

Mangel på flere og mer signifikante tilleggseffekter kan skyldes eventuelle inhibitorer, redusert affinitet mellom enzym og substrat og fysiske hindringer forårsaket av den kompakte overflaten i isolert bindevev. Det er tenkelig at affiniteten avhenger av typen collagen og collagenase ettersom det finnes flere varianter med ulike egenskaper (Lepetit, 2008; Tornberg, 2005). I tillegg forventes det at affiniteten mellom isolert bindevev og ren collagenase og mellom rent collagen og opprenset bindevev er lavere enn mellom to rene stoffer. Aktiviteten til flere typer collagenaser svekkes ved fravær av kalsium og zink (Daboor et al., 2010), men dette er blitt tatt høyde for i eksperimentet, da bufferne var tilpasset assayene og inneholdt de nødvendige stoffene.

Samtlige av de diskuterte resultatene viste mindre effekt av behandling ved 60°C enn ved 55°C på proteinkonsentrasjon og oppløsning av collagen. Det er påstått at collagenase er aktiv i et stort temperaturintervall; 20-40°C (Daboor et al., 2010) og 37-59°C (Laakkonen, Sherbon et al., 1970). Collagenase fra *Clostridium histolyticum* viser seg å være mest aktiv mellom 40°C og 60°C, der aktiviteten avtar betydelig over 60°C (Foegeding og Larick, 1986). Laakkonen, Sherbon et al. (1970) fant den høyeste collagenaseaktiviteten i oksekjøtt ved 37°C ved pH 7,7, etterfulgt av en reduksjon til et minimalt nivå ved 60°C. Det antas derfor at collagenase har lav toleranse for temperaturer nær eller over 60°C, i hvert fall ved lengre behandlingstider, og begynner å denaturere under slike forhold.

Selv om collagenase denaturerer med økt temperatur, burde likevel varmpåvirkningen kunne kompensere for tapet av videre oppløsningen av collagen induert av collagenase, ettersom det er vist at også kun varme har signifikant effekt på bindevevet, og at økt temperatur opp mot 60°C fører til en ytterligere økning i oppløsningen av collagen (Christensen et al., 2013; Christensen et al., 2000). Flere studier har målt WBSF og funnet en sammenheng med oppløsningen av collagen. Studiene viser at i temperaturintervallet der WBSF reduseres, mellom 50°C og 65°C, øker oppløsningen av collagen signifikant (Christensen, Ertbjerg et al., 2011; Christensen et al., 2013; Penfield og Meyer, 1975).

Målinger som tydeligst viste den samme effekten av temperatur på bindevev som andre studier også har kommet frem til, ble observert under bestemmelsen av proteinkonsentrasjonen i kombinasjonen med rent collagen (1). Diagrammet (figur 4.1) viser tydelig økningen i mengden oppløst collagen fra 50 til 60 graders behandling, der de største signifikante forskjellene observeres etter 24 timer. Som observert i andre studier (Christensen, Ertbjerg et al., 2011; Christensen et al., 2013; Penfield og Meyer, 1975), førte behandling ved 50°C til minimal påvirkning på bindevevet ved alle tidsintervallene, mens den største påvirkningen ble observert ved 60°C.

Årsaken til at det ble observert større påvirkning på collagen og bindevev ved 55°C enn ved 60°C er usikker. I kombinasjonene med opprenset collagenase (4, 6, 7) er årsaken nokså klar. Ettersom collagenaseaktivitet og proteolytisk aktivitet reduseres ved temperaturer nær 60°C (Foegeding og Larick, 1986; Laakkonen, Sherbon et al., 1970; Penfield og Meyer, 1975), vil sannsynligvis denatureringen av enzymene redusere proteinkonsentrasjonen mest ved den høyeste temperaturen (figur 4.2). Det kan tenkes at effekten av kombinasjonen av collagenaseaktivitet og behandling ved 55°C på collagen og bindevev er større enn effekten av behandling ved 60°C alene, dersom det antas at collagenasen er denaturert ved denne temperaturen. Dersom kjøttet benyttet i studiet er fra et ungdyr, er sannsynligheten stor for at en større del av kryssbindingene ikke er blitt varmestabile (Lepetit, 2008; Tornberg, 2005), og behandlingstemperaturen vil dermed ha mindre innvirkning på oppløsningen av collagen. I studiet til Christensen et al. (2013) ble det observert at ulike temperaturer, 53-63°C, hadde svært varierende effekt på bindevevets effekt på seigheten i kjøtt fra ku, mens i ungoke gav alle temperaturene noenlunde lik effekt ved behandlinger lenger enn 8 timer. Samtidig er det funnet varierende WBSF i kjøtt fra ungdyr avhengig av temperatur.

Det kan virke som at den optimale temperaturen for økt denaturering og oppløsning av collagen observert i dette studiet er noe lavere enn i andre. Ved sammenligninger med andre studier bør det tas hensyn til om kjøttet behandles helt eller *in vitro*. Ved behandling av helt kjøtt vil bindingene i collagen være mindre eksponert for direkte varme- og enzympåvirkning som følge av fysiske barrierer. Det er dermed logisk at mer varme må tilføres for at bindingene skal bli brutt, noe som kan forårsakes av økt temperatur og/eller behandlingstid. Bindingene i rent collagen eller bindevev vil ved *in vitro*-behandling være mer eksponert for ytre påvirkninger ettersom de ikke er beskyttet av fysiske hindringer. Det er derfor mulig at temperaturintervallet der bindevevet i behandlet kjøtt blir påvirket mest er parallellforskjøvet nedover ved *in vitro*-behandling av isolert bindevev eller rent collagen. En annen medvirkende faktor i bindevevets tilsynelatende reduserte temperaturoverfølelse i *in vitro*-studier kan være bruken av SDS i opprensingsprosedyren. SDS er et sterkt løsemiddel, som i studiet ble benyttet for å fjerne muskelfiberrester, men det kan også ha bidratt til å svekke bindingene i bindevevet og dermed redusert denatureringstemperaturen.

## 5.2 Marinering i actinidin og LTLT-behandling

Forhåndsmarinering av isolert bindevev med actinidin gav en signifikant økning i mengden oppløst collagen ved flere av temperaturene og behandlingstidene. Som forventet ble noen av de laveste verdiene av oppløst collagen observert i prøver marinert i ren MES-buffer og de høyeste hos prøvene marinert i actinidin. Også her ble noen av parallellene mistet under varmebehandlingen på 115°C som en følge av høy grad av hydrolysering. Et tilnærmet komplett datasett gjør derimot at statistikken betraktes som tilstrekkelig pålitelig.

Varmen fra behandlingen på 50°C i 1 time uten actinidinmarinering var ikke er tilstrekkelig til å påvirke bindevevets denaturering og oppløsning signifikant. På grunn av den relativt lave temperaturen og den korte behandlingstiden har sannsynligvis ikke collagenet i bindevevet begynt å denaturere. Andre studier har også funnet at temperaturer rundt 50°C fører til betydelig mindre collagenoppløsning, i hvert fall ved behandlinger kortere enn 5 timer (*Longissimus dorci* og *Semiteminosus* fra svin) (Christensen, Ertbjerg et al., 2011). De forhåndsmarinerte prøvene behandlet ved 50°C i 1 time viste noe høyere effekt på bindevevet, der OT1005X påvirket oppløsningen mer enn KFP. Mengden oppløst collagen i disse prøvene er en direkte avspeiling av enzymaktiviteten.

Leverandørene oppgir i sin produktinformasjon enzymenes optimumstemperatur. OT1005X har en optimumstemperatur på 20°C, men aktivitet kan observeres helt fra 2°C til 38°C (<http://www.foodprocessing.com.au>). Optimumstemperaturen til KFP oppgis som 55°C til 60°C (<http://www.kiwienzyme.com>). På grunn av den høye optimumstemperaturen til KFP, antas det at enzymet har liten aktivitet ved kjøleskapstemperatur (6°C). Minimalt bidrag til oppløsning av collagen under marineringen er derfor forventet av KFP. Det antas at KFP først under LTLT-behandlingen vil bli aktiv nok til å påvirke bindevevet. OT1005X er aktivt helt ned til 2°C og vil påvirke oppløsningen av collagen under hele marineringen. Enzymet vil derimot vise minimal aktivitet under LTLT-behandlingen, da det denatureres allerede ved 38°C. Dersom det antas at behandlingen ved 50°C i 1 time gav minimal effekt på bindevevet, er de observerte søylene i figur 4.8 en direkte avspeiling av effekten forhåndsmarineringen har på bindevevet. Søylene høyde korrelerer med actinidinvariantenes aktivitet ved oppgitt optimumstemperatur.

Bindevevet behandlet på 90°C har sannsynligvis krympet mer og gelatinert mindre på grunn av den høye temperaturen og viste derfor ikke like høye verdier som ved 50°C og 60°C, bortsett fra prøvene marinert i OT1005X. Sugiyama et al., (2005) fant at den proteolytiske aktiviteten i kiwifruktjuice ved 80°C kun førte til nedbrytning av allerede denaturert collagen, og Wada et al., (2004) varmet reaksjonsløsningene opp til 90°C for å stoppe videre enzymatiske reaksjoner etter endt varmebehandling. Dette, sammen med leverandørens informasjon om de optimale temperaturene til actinidinvariantene benyttet i eksperimentet, indikerer at temperaturer over 80°C hemmer enzymaktiviteten og fører til mindre oppløsning av collagen. Grunnet høyest aktivitet under marineringen er det logisk at prøvene marinert i OT1005X inneholder mest oppløst collagen etter endt 90 graders behandling. Mengden oppløst collagen i prøvene uten actinidin var ikke signifikant forskjellig fra mengden i prøvene marinert i OT1005X eller KFP ( $P>0,05$ ). Dette indikerer igjen minimal eller ingen enzymaktivitet under varmebehandlingen, og bindevevet antas å ha blitt påvirket hovedsakelig av varmen i 90 graders behandlingen.

På forhånd var det forventet å observere signifikant tilleggseffekt av forhåndsmarineringen, ettersom actinidin og kiwijuice tidligere har vist positiv effekt på oppløsning av collagen (Christensen et al., 2009; Sugiyama et al., 2005; Wada et al., 2004) og reduksjon i WBSF (Aminlari et al., 2009; Christensen et al., 2009; Sugiyama et al., 2005; Toohey et al., 2011), men denne observeres ikke. Selv om OT1005X og KFP har ulike optimumstemperaturer og dermed er aktive ved ulike deler av behandlingen, ble det overraskende nok observert få signifikante forskjeller mellom behandlingene, uavhengig av tid, temperatur og actinidinvariant. Ut i fra andre studier burde innholdet av oppløst collagen vært betydelig høyere i de marinerte prøvene, og det burde kunne observeres flere signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingstidene og temperaturene benyttet i eksperimentet.

Mangel på tilstrekkelige mengder collagen i løsningene kan ha vært en mulig årsak til de få observerte forskjellene mellom behandlingene. Det var derimot betydelige mengder synlig bindevev igjen i alle rørene etter LTLT-behandlingen. Avhengig av forholdet mellom elastin og collagen kan det hende at det resterende bindevev hovedsakelig var elastin. Likevel er dette usannsynlig, da elastin kun utgjør en liten del av bindevevet (Baldwin, 2012). Det kan også tenkes at enzymene har hatt vanskeligheter med å komme til de aktuelle bindingene på grunn av redusert affinitet eller eventuelle konformasjonsendringer i enten bindevevet eller enzymene under LTLT-behandlingen.

Metodikken er trolig den mest sannsynlige årsaken til fraværet av signifikant forskjell mellom behandlingene, både i collagenase- og actinidink eksperimentet. En tommelfingerregel sier at absorpsjonen bør ligge mellom 0 og 1 for å unngå en eventuell avbøyning av en i utgangspunktet lineær standardkurve. I eksperimentene ble relativt høye absorpsjonsverdier målt, nesten helt opp til 2,5. Absorpsjonsverdiene i standardkurven var også høye, i tillegg til at de formet en logaritmisklignende kurve. Årsaken til de høye verdiene er sannsynligvis at prøvene og standardløsningene var altfor konsentrerte. På grunn av den høye konsentrasjonen av oppløst collagen kan det hende at mengden fargereagens brukt i eksperimentet ikke var tilstrekkelig til å farge alt substratet. Uten tilstrekkelige mengder fargereagens vil absorpsjonen oppnå en øvre grense, og det vil i dette eksperimentet ikke kunne observeres signifikante forskjeller mellom prøver med høyere innhold enn ~0,4 mg oppløst collagen/ml. Figur 4.9 illustrerer fint de visuelle forskjellene mellom de tre marineringsvariantene etter behandling ved 90°C i 1 time og styrker påstanden om at en begrensning under fargemålingen må ha skjedd i prøvene med det høyeste innholdet av oppløst collagen. For å bekrefte dette må det foretas nye målinger i et nytt studie. Kombinasjon 4, 6 og 7 fra collagenaseeksperimentet viste verdier opp mot 0,8 mg/ml, men disse blir antatt til å være lite pålitelige.

Bildene av marinert og LTLT-behandlet bindevev (figur 4.10-4.13) korrelerte sterkt med prøvenes mengde oppløst collagen (figur 4.8). Bildene av nullprøvene uten varmebehandling vil ikke kunne sammenlignes med verdiene da disse på forhånd ble trukket fra. Nullprøvene viste likevel tydelig effekt av enzymmarineringen. Prøvene behandlet ved 50°C i 1 time var i stor grad preget av fibrøse områder, spesielt ved marinering i ren MES-buffer og i KFP. Dette indikerer lite gelatinering og korrelerer sterkt med den lave graden av collagenoppløsning presentert i figur 4.8 og i andre studier. Oppløsning av collagen viste seg å være signifikant lavere ved temperaturer rundt 50°C enn ved 60°C, spesielt når behandlingstiden var kort (Christensen, Ertbjerg et al., 2011; Christensen et al., 2013).

I motsetning til verdiene i figur 4.8, som viste jevnt høyt innhold av oppløst collagen uansett behandlingstid og temperatur, ble det i bildene av bindevevet observert større forskjeller mellom behandlingene, spesielt ved OT1005X-marineringen. Bindevevet marinert i OT1005X viste noe grøtete overflate etter behandling ved 90°C i 1 time, men tydeligst påvirket var bindevevet behandlet ved 50°C i 24 timer og ved 60°C i 1 og 24 timer. Her var overflaten svært klumpete og geleaktig, og en merkbar forandring i teksturen ble observert. Det var mye lettere å dra bitene fra hverandre, og ingen synlige fibrer var til stede. Effekten av forhåndsmarineringen med actinidin på bindevevet kom tydeligere til uttrykk i bildene enn i søylediagrammet i figur 4.8. Dette styrker hypotesen om at forhåndsmarinering i actinidin fører til en tilleggseffekt i oppløsningen av collagen, men på grunn av begrensninger i fargemålingen, ble den ikke observert i diagrammet.

Det fremkommer av actinidineksperimentet gode indikasjoner på at actinidin har hatt signifikant effekt på oppløsningen av collagen i bindevev fra oksekjøtt. Resultatene indikerer at mengden oppløst collagen i prøvene marinert i OT1005X og KFP ble mest påvirket av behandlingene ved 50°C i 24 timer og ved 60°C i 1 og 24 timer, selv om flere og mer signifikante tilleggseffekter var forventet. Andre studier har også funnet effekt av både actinidin og kiwifruktjuice på bindevev. Toohey et al. (2011) viste at WBSF i *Semimembranosus* fra okse injisert med en kiwifrukt-basert løsning ble signifikant redusert etter 1 og 14 dager ved 4°C i forhold til i kjøtt injisert med vann. I actinidininjisert *Biceps femoris* fra svin ble WBSF redusert med 50% etter lagring i 9 dager ved 2°C i forhold til i kjøtt som ikke ble injisert, der actinidin også hadde signifikant innvirkning på oppløsningen av collagen (Christensen et al., 2009). Signifikant reduksjon i WBSF ble også observert i varmebehandlet oksekjøtt og isolert bindevev fra oksekjøtt ved tilstedeværelse av actinidin og kiwifruktjuice (Aminlari et al., 2009; Sugiyama et al., 2005).

Ingen av de nevnte studiene utførte LTLT-behandling på kjøttet, og forfatteren bekjent er det ingen som har sett på effekten av både actinidinmarinering og LTLT-behandling på bindevev fra oksekjøtt. Direkte paralleller kan ikke dras mellom de nevnte studienes resultater og resultatene oppnådd i dette studiet. Likevel virker oppnådd resultat sannsynlig ettersom flere studier viser at denaturering og oppløsning av collagen øker mellom ~50°C til ~60°C og ved lang behandlingstid (Christensen, Ertbjerg et al., 2011; Christensen et al., 2013), og at marinering i actinidin har en tilleggseffekt på collagenoppløsning og WBSF (Aminlari et al., 2009; Christensen et al., 2009; Toohey et al., 2011).

Actinidin oppfattes som en viktig bidragsyter i mørningen av kjøtt både med og uten varmebehandling. I tillegg er det i svinekjøtt vist at marinering i actinidin har få bieffekter på for eksempel smak, lukt og saftighet (Christensen et al., 2009). Sammenlignet med ficin og papain, har actinidin mindre innvirkning på nedbrytning av muskelfibrene og fører til en mer ønskelig tekstur i kjøttet (Aminlari et al., 2009; Christensen et al., 2009). Aminlari et al. (2009) konkluderer med at fordi det kun trengs en liten mengde actinidin som ikke trenger være helt ren for å gi effekt, kan bruk av dette enzymet i kjøttindustrien være en økonomisk fordel.



Selv om verdier fra collagenase- og actinidineksperimentet ikke er statistisk sammenlignet, kan det se ut som at mengden oppløst collagen i prøvene marinert i actinidin var noe høyere. I tillegg er de mer pålitelige ettersom en mindre del av datasettet ble påvirket og ødelagt av varmebehandlingen ved 115°C. Laakkonen, Sherbon et al. (1970) viste at optimal pH for collagenase var rundt 7,5 ved 37°C, og Katsaros et al. (2009) oppgav at den proteolytiske aktiviteten i kiwijuice har et optimum på rundt pH 6 ved 30°C. pH-verdiene til bufferne benyttet i eksperimentene var også forskjellige; 7,5 i collagenaseeksperimentet og 5,5 i actinidineksperimentet, og det blir dermed vanskelig å sammenligne virkningen på bindevevet. Men ettersom collagenase finnes i naturlige konsentrasjoner i kjøtt, vil injeksjoner med eller marinering i actinidin kunne tilføre ytterligere påvirkning på bindevevets oppløsning.

Det er ukjent hvor gammelt kjøttet var da det ble brukt i eksperimentet, men så lenge alle kjøttstykkene har ligget like lenge under samme forhold, har sannsynligvis ikke lagringstiden påvirket kjøttets kvalitet eller enzymaktivitet ulikt. Bryan (2004) opplyser om at den laveste temperaturen for patogen vekst ligger omkring -1°C. Da kjøttet har ligget stabilt på -80°C har det heller ikke blitt utsatt for patogen påvirkning under lagringen. Under eksperimentforberedelser utført på laboratoriet ble det arbeidet i kaldt miljø for å holde enzymaktiviteten i prøvene på et minimum frem til analyse. Det konkluderes med at verken lagringstid, tilstedeværelse av patogener eller eksperimentutførelse har bidratt til betydelige påvirkninger i oppnådde resultater. Åpenbare feilmålinger ble fjernet ved hjelp av Pivot-diagrammer.

## 6 KONKLUSJON

I studiet ble effekten av varmeindusert denaturering og enzymatisk nedbrytning av rent collagen og isolert bindevev fra oksehøyrygg under LTLT-betingelser studert *in vitro*. Collagenase og actinidin ble tilsatt for å finne eventuelle tilleggseffekter av proteolytisk aktivitet på oppløsningen av collagen.

Oppnådde resultater i collagenaseeksperimentet viste at oppløsningen av rent collagen og collagen i isolert bindevev ble påvirket av både temperatur, behandlingstid og tilstedeværelse av collagenaseaktivitet, der aktiviteten også ble påvirket av temperatur og behandlingstid. Observerte tilleggseffekter på collagenoppløsningen ved tilstedeværelse av ren og opprenset collagenase gir indikasjoner på at kombinasjonen mellom varme- og collagenasepåvirkning kan gi større effekt på oppløsningen av collagen enn varme kan alene. Flere av de oppnådde resultatene indikerte at 55 graders behandlingene gav mest effekt på collagenet og bindevevet. Den optimale behandlingstiden varierte noe med kombinasjonen av substrat- og enzymvariant, men lå som regel på 24 timer. Collagenaseaktiviteten var lavest ved 60 graders behandlingene.

I actinidineksperimentet viste både OT1005X og KFP signifikant effekt på oppløsningen av collagen i bindevev fra oksehøyrygg. Tilleggseffekten av tilstedeværelsen av actinidin var tydeligst ved 50 og 60 graders behandlingene etter 1 time. Sammenlignet med prøvene uten actinidin, viste de forhåndsmarinerte prøvene med OT1005X og KFP signifikante mengder oppløst collagen ved hver av de utførte behandlingene. Resultatet indikerer at behandling ved 50°C i 1 time ved fravær av actinidin eller eventuelle andre proteolytiske enzymer ikke er tilstrekkelig nok til å denaturere og bryte ned collagen i det isolerte bindevevet. Mengden oppløst collagen i de actinidinmarinerte prøvene behandlet ved 50°C i 1 time illustrerer dermed den isolerte effekten av actinidin på bindevevet, og indikerer bedre effekt av OT1005X enn av KFP. Etersom OT1005X også var aktiv under forhåndsmarineringen gav det mer effekt på bindevevet behandlet ved 90°C i 1 time sammenlignet med KFP. Det ble observert høy oppløsning av collagen ved de fleste av behandlingene uavhengig av actinidinvariant. OT1005X viste noe bedre effekt på bindevevet enn KFP, henholdsvis ved 50 og 90 graders behandlingen i 1 time.

Studiet av det forhåndsmarinerte og varmebehandlede bindevevet i lupe gjorde det lettere å skille mellom effekten av de ulike behandlingstidene og temperaturene. Bindevevet var i stor grad påvirket av flere av behandlingene, men det konkluderes med at forhåndsmarinering i OT1005X og behandling ved 60°C i 24 timer gav størst effekt på oppløsningen av collagen i bindevevet.

## LITTERATURLISTE

- Aaslyng, M. D., Bejerholm, C., Ertbjerg, P., Bertram, H. C., & Andersen, H. J. (2003). Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. *Food Quality and Preference*, 14(4), 277-288.
- Agarwal, S. K. (1990). Proteases cathepsins - A view. *Biochemical Education*, 18(2), 67-72.
- Alderton, A. L., Means, W. J., Kalchayanand, N., McCormick, R. J., & Miller, K. W. (2004). Bovine metalloprotease characterization and in vitro connective tissue degradation. *J Anim Sci*, 82(5), 1475-1481.
- Aminlari, M., Shekarforoush, S., Gheisari, H., & Golestan, L. (2009). Effect of actinidin on the protein solubility, water holding capacity, texture, electrophoretic pattern of beef, and on the quality attributes of a sausage product. *J Food Sci*, 74(3), C221-C226.
- Anonym (2015). Utvikling i norsk kosthold 2014. Helsedirektoratet. Oslo.
- Ashie, I. N. A., Sorensen, T. L., & Nielsen, P. M. (2002). Effects of Papain and a Microbial Enzyme on Meat Proteins and Beef Tenderness. *J Food Sci*, 67(6), 2138-2142.
- Bailey, A. J. (1972). The basis of meat texture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23(8), 995-1007.
- Baldwin, D. E. (2012). Sous vide cooking: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1(1), 15-30.
- Belew, J. B., Brooks, J. C., McKenna, D. R., & Savell, J. W. (2003). Warner–Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. *Meat Sci*, 64(4), 507-512.
- Beltrán, J., Bonnet, M., & Ouali, A. (1992). Comparative action of cathepsins B and L on intramuscular collagen as assessed by differential scanning calorimetry. *Meat Sci*, 32(3), 299-306.
- Bendall, J. R., & Restall, D. J. (1983). The cooking of single myofibres, small myofibre bundles and muscle strips from beef *M. Psoas* and *M. Sternomandibularis* muscles at varying heating rates and temperatures. *Meat Sci*, 8(2), 93-117.
- Boleman, S. J., Boleman, S. L., Miller, R. K., Taylor, J. F., Cross, H. R., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Shackelford, S. D., Miller, M. F. & West, R. L. (1997). Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *Journal of animal science – Menasha then Albany then Champaign Illinois*, 75, 1521-1524.
- Bouton, P. E., Harris, P. V., & Ratcliff, D. (1981). Effect of cooking temperature and time on the shear properties of meat. *J Food Sci*, 46(4), 1082-1087.
- Bouton, P. E., & Harris, P. V. (1972). The effects of cooking temperature and time on some mechanical properties of meat. *J Food Sci*, 37(1), 140-144.
- Bouton, P. E., & Harris, P. V. (1981). Changes in the Tenderness of Meat Cooked at 50–65°C. *J Food Sci*, 46(2), 475-478.
- Bradford, G. E. (1999). Contributions of animal agriculture to meeting global human food demand. *Livestock Production Science*, 59(2–3), 95-112.
- Bramblett, V. D., Hostetler, R. L., Vail, G. E., & Draudt, H. (1959). Qualities of beef as affected by cooking at very low temperatures for long periods of time. *Food Technology*, 13(12), 707-711.
- Brunvoll, F., Berge, G., Hoem, B., Holmengen, N., Holstvedt, S., Nordbeck, O. E., Skullerud, H., Smith, T., Vinju, E. (2009). Bærekraftig forbruk, Vurdering av mulige indikatorer. Statistisk sentralbyrå. Avdeling for økonomi-, energi- og miljøstatistikk/Seksjon for miljøstatistikk.
- Bryan, F. L. (2004). The “danger zone” reevaluated. *Food Safety Mag*, 10, 55-69.
- Brüggemann, D. A., Brewer, J., Risbo, J., & Bagatolli, L. (2010). Second harmonic generation microscopy: A tool for spatially and temporally resolved studies of heat induced structural changes in meat. *Food biophysics*, 5(1), 1-8.

- Calloway, D. H., Murphy, S. P., Beaton, G. H., Allen, L., Horan, H., Merrill, K., . . . Bwibo, N. (1988). Food intake and human function: a cross-project perspective of the Collaborative Research Support Program in Egypt Kenya and Mexico.
- Christensen, L. B. (2012). Low temperature long time heat treatments of meat, Effects on changes in meat quality and the underlying mechanisms. PhD thesis. Department of food science, Faculty of science, University of Copenhagen. ISBN 978-87-7611-543-0
- Christensen, L., Bertram, H. C., Aaslyng, M. D., & Christensen, M. (2011). Protein denaturation and water-protein interactions as affected by low temperature long time treatment of porcine *Longissimus dorsi*. *Meat Sci*, 88(4), 718-722.
- Christensen, L., Ertbjerg, P., Aaslyng, M. D., & Christensen, M. (2011). Effect of prolonged heat treatment from 48 degrees C to 63 degrees C on toughness, cooking loss and color of pork. *Meat Sci*, 88(2), 280-285.
- Christensen, L., Ertbjerg, P., Loje, H., Risbo, J., van den Berg, F. W., & Christensen, M. (2013). Relationship between meat toughness and properties of connective tissue from cows and young bulls heat treated at low temperatures for prolonged times. *Meat Sci*, 93(4), 787-795.
- Christensen, L., Gunvig, A., Torngren, M. A., Aaslyng, M. D., Knochel, S., & Christensen, M. (2012). Sensory characteristics of meat cooked for prolonged times at low temperature. *Meat Sci*, 90(2), 485-489.
- Christensen, M., Purslow, P. P., & Larsen, L. M. (2000). The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. *Meat Sci*, 55(3), 301-307.
- Christensen, M., Tørngren, M. A., Gunvig, A., Rozlosnik, N., Lametsch, R., Karlsson, A. H., & Ertbjerg, P. (2009). Injection of marinade with actinidin increases tenderness of porcine *M. Biceps femoris* and affects myofibrils and connective tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1607-1614.
- Cover, S. (1937). The Effect of Temperature and Time of Cooking on the Tenderness of Roasts.
- Cronlund, A. L., & Woychik, J. H. (1987). Solubilization of Collagen in Restructured Beef with Collagenases and  $\alpha$ -Amylase. *J Food Sci*, 52(4), 857-860.
- Daboor, S. M., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, S.-L., & Dave, D. (2010). Extraction and purification of collagenase enzymes: A critical review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(4), 239.
- Davey, C. L., & Gilbert, K. V. (1974). Temperature-dependent cooking toughness in beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(8), 931-938.
- Ertbjerg, P., Christiansen, L. S., Pedersen, A. B. & Kristensen, L. (2012). The effect of temperature and time on activity of calpain and lysosomal enzymes and degradation of desmin in porcine *Longissimus* muscle. *Proceedings 58th International Congress of Meat Science & Technology (Paper 358), 12–17 August, Montreal, Canada* (pp. 12–17).
- Foegeding, E. A., & Larick, D. K. (1986). Tenderization of beef with bacterial collagenase. *Meat Sci*, 18(3), 201-214.
- Ha, M., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A., & Hopkins, D. L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chem*, 134(1), 95-105.
- Han, J., Morton, J. D., Bekhit, A. E. D., & Sedcole, J. R. (2009). Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness. *Meat Sci*, 82(3), 324-330.
- Hernández-Herrero, M. M., Duflos, G., Malle, P., & Bouquelet, S. (2003). Collagenase activity and protein hydrolysis as related to spoilage of iced cod (*Gadus morhua*). *Food Research International*, 36(2), 141-147.

- Johnson, K. M., Nelson, C. L., & Busta, F. F. (1983). Influence of Temperature on Germination and Growth of Spores of Emetic and Diarrheal Strains of *Bacillus cereus* in a Broth Medium and in Rice. *J Food Sci*, 48(1), 286-287.
- Kang, C. K., & Rice, E. E. (1970). Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *J Food Sci*, 35(5), 563-565.
- Katsaros, G., Katapodis, P., & Taoukis, P. (2009). Modeling the effect of temperature and high hydrostatic pressure on the proteolytic activity of kiwi fruit juice. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 40-45.
- Kolar, K. (1990). Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*, 73(1), 54-57.
- Koohmaraie, M., Wheeler, T., & Shackelford, S. (1995). Beef tenderness: regulation and prediction. *Proc. Meat*, 95, 1-10.
- Laakkonen, E., Sherbon, J. W., & Wellington, G. H. (1970). Low-temperature, long-time heating of bovine muscle 3. Collagenolytic Activity. *J Food Sci*, 35(2), 181-184.
- Laakkonen, E., Wellington, G. H., & Sherbon, J. W. (1970). Low-temperature, long-time heating of bovine muscle 1. Changes in Tenderness, Water-Binding Capacity, pH and Amount of Water-Soluble Components. *J Food Sci*, 35(2), 175-177.
- Lepetit, J. (2008). Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Sci*, 80(4), 960-967.
- Marsh, B. B. (1977). The Basis of Quality in Muscle Foods. *J Food Sci*, 42(2), 295-297.
- Martens, H., Stabursvik, E., & Martens, M. (1982). Texture and colour changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscle proteins. *Journal of Texture Studies*, 13(3), 291-309.
- McCabe-Sellers, B. J., & Beattie, S. E. (2004). Food safety: Emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(11), 1708-1717.
- McCormick, R. J. (1999). Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poultry Science*, 78(5), 785-791.
- Miller, M. F., Carr, M. A., Ramsey, C. B., Crockett, K. L., & Hoover, L. C. (2001). Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *J Anim Sci*, 79(12), 3062-3068.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chem*, 62(4), 415-424.
- Murphy, S., & Allen, L. (1997). A greater intake of animal products could improve the micronutrient status and development of children in East Africa. Paper presented at the East Africa Livestock Assessment Workshop Proceedings.
- Parsons, S. E., & Patterson, R. L. S. (1986). Assessment of the previous heat treatment given to meat products in the temperature range 40–90 C. Part 2: Differential scanning calorimetry, a preliminary study. *International journal of food science & technology*, 21(5), 123-131.
- Penfield, M. P., & Meyer, B. H. (1975). Changes in tenderness and collagen of beef *Semitendinosus* muscle heated at two rates. *J Food Sci*, 40(1), 150-154.
- Rødbotten, R., Solgaard, K., & Johannessen, T. C. (2015). Effect of kiwi fruit powder in tenderizing *M. Triceps brachii* from mature cows. *Meat Sci*, 101(0), 117.
- Shimokomaki, M., Elsdon, D. F., & Bailey, A. J. (1972). Meat tenderness: Age related changes in bovine intramuscular collagen. *J Food Sci*, 37(6), 892-896.
- Solvig, H. (2014). The effect of proteolytic lysosomal enzymes and cathepsin B on collagen and connective tissue denaturation during long time low temperature cooking. Master thesis. Faculty of science and technology. Stavanger University.
- Stabursvik, E., & Martens, H. (1980). Thermal denaturation of proteins in post rigor muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(10), 1034-1042.

- Sugiyama, S., Hirota, A., Okada, C., Yorita, T., Sato, K., & Ohtsuki, K. (2005). Effect of kiwifruit juice on beef collagen. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 51(1), 27-33.
- Sugiyama, S., Ohtsuki, K., Sato, K., & Kawabata, M. (1997). Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 43(5), 581-589.
- Thompson, J. (2002). Managing meat tenderness. *Meat Sci*, 62(3), 295-308.
- Toohey, E., Kerr, M., van de Ven, R., & Hopkins, D. (2011). The effect of a kiwi fruit based solution on meat traits in beef *M. Semimembranosus* (topside). *Meat Sci*, 88(3), 468-471.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci*, 70(3), 493-508.
- Tuomy, J. M., Lechnir, R. J., & Miller, T. (1963). Effect of Cooking Temperature and Time on Tenderness of Beef. *Food Technology*, 17(11), 1457.
- van der Zijpp, A. J. (1999). Animal food production: the perspective of human consumption, production, trade and disease control. *Livestock Production Science*, 59(2-3), 199-206.
- Vaudagna, S. R., Sánchez, G., Neira, M. S., Insani, E. M., Picallo, A. B., Gallinger, M. M., & Lasta, J. A. (2002). Sous vide cooked beef muscles: effects of low temperature-long time (LT-LT) treatments on their quality characteristics and storage stability. *International journal of food science & technology*, 37(4), 425-441.
- Wada, M., Hosaka, M., Nakazawa, R., Kobayashi, Y., & Hasegawa, T. (2004). The solubilization of unheated cattle Achilles tendon with actinidin under neutral and acidic conditions. *Food science and technology research*, 10(1), 35-37.
- Wada, M., Suzuki, T., Yaguti, Y., & Hasegawa, T. (2002). The effects of pressure treatments with kiwi fruit protease on adult cattle *Semitendinosus* muscle. *Food Chem*, 78(2), 167-171.
- Warriss, P. D. (2001). *Meat science*: Cabi.
- Weston, A., Rogers, R., & Althen, T. (2002). Review: The role of collagen in meat tenderness. *The Professional Animal Scientist*, 18(2), 107-111.
- Whitfield, F. B., & Mottram, D. S. (1992). Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 31(1-2), 1-58.
- Zamora, R., & Hidalgo, F. J. (2005). Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1), 49-59.

Nettsider

<http://www.kiwienzyme.com/kiwi-fruit-extracts>. Lastet ned 22.01.15

<http://www.foodprocessing.com.au/content/ingredients/product/cuisine-resources-ot1-5x-kiwi-fruit-powder-extract-for-meat-tenderisation--963448190>. Lastet ned 22.01.15

## APPENDIX 1

### Kombinasjonsoversikt

Komb	Substrat	Enzym
1	Rent collagen	-
2	Isolert bindevev	-
3	-	Ren collagenase
4	-	Opprenset collagenase
5	Rent collagen	Ren collagenase
6	Isolert bindevev	Opprenset collagenase
7	Rent collagen	Opprenset collagenase
8	Isolert bindevev	Ren collagenase

## APPENDIX 2

### Determination of collagenase activity

#### Reagents:

Buffer: Tris-HCl + CaCl<sub>2</sub> (used for purification)

Substrate: Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC

Standard/product: 7-amino-4-methyl-coumarin

#### Stop buffer:

100 mM sodium hydroxid	4 g
30 mM sodium acetat	4,0825g
70 mM 100% acetic acid	4 ml
100 mM chloroacetic acid	9,45 g

Adjust volume to 1 l and pH to 4.3

#### Enzyme activity measurements:

**XX** (from 1-100) µl sample is added **XXX** (from 50-149) µl activation buffer (150µl in total). Mix in an Eppendorf tube – heat to 40°C in a water bath. Add 100 µl 12,5 µM substrate mixture and incubate for 10 min at 40°C. Add 1 ml stop buffer – mix. A blind sample is made by 150µl activationbuffer. After incubation stop buffer is added and then the substrate.

After adding stop buffer + mixing 250 µl sample, standards and blinds are transferred to the wells of a **black** 96 well microtiterplate.

Fluorescens is measured on Fluoroskan with excitation and emission wavelengths of 355 nm and 460 nm, respectively.

#### Substrate:

##### **Stock solution:**

10 mM Z-Phe-Arg-Nmec/AMC            0,0065 g

Dissolve in 1 ml DMSO (dimethylsulfoxid), store frozen at -20°C.

##### **Substrate solution:** (keep in darkness)

Dilute stock solution to 12,5 µM in MilliQ water before use (800\*): Dilute 12,5 µl 10 mM Z-Phe-Arg-Nmec to 10 ml with MilliQ water.



Standards:

Standard: 5  $\mu\text{M}$  7-amino-4-methyl coumarin i DMSO.

Dilute in stop buffer: 25; 50; 100; 150; 200 nM. 0 nM (blind) = only stop buffer.

**Stock solution I:** 1 ml

10 mM 7-amino-4-methyl coumarin                      0,0018 g

Dissolve in 1 ml DMSO

**Stock solution II:** 50 ml (Make new every day)

5 $\mu\text{M}$     25  $\mu\text{l}$  Stock solution I

Dilute to 50 ml with stop buffer.

**200 nM**                      400  $\mu\text{l}$  Stock solution II is diluted to 10 ml stop buffer

**150 nM**                      3 ml 200 nM + 1 ml stop buffer

**100 nM**                      2 ml 200 nM + 2 ml stop buffer

**50 nM**                      1 ml 200 nM + 3 ml stop buffer

**25 nM**                      0,5 ml 200 nM + 3,5 ml stop buffer

**0 nM**                      only stop buffer

## APPENDIX 3

### Determination of proteinase activity by digestion of gelatin

#### Reagents:

##### Substrate:

Dry gelatin (from cod) 8 g. Pre-dissolve in 100 ml water over night at 10°C  
Dissolve by stirring (up to 65°C, pH 7.7). Store frozen.  
Thaw 1 hr at 25°C

##### Buffer: Johnson and Lindsay buffer:

###### Reagents (Basis):

Citric acid x H <sub>2</sub> O	6.01 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1.77 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.89 g
Diethyl barbituric acid	5.27 g

Dissolve in 1 l H<sub>2</sub>O

Mix basis with either 0.2 M HCl or 0.2 M NaOH to desired pH

Precipitation agent: 12% (w/v) TCA-solution

##### Colour reaction:

**Solution a:** 1 g Na<sub>3</sub>Citrate x 2 H<sub>2</sub>O  
0.5 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
Dissolve in 100 ml H<sub>2</sub>O

**Solution b:** 16 g NaOH  
50 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
Dissolve in 500 ml H<sub>2</sub>O

Folin-Ciocalteu reagent

#### Enzyme activity measurement:

Use small screwcap tubes

0.5 ml buffer (J&L pH 7)

Cut 0.5 cm of a pipette tip and add 0.25 ml substrate

Start: Add 0.25 ml enzyme solution. Incubate 1 h at 25°C

Stop: Add 5 ml 12% TCA. Add substrate to blinds

Centrifuge: 10 min, 2000 g

Colour reaction

Use disposable plastic cyvettes (4-5 ml)

From each tube take out 0.25 ml of the supernatant, and add 0.25 ml water

Use 0.5 ml 5 % TCA as a blank and 0.5 ml Tyrosine solution (0.1  $\mu\text{mol/ml}$  in 5 % TCA) as a standard

Mix fresh 79 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml **a** and 20 ml **b**

Add 2 ml of this solution to each sample

After 30 min at room temperature, add 0.125 ml Folin–Ciocalteu reagent and mix immediately

After another 30 min at room temperature, measure optical density at 700 nm

## Produktinformasjon om collagenase



**SIGMA-ALDRICH**

3050 Spruce Street  
Saint Louis, Missouri 63103 USA  
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765  
Fax (314) 286-7828  
email: techserv@sial.com  
sigma-aldrich.com

## ProductInformation

### Collagenase from *Clostridium histolyticum*

Product Number C1889  
Storage Temperature -0 °C

#### Product Description

Enzyme Commission (EC) Number: 3.4.24.3  
CAS Number: 9001-12-1

This collagenase is obtained from the culture filtrate of *Clostridium histolyticum*. The culture filtrate is thought to contain at least 7 different proteases ranging in molecular weight from 68-130 kDa.<sup>1</sup> This lyophilized powder is prepared from a sterile filtered solution of Product No. C 5138.

Collagenase is typically used to digest the connective components in tissue samples to liberate individual cells. The concentration for cartilage dispersal is 1-2 mg/ml, but literature searches should be performed for species specific and/or tissue specific concentrations.<sup>2,3</sup>

Many references exist for using collagenase to digest various tissues. The choice of one technique over another is often arbitrary and based more on past experience than on an understanding of why the method works and what modifications could lead to better results. Concentrations typically vary from 0.1 to 5 mg/ml, and digestion time should be experimentally monitored using a very gentle agitation system to check for tissue dissociation. Collagenase treatment can cause some cells to die. Satisfactory efficiency of cell dissociation without causing too much cell death typically is achieved from 15 minutes to several hours, but can fall outside of this range if the concentration is unusual. The preferred buffer to use is *Krebs Ringer Buffer with calcium and BSA*.  $Zn^{2+}$  is required for activity, but it is tightly bound to the collagenase during purification. Additional  $Zn^{2+}$  should not be necessary as long as no chelator is added to the solution during digestion.

When this enzyme is tested for suitability for the release of hepatocytes, the collagenase is used at approximately 1 mg/ml in a total volume of 100 ml for each rat liver.

If excessive cell death is observed with concentrations used with previous lots, the new lot used might have a higher specific activity. Lowering the enzyme concentration and/or adding BSA or serum (0.5% and 5-10%, respectively) is recommended. These components are added to stabilize the cells to further digestion by the enzyme.

Radiolabeled gelatin has been used to measure the activity and mechanism of collagenase digestion.<sup>4</sup>

Mandl units have the same description as Sigma collagen digestion units. The conversion factor for Mandl units/Wuensch units to Sigma units is approximately 1000-2000 to 1.

#### Precautions and Disclaimer

For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.

#### Preparation Instructions

For measurement of enzymatic activity, an enzyme stock solution is prepared by dissolving 0.05 - 0.1 mg/ml collagenase in 50 mM TES buffer, pH 7.4 (37 °C), containing 0.36 mM calcium chloride. Final concentrations in the reaction mixture are 50 mM TES, 0.36 mM calcium chloride, 25 mg collagen (Product No. C9879), and 0.005-0.01 mg collagenase.

For tissue culture applications, collagenase can be solubilized in calcium-free solutions such as Hank's Balanced Salts (Product No. H2387) or Earle's Balanced Salt Solution (Product No. E6267).

To sterile filter solutions of collagenase, first centrifuge the solution or filter through a 0.8  $\mu\text{m}$  filter to remove insolubles. This will remove particulates and reduce the probability of clogging the 0.2  $\mu\text{m}$  filter during sterile filtration.

**Storage/Stability**

Solutions at neutral pH and with adequate calcium ion concentration (0.3-0.5 mM) will retain activity for at least 5 hours at 37 °C.

Solutions at -20 °C are stable for several months.<sup>3</sup>

**References**

1. Angleton, E.L., et al., Preparation and reconstitution with divalent metal ions of class I and class II *Clostridium histolyticum* apocollagenases. *Biochemistry*, **27**, 7406-7412 (1988).
2. Bassleer, C., et al., Human Chondrocytes in Tridimensional Culture, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **22**, 113-119 (1986).
3. Klagsbrun, M., Large-Scale Preparation of Chondrocytes, *Methods in Enzymology*, **58**, 560-564 (1979).
4. Mookhtiar, K. A., et al., Properties of Radiolabeled Type I, II, and III Collagens Related to their Use as Substrates in Collagenase assays, *Anal. Biochem.*, **158**, 322-333 (1986).

MWM/RXR 5/06

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.  
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.