

MARIUSZ FLOREK, PIOTR DOMARADZKI, ZYGMUNT LITWIŃCZUK

TEORIE DOTYCZĄCE NATURALNYCH PROCESÓW KRUSZENIA MIĘSA PO UBOJU

Streszczenie

Spośród różnych właściwości mięsa wpływających na jego jakość, dla konsumenta najważniejsza jest kruchość. W czasie pośmiertnej konwersji mięśni do mięsa zachodzi złożony proces tenderyzacji. Od dawna mechanizm tenderyzacji mięsa był przedmiotem szczególnego zainteresowania badaczy z tego obszaru wiedzy. Pomimo intensywnych badań istota tych procesów nie została dokładnie poznana. W pracy przedstawiono główne teorie dotyczące mechanizmów tenderyzacji mięsa, zarówno nieenzymatyczne (wapniowa teoria kruszenia mięsa, wpływ ciśnienia osmotycznego), jak i enzymatyczne (procesy z udziałem proteolitycznych enzymów endogennych: kalpain i kalpastatyny, kaspaz, katepsyn, proteasomów, macierzy metaloproteaz). Wymienione enzymy prawdopodobnie uczestniczą w pośmiertnej proteolizie białek mięśniowych. Dokonano ponadto omówienia potencjalnych markerów z różnych szlaków metabolicznych, biorących udział w kształtowaniu kruchości mięsa *post mortem*.

Słowa kluczowe: mięso, tenderyzacja, teorie, kruchość, markery kruchości

Wprowadzenie

Bezpośrednio po uboju zwierząt tkanka mięśniowa stanowi niepełnowartościowy surowiec zarówno do spożycia, jak i przetwórstwa. Jest twarda, gumowata, niesoczysta i ciężkostrawna, a składniki odżywcze są słabo przyswajalne. Podczas dojrzewania, tj. gdy tusze po ustąpieniu fazy *rigor mortis* przechowuje się w temperaturze wyższej od punktu zamrażania, zachodzą złożone procesy biochemiczne prowadzące do wykształcenia cech typowych dla mięsa kulinarnego. Do tych zmian należą [30]:

1) stopniowe wyczerpywanie się dostępnej energii,

Dr hab. inż. M. Florek, dr inż. P. Domaradzki, Katedra Towaroznawstwa i Przetwórstwa Surowców Zwierzęcych, prof. dr hab. Z. Litwińczuk, Katedra Hodowli i Ochrony Zasobów Genetycznych Bydła, Wydz. Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin. Kontakt: mariusz.florek@up.lublin.pl

- 2) zmiana kierunku metabolizmu z tlenowego na beztlenowy oraz nagromadzenie kwasu mlekowego, wpływające na obniżanie pH tkanki z ok. 7,0 do 5,4 ÷ 5,8,
- 3) zwiększanie siły jonowej, spowodowane w części ograniczeniem funkcji pompy sodowo-potasowej i wapniowej (zależnej od ATP),
- 4) niezdolności komórek do utrzymania warunków redukujących.

Zmianie ulega mikro- i ultrastruktura włókien mięśniowych, przede wszystkim struktura linii Z i prążka I. Miofibryle ulegają fragmentacji na mniejsze jednostki strukturalne złożone z różnej liczby sarkomerów. Właściwe białka kurczliwe (miozyna i aktyna) nie ulegają rozkładowi w trakcie procesu dojrzewania w temperaturze chłodniczej [25, 30], chociaż Morzel i wsp. [53] wskazują, że proteoliza tych białek zachodzi, a w przypadku miozyny jest ona również skorelowana z kruchością mięsa [71].

Zjawisko fragmentacji miofibryli (na krótkie segmenty w kontrolowanych warunkach homogenizacji) nie występuje w tkance mięśniowej tuż po uboju. Pojawia się ono dopiero podczas dojrzewania, a łatwość fragmentacji miofibryli wykorzystuje się do określania tzw. Indeksu Fragmentacji Miofibryli (MFI), który jest miarą ich przeciętnej długości. MFI związany jest z zaawansowaniem procesu tenderyzacji, tzn. im krótsze są miofibryle tym wyższa jest wartość MFI, co świadczy o większej kruchości tkanki mięśniowej [43, 78]. Wartość MFI zależy m.in. od rodzaju mięsa, lokalizacji mięśnia w tuszy, a także od warunków homogenizacji (prędkości, typu i rodzaju urządzenia) [28, 37].

Proces dojrzewania powoduje istotne zmiany w strukturze i właściwościach mechanicznych śródmięśniowej tkanki łącznej, przy czym zmiany te obserwowane są dopiero po ok. 10 dniach od uboju. Stwierdzono zdeformowanie struktury *endomysium* (przypominającej plaster miodu) i warstwy *perimysium* po upływie 14 dni od uboju [54], co należy wiązać z degradacją macierzy proteoglikanów, łączących włókna kolagenowe i stabilizujących tkankę łączną. W efekcie następuje osłabienie struktury wewnątrzmięśniowej tkanki łącznej, tj. rozdzielenie się fibryli i włókien kolagenowych [55].

W procesie dojrzewania najbardziej odczuwalną sensorycznie i wymierną instrumentalnie zmianą jest poprawa jednego z najbardziej niestałych wyróżników jakościowych mięsa – kruchości [16, 45, 56]. W procesie kruszenia mięsa można wyróżnić dwie fazy: szybką i wolną. W pierwszej – skutek osłabienia struktury miofibryli następuje szybka tenderyzacja mięsa. W kolejnej fazie (wolnej) osłabieniu ulegają struktury łącznotkankowe (omięśna wewnętrzna i śródmięśna) [77]. Tenderyzacja mięsa jest zatem procesem złożonym i długotrwałym, a ponadto przebiegającym z niejednakową szybkością w różnych mięśniach tej samej tuszy. Od dawna badacze próbowali wyjaśnić złożone mechanizmy odpowiedzialne za pośmiertną tenderyzację mięsa.

Pierwszą, naukowo potwierdzoną informację nt. korzystnego wpływu przechowywania mięsa *post mortem* przez 8 dni na zwiększenie jego kruchości o ok. 30 %

przedstawił Lehmann (cyt. za[42]) w 1907 r. Badania przeprowadzone w latach 70. i 80. XX w. potwierdziły, że wszystkie zmiany obserwowane w mięśniach szkieletowych po uboju, związane z poprawą kruchości mięsa, są wynikiem proteolizy. Niektórzy badacze wskazywali jednak na nieproteolityczny mechanizm kruszenia mięsa wołowego [79]. Głównymi proteazami analizowanymi w tamtym okresie były lizosomalne katepsyny i enzymy zależne od jonów Ca [42, 52].

Teorie nieenzymatyczne

W latach 90. XX w. sformułowano jedną z najbardziej kontrowersyjnych teorii tenderyzacji mięsa, określaną jako wapniowa teoria kruszenia [77]. Podstawowym założeniem tej teorii, o charakterze nieenzymatycznym, było przypuszczenie, że degradacja białek cytoszkieletowych i tenderyzacja mięsa zachodzą tylko w wyniku działania jonów wapnia, tzn. bez udziału proteaz. Efektem działania jonów wapnia było osłabienie struktury miofibryli i filamentów pośrednich (poprzez uwolnienie fosfolipidów z matrycy linii Z), zmiana w filamentach konektyny, nebuliny i desminy oraz prawdopodobnie (w wyniku degradacji proteoglikanów) osłabienie struktury *endomysium* i *perimysium* [77].

Innym, przedstawionym w latach 90., mechanizmem charakteryzującym zmiany w mięśniach po śmierci zwierząt była teoria łącząca wzrost wewnątrzkomórkowego ciśnienia osmotycznego (*osmotic pressure*) z enzymatycznym kruszeniem mięsa. W czasie *rigor mortis* wewnątrzkomórkowe ciśnienie osmotyczne (tj. siła jonowa) zwiększa się prawie dwukrotnie, wykazując ścisły związek z wartością pH ($r = 0,97$) [60]. Sugerowano, że przyczyną dużego wzrostu ciśnienia osmotycznego w komórkach są głównie jony Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} (uwolnione w środowisku o niskim pH) związane zwykle z białkami [64]. Duża siła jonowa (0,3 M) determinuje rozpuszczalność białek strukturalnych (m.in. białka C i M, troponiny T, aktyny, tropomiozyny i α -aktyniny) [80, 81] i zmianę aktywności ATPazy miofibrylarniej w trakcie poubojowego dojrzewania [60]. Przypuszcza się, że występująca po ustąpieniu *rigor mortis* siła jonowa (0,24 ÷ 0,30 M) jest wystarczająca do uzyskania częściowej dysocjacji struktur miofibrylarnych i zwiększenia ich podatności na zmiany proteolityczne. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań [10].

Teorie enzymatyczne

Obecnie większość autorów jest zgodna, że mechanizm tenderyzacji mięsa jest enzymatyczny w swojej naturze i uczestniczy w nim kilka wewnątrzkomórkowych systemów proteolitycznych (proteaz), a pierwszym etapem konwersji (przekształcania) mięśni w mięso jest apoptoza, tj. dokładnie regulowany i złożony energetycznie proces śmierci komórki [19, 62]. W tym kontekście pierwszym systemem proteolitycznym uczestniczącym w konwersji mięśni w mięso jest grupa kaspaz (peptydaz cysteino-

wych) inicjujących (*initiator caspases*) i wykonawczych (*executor caspases*), które odpowiadają za degradację białkowych składników komórkowych. Do innych systemów proteolitycznych należą kalpainy (endopeptydazy cysteinowe), proteasomy (proteiny multikatalityczne lub multikatalityczny kompleks proteolityczny – MPC), katepsyny (enzymy lizosomalne), metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (*matrix metalloproteinases*), trombina, plasmina itd., które uczestniczą w procesie rozpadu komórki, chociaż wciąż nie jest wiadomo, w jakim porządku i zakresie przebiega ten proces [44, 61]. W procesie tenderyzacji mięsa uczestniczą wszystkie proteazy wewnątrzkomórkowe oraz prawdopodobnie proteazy zewnątrzkomórkowe, takie jak plazmina czy trombina, które mają jednak znaczenie drugorzędne. Przyjmuje się, że głównymi substratami systemów proteolitycznych są przede wszystkim białka cytoszkieletowe, tworzące strukturę włókna mięśniowego. W mięśniach szkieletowych zidentyfikowano łącznie 15 proteaz [62].

Rola kalpain

Proteolityczny system kalpainowy składa się z kalpains 1 (μ), kalpains 2 (m), kalpains 3 ($p94$) i kalpastatyny (specyficznego, endogennego inhibitora kalpain). Dwa pierwsze enzymy, należące do proteaz aktywowanych wapniem, nazwano μ -kalpainą i m -kalpainą, odpowiednio do poziomu stężenia jonów Ca^{2+} (μM lub mM) koniecznego do ich uaktywnienia (tab. 1) [22, 23]. Przyjmuje się, że aktywność i poziom kalpain decydują o tempie i zakresie tenderyzacji, tzn. im wyższa jest ich aktywność oraz większa wartość proporcji kalpain : kalpastatyna, tym częściej uzyskuje się kruche mięso. Wykazano ponadto, że substratem kalpains jest również kalpastatyna, jednak peptydy powstające w wyniku hydrolizy nadal wykazują zdolność hamowania aktywności kalpain [45].

Enzymy należące do tego systemu, tzn. kalpain 1 i kalpain 2 są kodowane przez geny CAPN1 i CAPN2, a inhibitor kalpastatyna przez gen CAST [44]. Wskazuje się również na to, że geny kodujące ww. enzymy (jako geny kandydujące) mogą być również zmiennymi kruchości mięsa [11, 31, 35].

Kalpains uzyskują optimum aktywności w środowisku o pH ok. 7,0 i w temp. 25 °C. Stopień inaktywacji proteolitycznej μ -kalpains zwiększa się wraz z obniżaniem wartości pH ($pH < 6,0$) i wzrostem temperatury [3, 42]. Wykazano jednak, że oczyszczone miofibryle są degradowane przez μ -kalpainę w temp. 4 °C i przy $pH = 5,6$ w obecności $CaCl_2$ [29].

Aktywność μ -kalpains *post mortem* zmniejsza się szybko i ustaje po 72 h, w przeciwieństwie do stabilnej aktywności m -kalpains [42]. Uważa się, że μ -kalpain odpowiada za tenderyzację w pierwszej fazie, a m -kalpain i inne proteazy warunkują proteolizę w późniejszym okresie dojrzewania [22]. Nie ma natomiast zgodności odnośnie do roli kalpains $p94$ w procesie tenderyzacji [39].

Tabela 1. Oszacowana ilość wapnia [μM] niezbędna do aktywacji, autolizy i interakcji z kalpastatyną
 Table 1. Estimated calcium concentration [μM] needed for activation, autolysis and interaction with calpastatin

Właściwość kalpain Property of Calpain	Zautolizowana μ -kalpaina Autolysed μ -calpain	μ -kalpaina μ -calpain	Zautolizowana m-kalpaina Autolysed m- calpain	m-kalpaina m-calpain
Aktywność proteolityczna Proteolytic activity	0,5-2	3-50	50-150	400-800
Wiązanie kalpastatyny Calpastatin binding	0,042	40	25	250-500
Autoliza – fosfolipidy Autolysis–phospholipids	-	50-150	-	550-800
Autoliza + fosfolipidy Autolysis+phospholipids	-	0,8-50	-	90-400

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Podane wartości wyznaczają ilość niezbędną do połowy maksymalnej aktywności, wiązania lub tempa autolizy / Above values represent the amount required for half maximal activity, bindings, or rate of autolysis.

Źródło: / Source: [39] cyt. za [23] / [39] according to [23]

Należy podkreślić, że aktywność kalpain uzależniona jest również od procesów utleniania, które hamując tempo poubojowej proteolizy białek, ograniczają poprawę kruchości mięsa. Zarówno μ -, jak i m-kalpaina są szczególnie podatne na inaktywację ze względu na obecność w centrum aktywnym grupy SH, pochodzącej od reszt cysteiny [47, 51]. Ponadto tworzenie wiązań sieciujących pomiędzy białkami miofibrilarnymi (np. łańcuchem ciężkim miozyny a titiną), jak również oksydacja enzymów proteolitycznych, mogą przyczyniać się do zmniejszenia rozpuszczalności białek poprzez obniżenie zdolności do dysocjacji, co wpływa na zmniejszenie wodochłonności, soczystości oraz kruchości mięsa [30, 51].

Rola katepsyn

Obecnie uważa się, że kruszenie mięsa przy udziale katepsyn jest raczej mało prawdopodobne, mimo że wykazują one aktywność enzymatyczną względem miozyny, aktyny i α -aktyniny [44]. Do katepsyn zalicza się ok. 20 różnych enzymów, w tym egzo- i endopeptydazy. Zwykle są one klasyfikowane do trzech rodzin proteinaz: aspartylowych (katepsyna D i E), cysteinowych (katepsyna B, H, L i X) oraz serynowych (katepsyna G) [72]. Przed śmiercią komórek większość katepsyn zlokalizowana jest w lizosomach mięśni. Wcześniej sugerowano, że katepsyny nie są uwalniane do cytoplazmy, nawet po zastosowaniu stymulacji elektrycznej tusz, a zatem nie mogą wpływać na proces tenderyzacji mięsa [43, 44]. Potwierdzono, że niskie pH i wysoka temperatura tusz ułatwiają niszczenie błon lizosomalnych, a katepsyny są stopniowo

uwalniane do cytozolu, biorąc istotny udział w dojrzewaniu *post mortem* [41]. Wskazuje na to również dodatnia korelacja pomiędzy aktywnością katepsyn (B i L) i kruchością mięsa wołowego [57]. Ponadto katepsyna L hydrolizuje znaczącą ilość białek miofibrylarnych (w tym miozynę i aktynę oraz troponinę T, I, C, nebulinę, titinę i tropomiozynę), które są degradowane w czasie poubojowego kondycjonowania [52]. Z kolei katepsyny K, L, N i S wykazują zdolność rozkładu włókien kolagenowych [41]. Określona aktywność katepsyny D może być konsekwencją ekspresji genu CATD, a jego warianty, w tym *locus*, mogą być skorelowane z parametrami jakości mięsa wołowego. Stąd też w przypadku kruchości mięsa *locus* CATD można traktować jako gen kandydujący [69].

Rola proteosomów

Innym czynnikiem odpowiedzialnym za tenderyzację mięsa po uboju są proteasomy – bardzo duże kompleksy białkowe zlokalizowane zarówno w mięśniach, jak i w cytoplazmie, zależne od ATP i ubikwityny (będącej markerem białek przeznaczonych do eliminacji) [18, 39]. Rola proteosomów w procesie kruszenia mięsa była początkowo pomijana [44]. Wykazano jednak, że aktywność proteolityczna proteasomu 20S, określanego mianem MPC (multikatalitycznego kompleksu proteolitycznego) [13], jest niezależna od ATP i ubikwityny, może on zatem uczestniczyć w pośmiertnej proteolizie [39], nawet do 7 dni od uboju i $\text{pH} < 6,0$ [46].

Rola metaloproteinaz

Kolejną grupą enzymów, które mogą brać udział w tenderyzacji mięsa są metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Są to endopeptydazy aktywne w środowisku o obojętnym lub lekko zasadowym pH , zależne od obecności cynku i jonów wapnia. Ilość MMP w komórkach wzrasta gwałtownie po kontuzji mięśni, odnerwieniu, niedotlenieniu tkanek i w wielu stanach chorobowych. Sugeruje się, że MMP i ich inhibitory uczestniczą w programowanej śmierci komórki (apoptozie). W zależności od budowy oraz swoistości substratowej, wśród metaloproteinaz wyróżnia się: kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny (rozkładające białka stromy) oraz matrylizyny (rozkładające białka matrycowe). Przypuszcza się, że w trakcie zmian poubojowych mięsa działanie MMP związane jest przede wszystkim z degradacją struktur śródmięśniowej tkanki łącznej [65, 67, 72], która w przypadku kolagenu jest ograniczona [1]. Obserwowano jednak zwiększenie aktywności metaloproteinaz w trakcie chłodniczego przechowywania mięsa strusi [65] i jagnięciny [75]. Niektóre metaloproteinazy wykazują zdolność do proteolizy typowo substratowej, tzn. ograniczonej tylko do tkanki łącznej, a nie białek miofibryli. Endogenne MMP mogą być też użyte *in vivo* do tworzenia mniej dojrzałych struktur kolagenu w mięśniach zwierząt. Pozwala to

uzyskać mięso o mniejszej twardości, a tym samym o pożądanej kruchości, które łatwiej ulega termohydrolyzie [67].

Programowana śmierć komórki

Inna hipoteza wyjaśniająca przemiany zachodzące w mięśniach po uboju wskazuje na proces apoptozy, tzn. programowanej śmierci komórek (*apo* – odległość, *ptosis* – wypadnięcie). Jest to mechanizm fizjologiczny, naturalnie występujący w żywych organizmach, zapewniający selektywną eliminację komórek zbytecznych, zużytych, uszkodzonych lub potencjalnie niebezpiecznych dla organizmu (bez uszkodzenia sąsiednich struktur) [62]. Po wykrwawieniu zwierząt tkanki przechodzą w niedokrwieniny stan beztlenowy, który wpływa na wszystkie szlaki metaboliczne i prowadzi do adaptacji większości (lub nawet wszystkich) procesów metabolicznych [62]. Drugim etapem jest ochrona funkcji komórki poprzez zwiększenie koncentracji białek szoku cieplnego (*Heat Shock Proteins* – HSPs), w tym HSP 70, 40, 27, 20, $\alpha\beta$ -krystaliny i prawdopodobnie innych [61].

W procesie śmierci komórki zachodzą dobrze poznane zmiany, np. skurczenie komórki, eksternalizacja (uzewnętrznienie) fosfatydyloseryny wraz ze zmianą mitochondriów [4, 14]. Uwalniany jest układ pro- i antyapoptotycznych białek z mitochondriów, a ich proporcja określa tempo i zakres apoptozy. Opisane zjawisko występuje m.in. po uboju i wykrwawieniu zwierząt rzeźnych, bowiem wszystkie komórki i tkanki są nieodwracalnie pozbawiane substancji odżywczych i tlenu [62]. W tych warunkach środowiska komórki mięśniowe zmuszone są do zainicjowania procesu apoptozy (czyli zaprogramowanego „samobójstwa”). Wymienione peptydazy specjalizują się bowiem w niszczeniu komórek i prawdopodobnie jako pierwsze degradują kluczowe białka utrzymujące złożoną strukturę przestrzenną miofibryli w komórkach mięśniowych oraz ułatwiają działanie innych wewnątrzkomórkowych systemów proteolitycznych (odpowiedzialnych za hydrolizę składników komórkowych i organelli), takich jak: katepsyny, kalpajny, proteasomy i inne [61].

Wszystkie peptydazy biorące udział w apoptozie określa się mianem kaspaz (*caspases*). Kaspazy (aktualnie zidentyfikowano ich 14) są obojętnymi peptydazami cysteinowymi, których aktywność jest uzależniona od pH mięśni i obecności jonów wapnia [59, 62, 76]. Kaspazy wykazują ponadto zdolność degradowania i inaktywacji kalpastatyny [39]. Apoptoza i jej związek z innymi teoriami dotyczącymi tenderyzacji tkanki mięśniowej jest nadal nowością w wyjaśnianiu procesu konwersji mięśni w mięso, wymagane są zatem dalsze badania weryfikujące ten mechanizm.

Należy nadmienić, że odnotowuje się coraz więcej dowodów na interakcje pomiędzy systemami proteaz kalpainowych i kaspazowych, które rozszczepiają te same docelowe substraty białkowe, jak: aktyna, aktynina, miozyna, spektryna, vimentyna oraz troponina I [74]. Nie są to jedyne podobieństwa. Wzajemne powiązania pomiędzy

tymi dwoma rodzinami są bardziej złożone. Kaspaza 12 może być aktywowana przez kalpainy. Kalpastatyna znana jest jako substrat kaspaz. Kaspazy mogą kontrolować proteolizę *post mortem* i kruchość mięsa poprzez wpływ na kalpastatynę. Konieczne są dalsze badania w celu zrozumienia mechanizmu tego procesu, jak również interakcji pomiędzy różnymi systemami proteolitycznymi [38].

Coraz większą rolę w kształtowaniu końcowej jakości mięsa przypisuje się licznej grupie białek opiekuńczych, tzw. białkom szoku cieplnego (HSP/Hsp), m.in. Hsp70, Hsp40 i Hsp27, Hsp20 i $\alpha\beta$ -krystalinie, ze względu na ich antyapoptotyczne funkcje. Ekspresja HSP w komórce zwiększa się na skutek oddziaływania różnych czynników stresogennych, np. podwyższonej temperatury („białka stresu”). Po uboju zwierząt poziom HSP jest stymulowany w odpowiedzi na stres i śmierć komórek mięśniowych. W konsekwencji białka te spowalniają proces apoptozy komórek, hamując właściwe dojrzewanie mięsa [50, 62]. Wykazano przy tym, że aktywność HSP20, HSP27 czy $\alpha\beta$ -krystaliny jest zależna od pH tkanki mięśniowej [49].

Inhibitory najważniejszych enzymów

W latach 80. XX w. poszukiwania biologicznych predyktorów końcowej kruchości mięsa skoncentrowane były na udoskonalaniu pomiarów aktywności enzymatycznej, zwłaszcza z wykorzystaniem pomiarów fluorescencji, które są bardziej czułe niż pomiary spektrofotometryczne. Nadzieje wiązano z oznaczaniem aktywności enzymów proteolitycznych. Okazały się one jednak nieprzydatne w przewidywaniu kruchości mięsa. W tym kontekście, jak wykazano w przypadku kalpain [63], proteaz cysteinowych [73] i kaspaz [21, 82], bardziej odpowiednimi predyktorami kruchości (wspólnie lub pojedynczo) były parametry określone w chwili śmierci: proporcja enzym/inhibitor lub stężenie inhibitora aniżeli poziom docelowych enzymów (tab. 2). Wyniki badań z kalpastatyną (wspólnym specyficznym inhibitorem kalpainy 1 i 2), były nieprzekonujące i nieweryfikowalne. Jako potencjalne markery cystatyny (grupa inhibitorów proteaz cysteinowych) zostały zidentyfikowane tylko w jednym badaniu [73]. Najlepszymi predyktorami kruchości mięsa (spośród analizowanych trzydziestu zmiennych ilościowych) okazały się inhibitory proteazy serynowej [82, 83]. Ta nieoczekiwana właściwość była wyjątkowym zaskoczeniem, ponieważ nie stwierdzono, aby jakakolwiek proteaza serynowa brała udział w „rozluźnianiu” miofibrilli [21, 60].

Późniejsze badania mięśni bydląt mające na celu identyfikację inhibitorów wewnątrzkomórkowych proteaz serynowych wykazały, że większość z nich należy do nadrodziny serpin (akronim SERine Proteases INhibitors) [58]. Potwierdzono związek serpin (z grupy SERPINA3) hamujących aktywność kaspaz z kruchością mięsa [21, 82]. Zidentyfikowanym inhibitorem trombiny jest enzym zlokalizowany na poziomie synaps mięśniowych, określony jako antytrombina III [26]. Chociaż zidentyfikowano

już w zasadzie inhibitory proteaz z rodziny papain, kalpain i kaspaz, to wciąż niewiele wiadomo na temat inhibitorów proteasomów, które bezsprzecznie są obecne w komórce mięśniowej [61].

Tabela 2. Najważniejsze peptydazy biorące udział w konwersji mięśni do mięsa i ich inhibitory
Table 2. Main peptidases involved in muscle-meat conversion and their inhibitors

Enzym Enzyme	Inhibitor Inhibitor	Źródło Reference
Kalpains 1 i 2 [μ i m] Calpains 1 and 2 [μ and m]	kalpastatyna (izoformy) calpastatin (isoforms)	[63, 68]
Katepsyny: B, H, L, S Cathepsins: B, H, L, S Proteazy cysteinowe Cysteine proteases	cystatyny cystatins (stefins, nystatins, kininogens, glycated cystatins)	[17, 72]]
Kaspazy: inicjacyjne i efektorowe Caspases: initiator and effector	HSP (heat stress protein) IAP (inhibitors of apoptosis protein) serpiny (SERine Protease Inhibitors) $\alpha\beta$ -crystallin	[2, 5, 20, 21, 36, 70]
Proteazy serynowe Serine proteases	serpiny (SERPINA 3) serpins (SERPIN3)	[21, 72, 82, 83]
Trombina Thrombin	antytrombina III antithrombin III	[26]

Potencjalne markery kruchości mięsa

Od około 20 lat poszukuje się wiarygodnych biologicznych markerów kruchości mięsa, które umożliwiłyby: 1) klasyfikację elementów uzyskanych tuż po uboju na podstawie ich końcowej kruchości, 2) genetyczną selekcję zwierząt na podstawie jakości mięsa. Dotychczas nie zidentyfikowano takich markerów, prawdopodobnie z uwagi na niewystarczające poznanie mechanizmów biologicznych odpowiedzialnych za poprawę tekstury mięsa *post mortem* [61]. Jakościowe markery mogą bowiem odzwierciedlać różne szlaki metaboliczne biorące udział w poprawie kruchości mięsa *post mortem*. Dotychczas zidentyfikowane potencjalne markery kruchości mięsa (ok. 20) zostały sklasyfikowane na podstawie metabolicznych lub biologicznych procesów, w których biorą udział. Najczęściej wyróżnia się markery energetycznego szlaku glikolitycznego i oksydacyjnego oraz białka szoku cieplnego (HSP) [61].

Glikoliza jest procesem dwufazowym, a wszystkie markery glikolitycznego szlaku energetycznego to enzymy glikolityczne. Spośród 5 enzymów uczestniczących w pierwszej fazie, dwa zidentyfikowano jako potencjalne markery kruchości, tzn. fosfoglukomutazę [7, 9] i izomerazę triozofosforanową [40]. W przeciwieństwie do

pierwszej fazy, enzymy uczestniczące w drugiej fazie glikolizy (5 z 6) zostały w większości zidentyfikowane jako wiarygodne markery kruchości. Należą do nich: dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerolowego, kinaza fosfoglicerynianowa [33], enolaza (hydrataza fosfo(enolo)pirogrotonianowa), kinaza pirogrotonianowa i dehydrogenaza mleczanowa [12, 48, 66]. Innym potencjalnym markerem jest dehydrogenaza aldehydowa [33]. Z oksydacyjnego szlaku metabolicznego wytypowano 7 markerów kruchości: dehydrogenazę 3-hydroksyzomaślanu [32, 33], dehydrogenazę β -hydroksyacylu CoA [24, 66], cytochrom c [15] i trzy markery biorące udział w cyklu Krebsa (dehydrogenazę bursztynianową, syntazę bursztynylo Co-A i dehydrogenazę izocytrynianową) [24, 27, 33, 40, 84]. Białka szoku cieplnego (HSP 27, 40, 60, 70) to potencjalne biomarkery cech jakościowych mięsa, m.in. kruchości [53]. Stwierdzono ujemną korelację Hsp27 i $\alpha\beta$ -kryształiny z kruchością, soczystością i smakowitością mięsa wołowego [6] oraz z udziałem barwy czerwonej (a^*) i jasnością (L^*) [40]. Do innych potencjalnych markerów kruchości mięsa zaliczane są także białka regulujące proces apoptozy komórek mięśniowych *post mortem*. Niektórzy autorzy wykazali związek zaawansowania tenderyzacji mięsa z różną koncentracją aneksyny A1 (lipokortyna-1) i aneksyny A6 [8, 85]. Dwa inne potencjalne markery kruchości, to galektyna 1 (Galectin 1) [8, 84] i peroksyredoksyna-6 (Peroxiredoxin-6) [34].

Podsumowanie

Z wyjątkiem opublikowanej w 1996 r. wapniowej teorii kruszenia mięsa, przyjmuje się powszechnie, że konwersja mięśni do mięsa jest regulowana przez złożone interakcje procesów biochemicznych mających miejsce w czasie przechowywania tusz po uboju. Potwierdzono, że apoptoza (nie nekroza) jest najważniejszym kierunkiem przemian po śmierci komórki w mięśniach szkieletowych *post mortem*, poprzedzając pośmiertną proteolizę i tenderyzację mięsa. Proteoliza enzymatyczna zmienia twardą tkankę mięśniową w bardziej delikatne mięso. Jednak tempo i zakres tenderyzacji mięsa są zmienne, uwarunkowane licznymi i niezależnymi od siebie czynnikami. Jednym z ważnych czynników jest stężenie i aktywność obecnych w mięśniach szkieletowych endogennych proteaz.

Główną rolę w pośmiertnej proteolizie odgrywa system kalpainowy, a zwłaszcza μ -kalpaina. Jej specyficzny inhibitor – kalpastatyna znacząco wpływa natomiast na kruchość mięsa. Przyjmuje się ponadto, że zarówno proteoliza, jak i tenderyzacja są procesami wieloenzymatycznymi, w których uczestniczą kalpaina, katepsyny, proteasomy oraz system kaspaz. Inhibitory są lepszymi predyktorami kruchości mięsa niż docelowe enzymy, stąd wielu autorów sądzi, że badania zmierzające do pełnego poznania i scharakteryzowania inhibitorów proteaz w tkance mięśniowej przyczynią się do wyjaśnienia funkcji różnych endogennych systemów proteolitycznych w pośmiertnej tenderyzacji mięsa.

Podkreślić jednak należy, że końcowa kruchość mięsa nie jest uwarunkowana wyłącznie proteolizą, ale również temperaturą, wartością pH, długością sarkomerów i zawartością kolagenu w mięśniach. Wszystkie te czynniki mogą wpływać na jakość mięsa i w sposób bezpośredni lub pośredni kształtować potencjał proteolityczny mięśni.

Literatura

- [1] Alderton A.L., Means W.J., Kalchayanand N., McCormick R.J., Miller K.W.: Bovine metalloprotease characterization and in vitro connective tissue degradation. *J. Anim. Sci.*, 2004, **82**, 1475-1481.
- [2] Arrigo A.P.: In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation. *J. Cell. Biochem.*, 2005, **94**, 241-246.
- [3] Barbut S., Sosnicki A.A., Lonergan S.M., Knapp T., Ciobanu D.C., Gatcliffe L.J.: Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Sci.*, 2008, **79**, 46-63.
- [4] Becila S., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Labas R., Astruc T., Picard B., Boudjellal A., Pelissier P., Bremaud L., Ouali A.: *Post mortem* muscle cells die through apoptosis. *Eur. Food Res. Technol.*, 2010, **231**, 485-493.
- [5] Beere H.M.: Death versus survival: Functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.*, 2005, **115**, 2633-2639.
- [6] Bernard C., Cassar-Malek I., Le Cunff M., Dubroeuq H., Renand G., Hocquette J.F.: New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 5229-5237.
- [7] Bjarnadottir S.G., Hollung K., Faergestad E.M., Veiseth-Kent E.: Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: Shifts in energy status and myofibrillar stability. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 7408-7414.
- [8] Bjarnadottir S.G., Hollung K., Hoy M., Bendixen E., Codrea M.C., Veiseth-Kent E.: Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine longissimus thoracis muscle assessed by isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. *J. Anim. Sci.*, 2012, **90**, 2035-2043.
- [9] Bouley J., Chambon C., Picard B.: Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2004, **4**, 1811-1824.
- [10] Bowker B.C., Eastridge J.S., Paroczay E.W., Callahan J.A., Solomon M.B.: Aging/tenderization mechanisms. In: *Handbook of Meat Processing*. Ed. F. Toldrá. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 2010, pp. 87-104.
- [11] Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G.: Effects of calpastatin and I-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.*, 2006, **84**, 520-525.
- [12] Choi Y.M., Lee S.H., Choe J.H., Rhee M.S., Lee S.K., Joo S.T., Kim B.C.: Protein solubility is related to myosin isoforms, muscle fiber types, meat quality traits, and postmortem protein changes in porcine *longissimus dorsi* muscle. *Livestock Sci.*, 2010, **127**, 183-191.
- [13] Dahlmann B., Ruppert T., Kloetzel P.M., Kuehn L.: Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie*, 2001, **83**, 295-299.
- [14] D'alessandro A., Zolla L.: Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. *J. Proteom.*, 2013, **78**, 558-577.
- [15] Ding W.X., Shen H.M., Ong C.N.: Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, **291**, 321-331.
- [16] Domaradzki P., Skąlecki P., Florek M., Litwińczuk Z.: Związek kolagenu z wybranymi parametrami technologicznymi mięsa cielęcego. *Zywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **4**, 50-62.
- [17] Dubin G.: Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, **62**, 653-669.

- [18] Dutaud D., Aubry L., Sentandreu M.A., Ouali A.: Bovine muscle 20S proteasome: I. Simple purification procedure and enzymatic characterization in relation with *post mortem* conditions. *Meat Sci.*, 2006, **74**, 327-336.
- [19] Florek M., Litwińczuk Z.: Konwersja mięsni do mięsa – znaczenie apoptozy. *Med. Weter.*, 2011, **67** (8), 531-535.
- [20] Fuentes-Prior P., Salvesen G.S.: The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem. J.*, 2004, **384**, 201-232.
- [21] Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Picard B., Boudjellal A., Sentandreu M.A., Ouali A.: New caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: A novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. *Adv. Biosci. Biotech.*, 2012, **3**, 740-750.
- [22] Geesink G.H., Kuchay S., Chishti A.H., Koohmaraie M.: l-Calpain is essential for *post mortem* proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.*, 2006, **84**, 2834-2840.
- [23] Goll D.E., Thompson V.F., Li H.Q., Wei W., Cong J.Y.: The calpain system. *Physiol. Rev.*, 2003, **83**, 731-801.
- [24] Hamill R.M., McBryan J., Mcgee C., Mullen A.M., Sweeney T., Talbot A., Cairns M.T., Davey G.C.: Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. *Meat Sci.*, 2012, **92**, 440-450.
- [25] Harper G.S.: Trends in skeletal muscle biology and the understanding of toughness in beef. *Aust. J. Agric. Res.*, 1999, **50**, 1105-1129.
- [26] Herrera-Mendez C.H., Becila S., Coulis G., Sentandreu M.A., Aubry L., Ouali A.: Purification and partial characterization of antithrombin III from bovine skeletal muscle and possible role of thrombin in *post mortem* apoptosis development and in efficiency of low voltage electrical stimulation. *Food Res. Int.*, 2010, **43**, 356-363.
- [27] Hollung K., Veiseth E., Jia X., Faergestad E.M., Hildrum K.I.: Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Sci.*, 2007, **77**, 97-104.
- [28] Hopkins D.L., Martin L., Gilmour A.R.: The impact of homogenizer type and speed on the determination of myofibrillar fragmentation. *Meat Sci.*, 2004, **67**, 705-710.
- [29] Huff-Lonergan E., Mitsuhashi T., Beekman D.D., Parrish F.C. Jr., Olson D.G., Robson R.M.: Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in *post mortem* bovine muscle. *J. Anim. Sci.*, 1996, **74**, 993-1008.
- [30] Huff-Lonergan E., Zhang W., Lonergan S.M.: Biochemistry of *post mortem* muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.*, 2010, **86**, 184-195.
- [31] Iwanowska A., Grześ B., Mikołajczak B., Iwańska E., Juszczyk-Kubiak E., Rosochacki S.J., Pospiech E.: Impact of polymorphism of the regulatory subunit of the μ -calpain (CAPN1S) on the proteolysis process and meat tenderness of young cattle. *Mol. Biol. Rep.*, 2011, **38**, 1295-1300.
- [32] Jia X., Ekman M., Grove H., Faergestad E.M., Aass L., Hildrum K.I., Hollung K.: Proteome changes in bovine *longissimus thoracis* muscle during the early postmortem storage period. *J. Prot. Res.*, 2007, **6**, 2720-2731.
- [33] Jia X., Hildrum K.I., Westad F., Kummen E., Aass L., Hollung K.: Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early *post mortem* period in *longissimus thoracis* bovine muscle analyzed by proteomics. *J. Prot. Res.*, 2006, **5**, 1763-1769.
- [34] Jia X., Veiseth-Kent E., Grove H., Kuziora P., Aass L., Hildrum K.I., Hollung K.: Peroxiredoxin-6 – A potential protein marker for meat tenderness in bovine *longissimus thoracis* muscle. *J. Anim. Sci.*, 2009, **87**, 2391-2399.
- [35] Juszczyk-Kubiak E., Słoniewski K., Oprządek J., Wicińska K., Połozynowicz J., Rosochacki S.: The effect of polymorphisms in the intron 12 of CAST gene on meat quality of young bulls. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 2009, **27**, 4, 281-292.
- [36] Kamradt M.C., Chen F., Sam S., Cryns V.L.: The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 38731-38736.
- [37] Karumendu L.U., Van De Ven R., Kerr M.J., Lanza M., Hopkins D.L.: Particle size analysis of lamb meat: Effect of homogenization speed, comparison with myofibrillar fragmentation index and its relationship with shear force. *Meat Sci.*, 2009, **82**, 425-431.

- [38] Kemp C.M., Parr T.: Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderization. *Meat Sci.*, 2012, **92**, 252-259.
- [39] Kemp C.M., Sensky P.L., Bardsley R.G., Buttery P.J., Parr T.: Tenderness - An enzymatic view. *Meat Sci.*, 2010, **84**, 248-256.
- [40] Kim G.D., Jeong J.Y., Moon S.H., Hwang Y.H., Joo S.T.: Influences of carcass weight on histochemical characteristics and meat quality of crossbred (Korean native black pig × Landrace) pigs. Proc. 55th Inter. Congress Meat Sci. Techn., Copenhagen, Denmark, 2009, vol. PS1.05a.
- [41] Kitamura S., Kudo K., Chikuni K., Watanabe I., Nishimura T.: Actions of cathepsins on troponin T during postmortem aging of porcine muscle. *Anim. Sci. J.*, 2010, **81**, 501-505.
- [42] Koohmaraie M.: The Role of Endogenous Proteases in Meat Tenderness. Reciprocal Meat Conf. Proc., 1988, vol. 41, pp. 89-100.
- [43] Koohmaraie M.: Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.*, 1994, **36**, 93-104.
- [44] Koohmaraie M.: Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci.*, 1996, **43** (S), 193-201.
- [45] Koohmaraie M., Geesink G.H.: Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.*, 2006, **74**, 34-43.
- [46] Lamare M., Taylor R.G., Farout L., Briand Y., Briand M.: Changes in proteasome activity during *post mortem* aging of bovine muscle. *Meat Sci.*, 2002, **61**, 199-204.
- [47] Lametsch R., Lonergan S., Huff-Lonergan E.: Disulfide bond within μ -calpain active site inhibits activity and autolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1784**, 1215-1221.
- [48] Laville E., Sayd T., Morzel M., Blinet S., Chambon C., Lepetit J., Renand G., Hocquette J.F.: Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 10755-10764.
- [49] Lomiwes D., Farouk M.M., Frost D.A., Dobbie P.M., Young O.A.: Small heat shock proteins and toughness in intermediate pHu beef. *Meat Sci.*, 2013, **95**, 472-479.
- [50] Lomiwes D., Farouk M.M., Wiklund E., Young O.A.: Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. *Meat Sci.*, 2014, **96**, 26-40.
- [51] Lund M.N., Heinonen M., Baron C.P., Estévez M.: Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, **55**, 83-95.
- [52] Mikami M., Whiting A.H., Taylor M.A.J., Maciewicz R.A., Etherington D.J.: Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin I and lysosomal lysates. *Meat Sci.*, 1987, **21**, 81-97.
- [53] Morzel M., Terlouw C., Chambon C., Micol D., Picard B.: Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.*, 2008, **78**, 297-304.
- [54] Nishimura T., Hattori A., Takahashi K.: Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef. *Meat Sci.*, 1995, **39**, 127-133.
- [55] Nishimura T., Hattori A., Takahashi K.: Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during *post-mortem* ageing of beef. *Meat Sci.*, 1996, **42**, 251-260.
- [56] Novakofski J., Brewer M.S.: The paradox of toughening during the aging of tender steaks. *J. Food Sci.*, 2006, **71**, 473-479.
- [57] O'Halloran G.R., Troy D.J., Buckley D.J., Reville W.J.: The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Sci.*, 1997, **47**, 187-210.
- [58] Olson S.T., Gettins P.G.: Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2011, **99**, 185-240.
- [59] Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P.: Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, **4**, 552-565.
- [60] Ouali A.: Meat tenderization: Possible causes and mechanisms. *J. Muscle Foods*, 1990, **1**, 129-165.
- [61] Ouali A., Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Boudjellal A., Herrera-Mendez C.H., Sentandreu M.A.: Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanism involved. *Meat Sci.*, 2013, **95**, 854-870.

- [62] Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulisa G., Becilab S., Boudjellal A., Aubry L., Sentandreu M.A.: Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.*, 2006, **74**, 44-58.
- [63] Ouali A., Talmant A.: Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Sci.*, 1990, **28**, 331-348.
- [64] Ouali A., Vignon X., Bonnet M.: Osmotic pressure changes in postmortem muscles: Factors of variation and possible causative agents. *Proc. 37th Int. Cong. Meat Sci. Techn.*, 1991, 452-456.
- [65] Pambuka S.E., Adebisi A.P., Muramoto K., Naudé R.J.: Purification and partial characterisation of a matrix metalloproteinase from ostrich skeletal muscle, and its activity during meat maturation. *Meat Sci.*, 2007, **76**, 481-488.
- [66] Polati R., Menini M., Robotti E., Millionsi R., Marengo E., Novelli E., Balzan S., Cecconi D.: Proteomic changes involved in tenderization of bovine *Longissimus dorsi* muscle during prolonged ageing. *Food Chem.*, 2012, **135**, 2052-2069.
- [67] Purslow P.P., Archile-Contreras A.C., Cha M.C.: Meat Science and Muscle Biology Symposium: Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue. *J. Anim. Sci.*, 2012, **90**, 950-959.
- [68] Raynaud P., Gillard M., Parr T., Bardsley R., Amarger V., Leveziel H.: Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Arch. Bioch. Bioph.*, 2005, **440**, 46-53.
- [69] Rosochacki S.J., Juszczyk-Kubiak E., Bartoń L., Sakowski T., Połozynowicz J., Baranowski A., Matejczyk M.: Preliminary observations upon relation between the G77A polymorphism in CATD gene and lysosomal proteinases activity and sensory traits of meat from bulls of three breeds. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 2008, **26**, 1, 25-35.
- [70] Sandri M., Carraro U.: Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1999, **31**, 1373-1390.
- [71] Sawdy J.C., Kaiser S.A., St-Pierre N.R., Wick M.P.: Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36h *post mortem* correlate with tenderness at 7 days. *Meat Sci.*, 2004, **67**, 421-426.
- [72] Sentandreu M.A., Coulis G., Ouali A.: Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Tech.*, 2002, **13**, 400-421.
- [73] Shackelford S.D., Koohmaraie M., Whipple G., Wheeler T.L., Miller M.F., Crouse J.D.: Predictors of beef tenderness: Development and verification. *J. Food Sci.*, 1991, **56**, 1130-1135.
- [74] Smuder A.J., Kavazis A.N., Hudson M.B., Nelson W.B., Powers S.K.: Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. *Free Rad. Biol. Med.*, 2010, **49**, 1152-1160.
- [75] Sylvestre M., Balcerzak N.D., Feidt C., Baracos V.E., Bellut J.B.: Elevated rate of collagen solubilization and *post mortem* degradation in muscles of lambs with high growth rates: Possible relationship with activity of matrix metalloproteinases. *J. Anim. Sci.*, 2002, **80**, 1871-1878.
- [76] Szabadkai G., Rizzuto R.: Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: More than just neighborhood. *FEBS Letters*, 2004, **567**, 111-115.
- [77] Takahashi K.: Structural weakening of skeletal muscle tissue during *post-mortem* ageing of meat: The non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.*, 1996, **43 (S)**, 67-80.
- [78] Taylor R.G., Geesing G.H., Thompson V.F., Koohmaraie M., Goll D.E.: Is Z-disk degradation responsible for *post mortem* tenderization? *J. Anim. Sci.*, 1995, **73**, 1351-1367.
- [79] Tyszkiewicz I.: Mechanizm nieproteolitycznego kruszenia mięsa wołowego. *Rocz. Inst. Przem. Mięs. Tł.*, 1969, **6**, 75-93.
- [80] Wu F.Y., Smith S.B.: The role of ionic strength in the *post mortem* tenderization of meat. *Proc. 38th Ann. Recip. Meat Conf.*, 1985, 209.
- [81] Wu F.Y., Smith S.B.: Ionic strength and myofibrillar protein solubilization. *J. Anim. Sci.*, 1987, **65**, 597-608.
- [82] Zamora F., Aubry L., Sayd T., Lepetit J., Lebert A., Sentandreu M.A., Ouali A.: Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Sci.*, 2005, **71**, 730-742.
- [83] Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E., Ouali A.: Predicting variability of ageing and toughness in beef M. *Longissimus lumborum et thoracis*. *Meat Sci.*, 1996, **43**, 321-333.

- [84] Zapata I., Zerby H.N., Wick M.: Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 4956-4963.
- [85] Zhao Y.M., Basu U., Dodson M.V., Basarb J.A., Guan Le L.: Proteome differences associated with fat accumulation in bovine subcutaneous adipose tissues. *Proteome Sci.*, 2010, **8**, 14.

THEORIES CONCERNING NATURAL TENDERIZATION PROCESSES IN POST MORTEM MEAT

S u m m a r y

Of the various meat properties, which impact its quality, tenderness is the most important for the consumer. During the post mortem conversion of muscle to meat, a complex process of meat tenderization occurs. For a long time now, researchers in this field of science have been particularly interested in the mechanism of meat tenderization. Despite intensive studies, the crux of those processes is not thoroughly recognized. In the review paper, main theories are presented, which refer to the mechanisms of meat tenderization, both the non-enzymatic (calcium theory of meat tenderization, effect of osmotic pressure) and the enzymatic theories (processes including proteolytic endogenous enzymes: calpains and calpastatin, caspases, cathepsins, proteasomes, and matrix metalloproteases). The enzymes in question are likely to be engaged in the post mortem proteolysis of muscle proteins. Moreover, potential markers are discussed of different metabolic pathways that participate in developing the post mortem meat tenderness.

Key words: meat, tenderization, theories, tenderness, markers for tenderness 