

Wpływ procesu poubojowego dojrzewania mięsa wieprzowego na zmiany profilu białek i kruchość

EWA IWAŃSKA, BEATA MIKOŁAJCZAK, BOŻENA GRZEŚ, EDWARD POSPIECH

Instytut Technologii Mięsa, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

Otrzymano 21.06.2015

Zaakceptowano 16.11.2015

Iwańska E., Mikołajczak B., Grześ B., Pospiech E.

Impact of post mortem aging of pork on changes in the isoelectric point of the proteins and tenderness

Summary

The aim of the study was to evaluate the post mortem proteolysis of centrifugal drip protein derived from pork. The varied course of the process of meat tenderization in muscles using the isoelectric focusing (IEF) technique was observed. The experimental material was the longissimus lumborum et thoracis muscle excised from 24 pigs of known origin, breeding and rearing conditions. Meat of normal quality (RFN) was examined in this study. On the basis of shear force values, the experimental muscles were divided into 4 groups of different courses of tenderization: A – meat remaining tough during the entire 6-day period of post-slaughter changes; B – meat characterized by a typical tenderization process, i.e. tough 48 h after slaughter and tender after 6 days of storage; C – tender or relatively tender meat on both dates of examination; D – meat which was the toughest 48 hours after slaughter and the most tender 144 hours after slaughter. Proteins for electrophoretic analysis on the agarose gel of the centrifugal drip fraction were submitted after 48 h and 144 h post mortem. The separation of the proteins was performed in a horizontal layout, using an FBE-3000 apparatus and an ECPS power pack (Pharmacia). On every path of the proteins separation, four ranges of pH value were evaluated, namely: $4.0 \div 6.0$ pI, $6.1 \div 7.2$ pI, $7.3 \div 7.7$ pI and > 7.7 pI. Meat tenderness on the second day after slaughter was influenced by proteins, in which their pI was in the range of $6.1 \div 7.2$ and $4.0 \div 6.0$. From the evaluation which was carried out in the immunoblotting analysis of proteins using troponin T (9D) antibodies it was demonstrated that 48 h after slaughtering the most intense reactions were observed in the range of pI of $5.5 \div 5.9$, which is the pH range corresponding to the isoelectric point of troponin T. However, after 144 h post mortem the most intense reaction was demonstrated in the range of pI of $6.1 \div 7.7$. This indicates the breakdown of troponin T and an increase of the number of degradation products of this protein occurring while the meat tenderization process progresses. The degradation products of troponin T identified by IEF can be an indicator of meat tenderization.

Keywords: isoelectric focusing (IEF), troponin T, proteins of centrifugal drip, meat tenderness

Poubojową proteolizę białek mięśniowych i sarkoplazmatycznych można obserwować, wykorzystując techniki elektroforetyczne (2, 15-17). Jedną z nich jest ogniskowanie izoelektryczne (IEF – isoelectric focusing), które pozwala na wyznaczanie punktów izoelektrycznych (pI) białek (14). Punkt izoelektryczny jest definiowany jako wartość pH, przy której wypadkowy ładunek cząsteczki jest równy zero. W miejscu $\text{pH} = \text{pI}$ białko zatrzymuje się i jest widoczne po wybarwieniu żelu. W punkcie tym białka charakteryzują się najmniejszą rozpuszczalnością, lepkością i ruchliwością oraz maksymalną prędkością koagulacji i krystalizacji (22, 24). Ogniskowanie izoelektryczne odbywa się na nośniku, w którym wartość pH zmienia się w zakresie limitowanym zastosowanym amfolitem w sposób ciągły, od wartości najwyższej przy katodzie,

do najniższej przy anodzie. Amfoteryczne substancje, do których zalicza się białka, migrują w polu elektrycznym w kierunku przeciwnym ich ładunkowi. Zatrzymują się w miejscu, w którym pH jest równe ich pI (14, 21).

Zwykle procesy kruszenia mięsa charakteryzuje się, zwracając uwagę na degradację białek. W niniejszych badaniach przemiany te przeanalizowano, biorąc pod uwagę pI białek. Do tego celu wykorzystano metodę IEF. Proces kruszenia obserwowano w mięśniach, które różniły się dynamiką tego procesu. Wyodrębniono grupę, w której mięso świń było kruche już po 2 dobach przechowywania w chłodni, co jest zjawiskiem rzadkim, oraz takie, w których proces jest typowy i mięso jest kruche dopiero po 6 dobach. Osobną grupę stanowiły mięśnie, które nawet po 6 dniach były twarde.

Celem badań było określenie zmian udziału białek wycieku wirówkowego, pochodzących z mięśni o zróżnicowanym przebiegu kruszenia, na podstawie analizy ogniskowania izoelektrycznego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na mięśni najdłuższym klatki piersiowej i lędźwi (*m. longissimus thoracis et lumborum*) pochodzącym od 24 świń, które wyselekcjonowano spośród 165 sztuk. Uboj przeprowadzono po osiągnięciu przez zwierzęta masy około 110 kg, w standardowych warunkach, w zakładzie mięsnym. Do badań pobierano mięso normalnej jakości (RFN), które oceniano na podstawie pomiaru wartości pH po 45 minutach (pH₁) i po 24 godzinach (pH₂) oraz przewodności elektrycznej mierzonej w czasie 1,5 h (PE1) i 24 h (PE2) na lewej półtuszy.

Badany mięsień, wycięty z tuszy po jej wychłodzeniu, dzielono na porcje, pakowano próżniowo do worków poliamidowo-polietylenowych, a następnie przechowywano w temp. 2-4°C przez 48 godzin i 144 godziny od momentu uboju. W wymienionych terminach mięśnie wyjmowano z opakowań i przygotowywano do rozdzielania białek za pomocą ogniskowania izoelektrycznego. Białka wycieku wirówkowego otrzymano w wyniku odwirowania 6 g rozdrobnionej tkanki mięśniowej na wirówce typu Sigma 3K30 przez 20 minut, przy obrotach 15 000 × g w temperaturze 2°C (9). W celu oceny kruchości mięsa przygotowywano jego plastry o grubości 2 cm, które ogrzewano w piecu konwekcyjnym typu Rational Combi w temperaturze 160°C przez około 15 minut, aż do uzyskania w centrum geometrycznym próbki 72°C (7). Próbkę poddano działaniu siły tnącej skierowanej prostopadle do kierunku przebiegu włókien. Pomiaru dokonano na aparacie Instron 1140 wyposażonym w przystawkę Warnera-Bratzlera (3). Zastosowano następujące parametry pomiaru: szybkość trawersy 500 mm/min., zakres roboczy 200 mm, głowica 200 N. Na podstawie pomiaru maksymalnej siły cięcia dokonano klasyfikacji mięśni do czterech grup o różnym przebiegu procesu kruszenia, tj.: A – mięso twarde przez cały czas obserwacji zmian poubojowych, B – o normalnym przebiegu kruszenia, tj. twarde po 48 h od uboju i kruche po 6 dniach składowania, C – kruche w obydwu badanych terminach, D – o dużej twardości (powyżej 90 N/cm²) w terminie 48 h i bardzo kruche (poniżej 30 N/cm²) po 144 h przechowywania. Za mięso twarde uznano takie, dla którego war-

tość maksymalnej siły cięcia wynosiła powyżej 60 N/cm² a bardzo twarde – > 90 N/cm², natomiast mięso kruche charakteryzowało się wartością tego parametru poniżej 45 N/cm² i bardzo kruche < 30 N/cm² (tab. 1).

Ogniskowanie izoelektryczne (IEF). Przeprowadzono je na żelu agarozowym, którego skład stanowiły 1,2 g agarozu (Agarose for IEF, Serva), 0,8 g D-sorbitolu i 300 µl amfolitu (Servalyte 3-10 pH, Serva). Zawartość białka w 10 µL próby wyznaczono przy użyciu 2-D Quant Kit (GE Healthcare Bio-Sciences). Na każdą ścieżkę naniesiono 4 µg białka. Rozdział białek wykonano na aparacie FBE – 3000 do prowadzenia elektroforezy poziomej oraz zasilacza ECPS firmy Pharmacia. Elektroforezę prowadzono przez 1,5 godziny, stosując następujące parametry prądu: napięcie – 120 V, natężenie – 15 mA, moc – 2 W. Po zakończeniu rozdzielania żel utrwalano 10% roztworem TCA oraz barwiono i odbarwiono w celu uwidocznienia rozdzielonych białek (20).

Identyfikacji troponiny T dokonano za pomocą metody immunoblottingu zgodnie z procedurą podaną przez Fritza i Greasera (5). Zastosowano przeciwciała monoklonalne antytroponiny T (9D), pozwalające na identyfikację tego białka oraz produktów jego degradacji. Przeciwciała pochodziło z Laboratorium Nauk o Mięsie i Biologii Mięśnia Uniwersytetu Wisconsin-Madison w Stanach Zjednoczonych.

Ocenę rozdzielania białek uwzględniającą ich pI przeprowadzono komputerowo, za pomocą programu Image Master® 1D v 4.0. Analizowano poszczególne ścieżki rozdzielania, wyznaczając udział rozdzielonych białek w badanych zakresach wartości pH punktu izoelektrycznego. Wielkość powierzchni pasma uzyskanego w wyniku rozdzielania w stosunku do wielkości powierzchni wszystkich prążków rozdzielonych na żelu odpowiadała udziałowi danego białka.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników polegała na wyliczeniu wartości średniej i odchylenia standardowego. Ocenę istotności wpływu badanego czynnika (czasu lub grupy procesu kruszenia) na analizowany parametr przeprowadzono, wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Ocenę współzależności udziału białek wycieku wirówkowego i wartości siły cięcia przeprowadzono obliczając współczynniki korelacji liniowej (r-Pearsona). Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 10.0 PL (23).

Wyniki i omówienie

Na każdej ścieżce rozdzielania białek wydzielono 4 zakresy pI: pierwszy: 4,5÷6,0 pI, drugi: 6,1÷7,2 pI, trzeci: 7,3÷7,7 pI oraz czwarty: > 7,7 pI, w których obserwowano istotne zmiany udziału białek w zależności od analizowanego modelu kruszenia i czasu, jaki upłynął od momentu uboju. Uzyskane rezultaty przedstawiono w tab. 2 oraz na ryc. 1.

Ilość białek pierwszego zakresu (4,0÷6,0 pI) z reguły wzrastała w czasie przechowywania mięsa wraz z postępującym procesem kruszenia (tab. 2). W omawianym zakresie prawdopodobne jest wystąpienie następujących białek: desminy (α-desmina pI = 5,65; β-desmina pI = 5,7), troponiny C pI = 4,1, troponiny I pI = 5,5, α-aktyniny pI = 5,6, aktomiozyny (pI = 5,2-5,4) (1, 18) oraz troponiny T – pI = 5,99 (16).

Tab. 1. Wpływ czasu przechowywania na kruchość mięsa (siła cięcia N/cm²; n = 24)

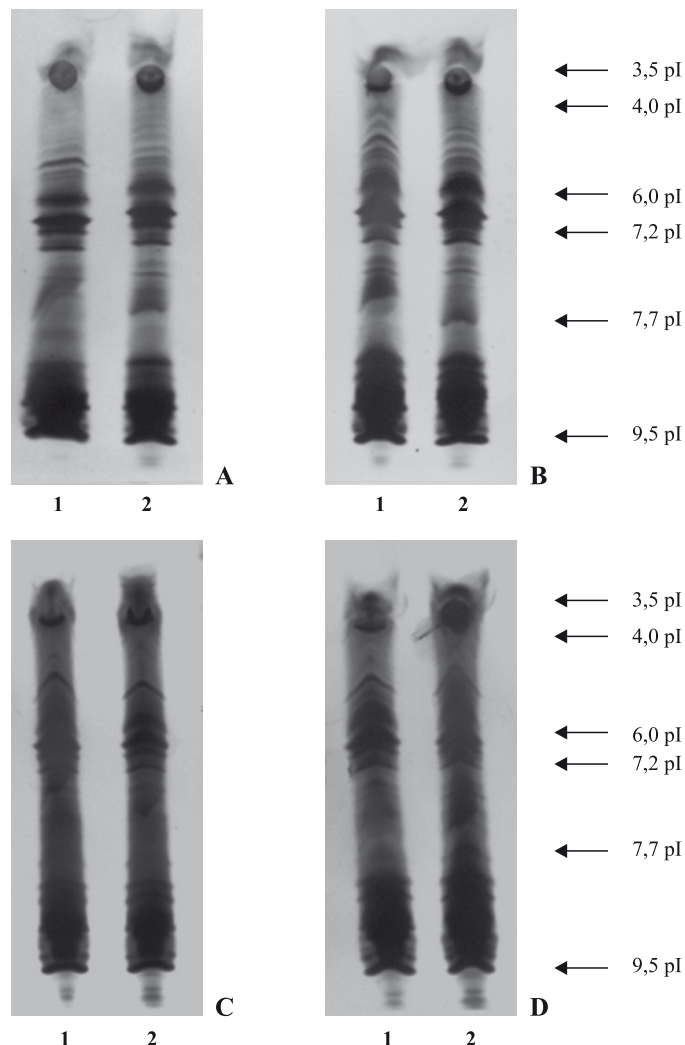
Grupa	Czas	
	48 h	144 h
A	73,34 ^{Ba} ± 14,14	61,31 ^{Ba} ± 6,50
B	69,30 ^{Ba} ± 8,50	35,19 ^{Ab} ± 5,82
C	39,42 ^{Aa} ± 3,93	35,82 ^{Aa} ± 4,20
D	92,92 ^{Ca} ± 9,23	28,70 ^{Ab} ± 2,80

Objaśnienia: A, B – wartości średnie oznaczone różnymi dużymi literami różnią się istotnie statystycznie (p < 0,05) w danym czasie względem grupy; a, b – wartości średnie oznaczone różnymi małymi literami różnią się istotnie statystycznie (p < 0,05) w danej grupie względem czasu

Tab. 2. Wpływ czasu przechowywania na udział białek wycieku wirówkowego z mięsa o zróżnicowanym przebiegu procesu kruszenia w wyznaczonych zakresach pI (n = 24)

Zakres pI białek wycieku wirówkowego	Grupa			
	A	B	C	D
48 h				
4,0-6,0 pI	19,55 ^{Aa} ± 2,43	19,34 ^{Aa} ± 2,48	26,64 ^{Ba} ± 2,51	19,99 ^{Aa} ± 2,48
6,1-7,2 pI	32,38 ^{Ca} ± 1,80	28,69 ^{Bb} ± 1,88	22,97 ^{Aa} ± 2,65	29,07 ^{Ba} ± 4,03
7,3-7,7 pI	13,36 ^{Ba} ± 1,53	11,05 ^{Aa} ± 1,60	18,23 ^{Ca} ± 2,48	16,61 ^{Cb} ± 0,94
> 7,7 pI	34,68 ^{Ab} ± 1,98	40,57 ^{Bb} ± 3,01	36,47 ^{Ab} ± 3,44	30,74 ^{Aa} ± 1,48
144 h				
4,0-6,0 pI	24,64 ^b ± 2,49	24,32 ^b ± 1,90	24,85 ^a ± 2,16	25,15 ^a ± 8,33
6,1-7,2 pI	32,75 ^{Ba} ± 6,29	23,92 ^{Aa} ± 3,20	25,36 ^{Aa} ± 2,89	24,29 ^{Aa} ± 8,60
7,3-7,7 pI	14,83 ^{ABa} ± 3,78	16,88 ^{Bb} ± 1,77	15,77 ^{ABa} ± 2,54	13,41 ^{Aa} ± 2,96
> 7,7 pI	27,48 ^{Aa} ± 4,38	34,80 ^{Ba} ± 1,37	34,07 ^{Ba} ± 1,67	31,03 ^{Ba} ± 5,50

Objaśnienia: A, B – wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi dużymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$) w danym czasie względem grupy; a, b – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi małymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$) w danej grupie względem czasu



Ryc. 1. Ogniskowanie izoelektryczne (IEF) białek wycieku wirówkowego pochodzącego z mięsa o zróżnicowanym przebiegu kruszenia

Objaśnienia: A – mięso twarde, B – mięso o normalnym przebiegu kruszenia, C – mięso kruche, D – mięso bardzo twarde 48 h i kruche 144 h po uboju. Próby: 1 – 48 h, 2 – 144 h

Obserwacje wielu autorów (4, 6, 12, 13, 25, 26) wskazują, że białka te są degradowane przez szereg enzymów proteolitycznych, takich jak: μ -kalpaina (troponina I, desmina), m-kalpaina (troponina I, desmina), katepsyna D i L (α -aktynina, troponina I, desmina) i katepsyna B (α -aktynina, troponina I i C, desmina). Powyższe może powodować osłabienie struktury sarkomeru i prowadzić do kruszenia mięsa. W grupie C charakteryzującej się najlepszą kruchością po 48 godzinach już w pierwszym terminie badań obserwowano statystycznie istotnie największy udział białek o pI w przedziale wartości pH 4,0÷6,0 (tab. 2). Ich udział w tej grupie wynosił 26,64%, natomiast w mięśniach twardych pozostałych grup mieścił się w przedziale 19,34%÷19,99%. Przeprowadzona

analiza korelacji liniowej dla wszystkich badanych grup wykazała ujemną zależność pomiędzy ilością białek o pI w zakresie 4,0÷6,0 pH a kruchością mięsa mierzoną instrumentalnie po 48 h ($r = -0,65$; $p < 0,05$), zatem wzrost udziału białek w omawianym przedziale pI był istotnie związany ze zmniejszeniem wartości siły cięcia, czyli polepszeniem kruchości. Po 6 dniach przechowywania we wszystkich grupach mięsa udział tych białek był wyrównany i wahał się od 24,32% do 25,15%, przyjmując wielkości największe dla mięsa z grupy D, które charakteryzowało się najniższą siłą cięcia w tym terminie.

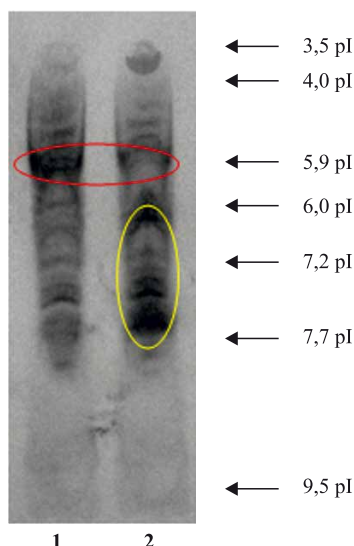
Udział białek z zakresu 6,1÷7,2 pI w wycieku wirówkowym pozyskanym 48 godzin po uboju był najmniejszy ($p < 0,05$) w grupie C (22,97%) w porównaniu do ich ilości w pozostałych grupach (tab. 2). Wydłużenie czasu składowania mięsa wpłynęło na zmniejszenie udziału białek omawianego zakresu w wycieku pochodzącym z mięśni, które ulegały kruszeniu z grupy B i D (odpowiednio: 23,92% i 24,29%). Czas, jaki upłynął od uboju, nie wpłynął na ich zawartość w wycieku grupy A. Natomiast w grupie C udział białek w zakresie 6,1÷7,2 pI nieznacznie się zwiększył (tab. 2). Powyższe dowodzi, że przechowywanie i związany z nim proces dojrzewania mięsa prowadziły do zmniejszenia udziału białek w tym przedziale pH. Analiza korelacji wykazała istotną, ale stosunkowo niską, zależność pomiędzy udziałem białek o pI w zakresie 6,1÷7,2 obserwowanym na żelu 48 godzin od momentu uboju a siłą cięcia mięsa oznaczoną po 48 h i 144 h (odpowiednio: $r = 0,57$ i $r = 0,48$; $p < 0,05$). Powyższe wskazuje jednak, że wielkość udziału białek o pI 6,1÷7,2 w wycieku wirówkowym może być związana z kruchością mięsa. Ciekawy jest fakt, że western blotting z zastosowaniem przeciwciała antytroponiny T (ryc. 2) wykazał wyraźny wzrost udziału pasm białek o punkcie izoelektrycznym w zakresie 6,1÷7,2

wartości pH wraz z postępującym dojrzewaniem mięsa. Pojawianie się produktów degradacji troponiny T wskazuje na zaawansowany proces kruszenia mięsa (8, 19).

Ilość białek wycieku wirówkowego o pI w przedziale 7,3÷7,7 wahała się w granicach 11,05% ÷ 18,23% (tab. 2). Ich największy udział obserwowano w wycieku pochodzącym z mięsa kruchego (grupa C) po 48 godzinach od uboju (tab. 2). W wycieku wirówkowym z mięśni twardych (A) obserwowano niewielki wzrost udziału tych białek w czasie przechowywania. W wyciekach pochodzących z grup C i D wydłużenie czasu przechowywania przyczyniło się do istotnego zmniejszenia udziału pasm omawianych białek. W grupie B natomiast obserwowano sytuację odwrotną. Powyższe wskazuje, że udział białek w przedziale pI 7,3÷7,7 nie odzwierciedla w pełni zmian, jakie zachodzą podczas kruszenia mięsa.

W ostatnim wyznaczonym zakresie pI > 7,7 następowało z reguły zmniejszenie udziału białek wraz z upływem czasu przechowywania. Po 48 h od uboju ich ilość mieściła się w granicach od 30,74% do 40,57%. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że największy udział tych białek był w wycieku pochodzącym z mięśni grupy B – 40,57%. Natomiast najmniej było go w grupach, do których należało mięso twarde A i D (odpowiednio: 34,68% i 30,74%). Stwierdzono, że po 6 dniach przechowywania statystycznie istotny najmniejszy udział tego białka odnotowano w grupie A (27,47%) w porównaniu do pozostałych grup. Przeprowadzona analiza korelacji wykazała istotną ujemną zależność pomiędzy ilością białek o wartości pI > 7,7 w wycieku otrzymanym po 144 godzinach od uboju a wielkością siły cięcia mięsa w tym terminie ($r = -0,81$; $p < 0,05$).

Na podstawie przeprowadzonego immunoblottingu białek, przy wykorzystaniu przeciwciała antytroponiny T (9D) (ryc. 2), stwierdzono, że po 48 h od uboju najintensywniejszą reakcję obserwowano w zakresie pI 5,5÷5,9, czyli w przedziale wartości pH odpowiadającym punktowi izoelektrycznemu troponiny T.



Ryc. 2. Immunoblotting rozdzielów IEF białek wycieku wirówkowego pochodzącego z mięsa o zróżnicowanym przebiegu kruszenia z udziałem przeciwciała troponiny T. Próby: 1 – 48 h, 2 – 144 h

Natomiast po 144 h najintensywniejszą reakcję wykazano w przedziale pI 6,1÷7,7. Powyższe świadczy o rozpadzie troponiny T i zwiększeniu ilości produktów jej degradacji wraz z postępującym procesem kruszenia mięsa (ryc. 2), co potwierdza wcześniejsze obserwacje innych autorów (8, 10, 11, 19).

Na podstawie przeprowadzonej analizy ogniskowania izoelektrycznego stwierdzono, że zmiany udziału białek wycieku wirówkowego, w wyznaczonych zakresach pI (4,5÷6,0 pI; 6,1÷7,2 pI; 7,3÷7,7 pI; > 7,7 pI) są związane z procesem kruszenia mięsa. Szczególną uwagę zwraca zmniejszenie udziału białek charakteryzujących się pI w przedziale 6,1÷7,2 wraz z postępującym procesem poubojowej proteolizy mięsa. Ponadto analiza immunoblottingu wykazała, że białka tego zakresu silnie reagowały z przeciwciałem troponiny T, uwidaczniając produkty degradacji troponiny T aktywnie uczestniczącej w kruszeniu mięsa. Produkty degradacji troponiny T identyfikowane po rozdziale IEF mogą być wskaźnikiem procesu dojrzewania mięsa.

Piśmiennictwo

1. Asghar A., Samejina K., Yasui T.: Functionality of muscle protein in gelation mechanism of structured meat products. *CRC Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.* 1985, 22, 1, 27-84.
2. Costa-Lima B. R. C., Suman S. P., Li S., Beach C. M., Silva T. J. P., Silveria E. T. F., Bohrer B. M., Boler D. D.: Dietary ractopamine influences sarco-plasmatic proteome profile of pork Longissimus thoracis. *Meat Sci.* 2015, 103, 7-12.
3. Crystall B. B., Culioli J., Demeyer D., Honikel K. O., Moller A. J., Purslow P., Schwagele F., Shorthose R. L., Uytterhaegen L.: Recommendation of reference methods for assessment of meat tenderness. 40-th ICoMST 1994. Dan Haag, Netherlands, Aug.28-Sept. 2 session v. 05, 1994.
4. Dransfield E.: Optimization of tenderization, ageing and tenderness. *Meat Sci.* 1994, 36, 105-121.
5. Fritz J. D., Greaser M. L.: Changes in titin and nebulin in postmortem bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.* 1991, 56, 607-610, 615.
6. Goll D. E., Kleese W. C., Okitani A., Kumamoto T., Cong J., Kaprell H. P.: Historical background and current status of the Ca^{2+} -dependent proteinases system in intracellular calcium-dependent proteolysis. Mallgren R. L., Murachi T. (eds) – CSR press, Boca Raton, FL 1990, s. 3-24.
7. Grześ B., Pospiech E., Koćwin-Podsiadła M., Łyczynski A., Zybert A., Mikołajczak B., Iwańska E.: Analysis of the causes of meat quality variations of pigs with the genotype. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2005, 14/55, SI 1, 59-63.
8. Hollung K., Veiseth E., Jia X., Færgestad E. M., Hildrum K. I.: Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Sci.* 2007, 77, 97-104.
9. Honikel K. O.: Critical evaluation of methods detecting water-holding capacity in meat. Accelerated processing of meat. Romita A., Valin C., Taylor A. A., (ed.) Elsevier App. Sci. Publ. Ltd., 1987, s. 225-239.
10. Hughes M. C., Geary S., Dransfield E., McSweeney P. L. H., O'Neill E. E.: Characterization of peptides released from rabbit skeletal muscle troponin-T by μ -calpain under conditions of low temperature and high ionic strength. *Meat Sci.* 2001, 59, 61-69.
11. Joo S. T., Kaufman R. G., Kim B. C., Park G. B.: The relationship of sarcoplasmatic and miofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Sci.* 1999, 52, 291-297.
12. Koohmaraie M.: Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 1994, 36, 93-104.
13. Koohmaraie M.: The role of Ca^{2+} -dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie* 1992, 74, 239-245.
14. Kolakowski E.: Protein Determination and Analysis in Food Systems, [w:] Sikorski Z. E. (red.): Chemical & Functional Properties of Food Proteins. Pennsylvania, Lancaster 2001.
15. Lee E.-J., Kim Y.-H., Lee N.-H., Hong S.-I., Yamamoto K., Kim Y.-J.: The role of sarcoplasmatic protein in hydrostatic pressure-induced myofibrillar protein degradation. *Meat Sci.* 2011, 87, 219-222.

16. Marino R., Albenzio M., Malva A., Carpoese M., Santillo A., Sevi A.: Changes in meat quality traits and sarcoplasmatic proteins during aging in three different cattle breeds. *Meat Sci.* 2014, 98, 178-185.
17. Marino R., Albenzio M., Malva A., Santillo A., Loizzo P., Sevi A.: Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time. *Meat Sci.* 2013, 95, 281-287.
18. Papa I., Mejean C., Lebart M. C., Astier C., Roustan C., Benyamin Y., Alvarez C., Verrez-Bagnis V., Fleurence J.: Isolation and properties of white skeletal muscle alpha-actinin from sea-trout (*Salmo trutta*) and bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 1995, 112, 271-282.
19. Penny I. F., Dransfield E.: Relationship between toughness and troponin T in conditioned beef. *Meat Sci.* 1979, 3, 135-141.
20. Pospiech E., Peltre G., Wąsowicz E., Jeleń H., Greaser M. L., Mikołajczak B., Bresińska A., Gorączka A.: Elektroforeza, [w:] Jankiewicz M., Kędzior Z. (red.): *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii*. Wydawnictwo AR Poznań, WTŻ 2003, s. 171-210.
21. Pospiech E., Greaser M. L., Peltre G., Mikołajczak B.: Electrophoretic isofocusing in studies on meat protein from various animal species and pork stored under different conditions. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2005, 14/55, 299-302.
22. Sikorski E. (red.): *Chemia żywności*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2002.
23. Stanisław A.: *Przystępny kurs statystyki w oparciu o program Statistica PL na przykładach z medycyny*. StatSoft Polska Sp. z o. o., Kraków 1998.
24. Stryer L.: *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000.
25. Suzuki K., Ohno S.: Calcium activated neutral protease structure – function relationship and functional implications. *Cell Struct. Funct.* 1990, 15, 1-6.
26. Young L. L., Lyon C. E.: Effect of calcium marination on biochemical and textural properties of *peri-rigor* chicken breast meat. *Poultry Sci.* 1997, 76, 197-201.

Adres autora: dr inż. Ewa Iwańska, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań; e-mail: eiwanska@up.poznan.pl