

内源性蛋白酶 在宰后猪肉成熟过程中的作用

谢婷, 李诚

(四川农业大学食品科学系, 四川 雅安 625014)

摘要: 本文分别阐述了两类内源性蛋白酶, 即钙蛋白酶和溶酶体组织蛋白酶的结构、性质、影响酶活性的因素及其在猪肉成熟过程中的作用, 认为在猪肉宰后成熟过程中, 钙蛋白酶发挥的作用更显著。

关键词: 钙蛋白酶; 溶酶体组织蛋白酶; 嫩度

Effect of Endogeneous Proteases during Post-mortem Conditioning of Pork

Xie Ting, Li Cheng

(Food Science Department, Sichuan Agricultural University, Ya'an Sichuan 625014)

Abstract: This paper mainly reviewed two categories of endogeneous proteases — calpains and lysosomal cathepsins, including the structures, characters, influencing factors and the effect during postmortem conditioning of pork of cathepsins and calpains, and considered that the effect of calpain during postmortem conditioning of pork is more important.

Key words: Calpains; Lysosomal Cathepsins; Tenderness

中图分类号: TS201 文献标志码: A 文章编号: 1001-8123 (2008)06-0011-04

猪肉嫩度是评价其食用价值和经济价值的重要指标, 也是消费者除肉品安全以外最关心的问题。猪肉的嫩度与肉中结缔组织的含量、动物的年龄、肌束的结构和生化特性等诸多因素有关, 肌间结缔组织的结构形成猪肉的背景硬度, 其在煮制前基本上无变化, 肌原纤维中主要骨架蛋白的降解才能形成猪肉的最终嫩度, 其是在猪宰后肌肉成熟过程中形成的。猪肉中的内源性蛋白酶, 即钙蛋白酶和溶酶体组织蛋白酶, 在这一过程中发挥了重要作用。

1 钙蛋白酶 (Calpain)

钙蛋白酶(EC3, 4, 22, 17)是细胞内依钙中性半胱氨酸巯基内肽酶, 其中 Cal 代表钙调蛋白 (Calmodulin), Pain 代表木瓜蛋白酶 (Papain)。

Calpain 即是由钙调蛋白和木瓜蛋白酶两者以非共价键结合成的嵌合体, 主要分布在肌原纤维的 Z 盘附近。自从 Busch (1972)^[1]报道了肌肉中的钙激活因子 (CAF) 以来, 陆续有科学家证明了钙蛋白酶在促进肌原纤维的削弱中占有重要地位。

1.1 钙蛋白酶的分类及结构

1.1.1 钙蛋白酶的主要同源型

根据钙蛋白酶表现最高活性所需的 Ca^{2+} 浓度的不同, 将普遍存在的 calpain 分为两种, μ -Calpain (又称 Calpain I) 和 m -Calpain (又称 Calpain II), 激活所需 Ca^{2+} 浓度分别为微摩尔级和毫摩尔级。Ohno 等 (1990)^[2]发现 μ -Calpain 和 m -Calpain 是异源二聚体, 分享同一个分子质量为 30 ku 的小亚基, 另一个 80 ku 大亚基只显示出大约 50% 的序

列相似性,但都是不同基因的产物。Koomaraie (1992)^[3]发现在有 Ca^{2+} 存在的情况下,钙蛋白酶会开始自溶,使其被激活,但继续自溶最终使 μ -Calpain 和 m -Calpain 失活。两种 Calpain 都具有水解肌原纤维蛋白的活性。

尽管 μ -Calpain 和 m -Calpain 大亚基氨基酸序列有明显差异,但其结构是基本相同的,都由 4 个结构域组成。位于氨基端的结构域 I,占 10% 的氨基酸残基数(氨基酸 1-76),与已知蛋白的序列都不相同,在钙蛋白酶被激活的情况下,很容易发生自溶,由此推测其可能起钙蛋白酶的活性调节作用(Imajoh, 1986)^[4];结构域 II 是表现水解活性的关键部位,它约占大亚基总氨基酸残基的 35% 左右(氨基酸 77-316),此区也是两种同工酶大亚基间氨基酸序列同源性最高区域(可达 70%)。其活性中心由 Cys105, His262 和 Asn286 三个氨基酸残基组成,与巯基蛋白酶,如木瓜蛋白酶、组织蛋白酶有相似性(Ohno, 1984)^[5]。结构域 III 占 35% 的氨基酸残基数(氨基酸 317-555),此结构域很可能与抑制蛋白或激活蛋白的结合有关,起活性调节作用;结构域 IV 位于羧基端,占 20% 氨基酸残基(氨基酸 556-699),是钙离子结合的部位,与其他钙结合蛋白如钙调素蛋白(CaM)、肌钙蛋白(Troponin C)有明显的相似性,都含有钙结合蛋白所特有的 4 个 EF-手结构(Minami, 1988)^[6]。

小亚基有两个结构域,含 266 个氨基组成,两结构域之间由一段富含脯氨酸的序列连接(71-80 个氨基酸残基)。结构域和大亚基结构域类似,也有 4 个 EF-手结构,故也具有结合钙的活性。

1.1.2 钙蛋白酶的其他同源型

此外,钙蛋白酶还有胃专一的(nCL-2)蛋白质类型和骨骼肌专一的(nCL-1)蛋白质类型。

骨骼肌专一的同源型又称 p94^[7],即骨骼肌特异性钙蛋白酶,它在半胱氨酸蛋白酶结构域中 I 区的 N 端和 IV 区的 C 端,包含一个附加的插入序列。p94 只在骨骼肌细胞中表达,并含有大量的 mRNA,呈现高度表达特异性,但由于其自我消化能力强,体外分离精制困难,其体内活化及调控机制仍不清楚。目前尚未证据证明 p94 对宰后蛋白质水解有作用。

1.1.3 钙蛋白酶抑制蛋白(Calpastatin)

钙蛋白酶抑制蛋白(Calpastatin)是钙蛋白酶特异性拮抗蛋白,此蛋白具有特殊的直线性结构,不形成空间立体构造^[8]。钙蛋白酶抑制蛋白共有 5 个结构域,其中 4 个是钙蛋白酶抑制蛋白的活性中

心所在,具有相似的重复单位,重复区域具有相当保守的 30 个氨基酸序列,都包含有 Thr-Ile-Pro-Pro-X-Tyr-Arg,因此它可能是钙蛋白酶抑制蛋白起作用的关键部位。

钙蛋白酶抑制蛋白可以识别钙蛋白酶与 Ca^{2+} 结合引起的构象变化并与其特异性结合,从而保证钙蛋白酶对底物只进行局部的特定位点的水解。Calpain-Calpastatin 的相互作用是借助于钙蛋白酶的 Ca^{2+} 结合特性的,但并不是钙蛋白酶抑制蛋白与 Ca^{2+} 直接结合或钙蛋白酶抑制蛋白能够使与钙蛋白酶结合的 Ca^{2+} 分离。Calpain-Calpastatin 的结合是可逆的,钙螯合剂可以破坏这种结合。一分子的钙蛋白酶抑制蛋白可以抑制四个分子的 m 或 μ 型钙蛋白酶^[9]。但对骨骼肌型钙蛋白酶 p94 没有作用^[10]。

另外,Huang, J 等(1998)^[11]发现钙蛋白酶抑制蛋白在宰后肌肉中也会发生降解,但降解后的钙蛋白酶抑制蛋白同样具有抑制钙蛋白酶活性的作用。

1.2 影响钙蛋白酶活性的理化因素

1.2.1 温度和 pH 值的影响

钙蛋白酶是中性蛋白酶,最适 pH 为 7.5,最佳作用温度为 25℃。Dransfield (1994)^[12]通过建立钙蛋白酶失活的温度和 pH 模型后得出:在 10~25℃ 时,钙蛋白酶具有最适的活性。但即使在 5℃,pH 分别为 5.5 和 5.8 的条件下,钙蛋白酶还分别具有 25℃、pH 7.5 时活性的 24% 和 28%。

1.2.2 金属离子的影响

激活钙蛋白酶需要一定浓度的 Ca^{2+} ,由于宰后肌肉中 Ca^{2+} 浓度有限,不能使钙蛋白酶被充分激活,因此,在肌肉中加入外源性 Ca^{2+} ,能使钙蛋白酶最大限度的被激活。Koomaraie (1988)^[13]证明当肌肉放在含有 CaCl_2 的缓冲溶液中,则 24h 即可完成宰后的成熟,而缓冲溶液中的 CaCl_2 用 EDTA 代替就无此效果。

此外, Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 对肉也有一定的嫩化作用,使用钠、钾盐对肉的嫩化效果为钙盐的 43%,而镁盐的嫩化效果为钙盐的 73%。

Zn^{2+} 则会抑制钙蛋白酶的活性,50 μM 的 ZnCl_2 对钙蛋白酶的抑制率为 100%,但该抑制反应是可逆的,当用透析法除去 Zn^{2+} 后,钙蛋白酶的活性可以恢复。

1.2.3 化学因素的影响

钙蛋白酶是一种含巯基的酶,巯基乙醇等巯基试剂对钙蛋白酶有保护作用;碘乙酸、E-64 等则对钙蛋白酶发生不可逆的抑制作用,这些抑制剂可以以共价键的方式与酶的某些基团牢固结合,

而使酶失去活性。 β -肾上腺素对肉的嫩化有不良作用, EDTA、EGTA 等螯合剂由于结合了 Ca^{2+} 对钙蛋白酶也有抑制作用。

1.2.4 物理因素的影响

高压有利于肌质网和线粒体中 Ca^{2+} 的释放, 可瞬间提高肌浆中的 Ca^{2+} 浓度, 使钙蛋白酶的活性提高, 加速肉的成熟。但压力过大会导致酶变性以及在细胞液中 Ca^{2+} 浓度的短暂升高期间酶的自身降解, 反而降低酶活性。

1.3 钙蛋白酶的在宰后猪肉成熟过程中的作用

钙蛋白酶系统不仅在细胞内参与机体生长与代谢过程, 在肌原纤维更新和宰后嫩化中也扮演了重要角色。Suzuki 等 (1988)^[14]发现钙蛋白酶表达量的减少以及钙蛋白酶抑制蛋白表达量的增加, 都会导致肌肉蛋白水解率的增加及宰后肉嫩度的下降, 这表明钙蛋白酶水解作用是导致肉嫩化的主要因素。并且, 在宰后成熟的过程中 μ -Calpain 的活性显著下降, 而 m -Calpain 的活性几乎不变。因此 μ -Calpain 被认为是降解肌原纤维蛋白引起肌肉嫩化的主要酶。

研究表明, 钙蛋白酶参与肌原纤维蛋白质降解的第一步, 使完整的肌原纤维解装配成肌丝或多肽片段, 从而引发占横纹肌大部分的肌原纤维蛋白质的降解, 这一过程同时也是肌原纤维蛋白质水解过程中的限速步骤。钙蛋白酶对肌肉的嫩化作用主要表现在下面几种蛋白被降解:

(1) 连接蛋白 (Titin) 的降解。Titin 是一种高分子量 ($3 \times 10^3 \text{KD}$ 左右) 的蛋白质, 间跨了半个肌节的长度, 并在骨骼肌中联系着 Z 线和 M 线, 起着牢固连接粗丝、细丝和 Z 盘的作用。在肌肉成熟过程中, titin 的降解使 Z 盘弱化, 容易断裂, 促进肌原纤维小片化, 提高肉的嫩度。

(2) 半肌动蛋白 (Nebulin) 的降解。Nebulin 也是一种高分子量蛋白质 ($6 \times 10^2 \sim 9 \times 10^2 \text{KD}$)。其多肽链分别从 Z 盘延伸到细丝的游离端并与细丝紧密结合, 其 C 末端与 Z 盘联结, 对细丝结构的稳定性起一定作用。在成熟过程中, Nebulin 很容易被降解。

(3) Dystrophin 的降解。Dystrophin 是由两个亚基构成 (分子量约为 $4 \times 10^5 \text{Da}$)。它是 Costameres 的一部分。而 Costameres 联接肌纤维膜和肌原纤维蛋白, 起着稳定肌细胞结构的功能。Dystrophin 对宰后钙蛋白酶很敏感, 宰后 7 d 以后, 绝大部分发生降解。Costameres 是钙蛋白酶的良好底物, 也很容易被降解。Costameres 的降解致使肌

细胞结构易被破坏, 肌肉嫩度增加, 同时还有可能造成肌膜通透性增加和 Ca^{2+} 的大量内流, 从而激活 m -Calpain。

(4) 结蛋白 (Desmin) 的降解。结蛋白分子量约为 55000Da , 位于 Z 盘周围, 连结邻近的细丝, 排列成精确的构造。在肌肉成熟过程中, 结蛋白降解, 使肌原纤维间的横桥交联断裂, 从而使 Z 盘弱化。

(5) 肌原蛋白 (Troponin) 的分解。肌原蛋白又名肌钙蛋白, 分子量约为 $3.5 \times 10^4 \text{Da}$, 有三个亚基, 钙结合亚基 (TnC)、抑制亚基 (TnI) 和原肌球蛋白结合亚基 (TnT) 组成。其中 Troponin-T, 是骨骼肌细丝的一部分, 其亚基同时又构成肌钙蛋白的延长部分, 能结合原肌球蛋白 (Fropomyosin), 在肌原纤维起联接的作用, 且保持一定张力, 帮助调节肌原纤维收缩过程中的细丝。尸僵过程中 troponin-T 消失, 产生 $30 \sim 32 \text{KD}$ 的降解产物, 此现象与肉的嫩度有着密切的关系。Penny 和 Ferguson-Pryce (1979)^[15]最早提出用 SDS-PAGE 电泳观察肌钙蛋白 T 的损失和分子质量为 30KD 成分的相伴增加来作为评估肉的嫩度的指标。Tomoyuki, Ryoji 等 (2003)^[16]研究真空包装的猪肉也发现, 于 4°C 储藏 20 天后由 Troponin-T 水解产生的 32KDa 片断的量明显增加。

(6) 钙激活蛋白酶不能降解肌球蛋白 (Myosin)、 α -肌动蛋白 (α -Actin) 和 α -辅肌动蛋白 (α -Actinin)。

2 溶酶体组织蛋白酶

肌肉中除了含有钙蛋白酶外, 另一种主要蛋白酶就是溶酶体组织蛋白酶, 其主要包括组织蛋白酶 B、D、L 和 H。

2.1 溶酶体组织蛋白酶的分类及结构

2.1.1 组织蛋白酶 B、L 和 H

组织蛋白酶 B、L 和 H 都是半胱氨酸蛋白酶。组织蛋白酶 B、L 的最适 pH 值均为 $3.0 \sim 6.0$, 组织蛋白酶 H 的最适 pH 值为 $5.0 \sim 7.0$ 。成熟的组织蛋白酶 B 分子质量为 $24 \sim 29 \text{Ku}$, 它可以降解肌球蛋白, 肌钙蛋白和肌动蛋白; 组织蛋白酶 L 分子质量为 $25 \sim 29 \text{Ku}$, 对肌球蛋白重链、肌动蛋白、 α -肌动蛋白素、肌钙蛋白 T 和 I 都有较强的水解活性; 组织蛋白酶 H 具有内切酶和外切酶特性, 分子量为 $26 \sim 28 \text{Ku}$, Ouali 等 (1987)^[17]曾报道, 组织蛋白酶 H 几乎不能降解任何肌原纤维蛋白。

2.1.2 组织蛋白酶 D

组织蛋白酶 D 是一种天冬氨酸蛋白酶, 分子量为 $43 \sim 53 \text{Ku}$, 可以降解肌球蛋白重链、肌动蛋白、 α -肌动素等。组织蛋白酶 D 的最适 pH 值为 $3.0 \sim 4.5$, 但它以肌肉蛋白为底物时表现出较宽的

活性范围 (pH3.0~6.0)。

2.2 溶酶体组织蛋白酶在宰后成熟过程中的作用

溶酶体组织蛋白酶对宰后猪肉成熟初期的蛋白降解作用不大,因为:(1)溶酶体组织蛋白酶位于单层膜的溶酶体内,无法直接与肌原纤维接触,研究证明肌肉宰后贮存过程中溶酶体的破损是有限的,Dueastasing (1985)^[11]指出,即使经过电刺激的肉贮藏在4℃下,28天后溶酶体组织蛋白酶仍位于溶酶体内。(2)骨骼肌肌原纤维呈圆柱状,直径1~3 μm,长1~40mm,而溶酶体组织蛋白酶的直径约16nm,长约11mm,因此肌原纤维不能进入溶酶体组织蛋白酶。所以溶酶体组织蛋白酶在宰后成熟初期的肌原纤维降解中不能发挥作用。(3)组织蛋白酶的催化底物是肌球蛋白和肌动蛋白,但在肌肉的成熟过程中这两种蛋白并没有被降解。(4)从溶酶体组织蛋白酶作用的pH值和温度要求来看,组织蛋白酶在宰后肉成熟后期甚至成熟以后开始发挥作用。溶酶体的一个特殊性质是它们在酸性条件下为细胞内的水解提供定位点。

3 结论与展望

综上所述,溶酶体组织蛋白酶可以将肌原纤维经钙蛋白酶作用释放的肌丝,进一步降解为氨基酸,和降解钙激活蛋白酶不能降解肌球蛋白、α-肌动蛋白及α-辅肌动蛋白等蛋白质。但溶酶体组织蛋白酶对肌原纤维蛋白的降解作用不是使肌肉嫩化的主要原因,只有钙蛋白酶满足能够对宰后肌肉的嫩化起作用的酶三个条件,即:(1)存在于骨骼肌细胞中;(2)肌原纤维蛋白为反应底物;(3)在离体试验中对在宰后贮存中发生降解的蛋白质有水解作用。因此,大量研究表明钙蛋白酶才是猪肉宰后成熟过程中嫩化的主要作用酶。

因此,通过对钙蛋白酶的进一步研究,为从蛋白质和分子水平探讨猪肉嫩化机制提供了理论基础,使能更好的调控猪肉成熟过程,提高肉品嫩度。同时,钙蛋白酶基因作为提高猪肉嫩度的候选基因,通过辅助标记选择育种等技术的运用,将有利于快速培育高嫩度的动物品种,实现从基因水平控制肉品嫩度。

参考文献

- [1] Busch, W. A., Stromer, M. H., Goll, D. E. and Suzuki, A., 1972. Ca^{2+} -specific removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell Biology*, 52: 367.
- [2] Ohno, S., Minoshima, S., Kudoh, J., Fukuyama, R., Shimizu, Y., Ohmi-Imajoh, S., Shimizu, N. and Suzuki, K., 1990. Four

genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 53, 225-229.

- [3] Koochmarie, M., 1992. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle mu-calpain. *J. Anim Sci.*, 70: 3071-3080.
- [4] Imajoh, S., Kawasaki, H. and Suzuki, K., 1986. The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J. Biochem.*, 99: 1281-1284.
- [5] Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M. and Suzuki, K., 1984. Evolutionary origin of calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein. *J. Nature Lond.*, 312: 566-570.
- [6] Minami, Y., Emori, Y., Imajoh-ohmi, S., Kawasaki, H. and Suzuki, K., 1988. Carboxyterminal truncation and site-directed mutagenesis of the EF hand structure domain of the small subunit of rabbit calcium-dependent protease. *J. Biochem.*, 104: 927-933.
- [7] Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., 1989. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ-types. *J. Biol Chem.*, 264: 20106-20111.
- [8] Uemori, T., Shimojo, T., Asada, K., 1990. Characterization of a functional domain of human calpastatin. *J. Biochem Biophys Res Commun.*, 166: 1485-1493.
- [9] Maki, M., Talano, E., Mori, H., 1987. All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II. *J. FEBS Lett.*, 223: 174-180.
- [10] Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., 1995. Muscle-specific calpain, p94, response-ble for limb girdle muscular dystrophy type 2A associates with connexin through IS2, a p94 specific sequence. *J. Biol Chem.*, 270: 31158-31162.
- [11] Huang, J., Neil, E. F., 1998. Role Of calpain in skeletal muscle protein degradation. *J. Proc Natl Acad sci USA.*, 95: 12100-12105.
- [12] Dransfield, E., 1994. Modelling postmortem tenderization-V: Inactivation of calpains. *J. Meat Sci.*, 37: 391-409.
- [13] Koochmarie, M., 1988. Role of Ca^{2+} -dependent protease and lysosomal enzymes in postmortem changes in bovine skeletal muscle. *J. food sci.*, 53(5): 1253-1256.

(下转21页)

题,如只限于中低温的处理的食品上、影响风味物质的释放等方面,许多研究工作者已经在努力通过各种方法减少这些缺点,并且这种脂肪替代品具有和脂肪相似的细腻的质构和口感特性,可以显著降低能量的摄入量,而且蛋白质本身的营养价值没有改变,对人们的健康非常有好处。

参考文献

- [1] 徐聘,孔保华,武晗.脂肪替代品在肉制品中的研究与应用进展[J].食品研究与开发,2007,28(3):163-166.
- [2] Mokdad AH,Serdual JS.Actual causes of death in the unite states [J].AM Med Assn.2004,29(1):1238-1245.
- [3] C asimir C.Fat replacers [J].Food Technology,1998,52(3):47-53.
- [4] 南海函,郑建仙.以蛋白质为原料开发脂肪替代品的探索[J].食品工业科技,2002,23(2):81-83.
- [5] 蔡秋生.脂肪替代品特性及其开发现状和前景[J].粮食与油脂,1998,(3):31-35.
- [6] 张丹凤.乳清蛋白的特性及其在乳制品生产中的应用[J].中国乳业,2007,(3):27-28.
- [7] 文仁贵,扶雄,杨连生,等.脂肪替代品模拟脂肪的机理[J].中国油脂,2006,31(5):28-31.
- [8] 屠用利.食品中的脂肪替代物[J].食品工业,2000,(3):17-19.
- [9] 卢蓉蓉,李玉美,高乾.以乳清蛋白为基质的脂肪替代品的微粒化研究[J].食品与发酵工业,2006,32(9):39-42.
- [10] Zoulias EI,Oreopoulou V,Tzia C.Textural properties of low-fat cookies containing carbohydrate-or protein-based fat replaces [J].Journal of Food Engineering,2002,55:337-342.
- [11] 罗志刚,高群玉,杨连生.脂肪替代品在食品中的应用[J].粮油食品科技,2002,10(6):6-8.
- [12] 王岩,陈雪,王遂.蛋白质基质的脂肪模拟物的制备及性质的研究[J].化学工程师,2007,(7):60-62.
- [13] 阙建全.食品化学[M].北京:中国农业出版社,2002.
- [14] 李小勇,李洪军,杜红霞,等.胶原蛋白的最新研究及应用进展[J].食品科技,2006,(7):12-15.
- [15] 郑建仙,高孔荣.脂肪替代品的最新进展[J].化工时刊,1994,(10):7-11.
- [16] 李玉美,卢蓉蓉,许时婴.蛋白质为基质的脂肪替代品研究现状及其应用[J].中国乳品工业,2005,33(8):34-37.
- [17] 卢蓉蓉,李玉美,许时婴.以酶法改性乳清蛋白为基质的脂肪替代品在冰淇淋中的应用[J].食品与机械,2006,22(5):23-26.
- [18] 刘国信.乳清蛋白在肉类加工中的新应用[J].肉品卫生,2005,(2):30-31.
- [19] Cengiz E, Gokoglu N. Changes in energy and cholesterol contents of frankfurter-type sausages with fat reduction and fat replacer addition [J] Food Chemistry 2005, 91(3):443~447.
- [20] Geni R.et al.Effect of fat replacers on the nutritive valueand acceptability of beef frankfurters [J]. Journal of FoodComposition and Analysis 2004,17(3):469~474.

(上接14页)

- [14] Suzuki, K., ImaJoh, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Minami, Y. and Ohno, S., 1988. Regulation of activity of calcium activated neutral protease. Adv. Enzymol. Rel. Areas, 27, 153-169.
- [15] Penny, I. F and Ferguson-Pryce, R., 1979. Measure-ment of autolysis in beef muscle homogenates. J. Meat Sci., 3: 121-134.
- [16] Tomoyuki Okumura, Ryoji Yamada Toshihide Nishimura., 2003. Survey of condition-ing indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during post-mortem conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. J. meat sci., 64: 467-473.
- [17] Ouali, A., Garrel, N., Obied, A., 1987. Comparative ac-tion of cathepsin D, B, H, L and of a new lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils. J. Meat Sci., 19: 83-100.
- [18] Dueastasing, A., Valin, C., Schollmeyer, J., Cross, R., 1985. Effects of electrical stimulation on post-mortem changes in the activities of two Ca dependent neutral proteinases and their inhibitor in beef muscle. J. Meat Sci., 15: 193-202.