

**INVLOED VAN DIERTYPE OP
POSTMORTALE GLYCOLYSE BIJ
RUNDEREN**
MASTERPROEF

Jens Vanclooster

Stamnummer: 01401795

Promotor: Prof. dr. ir. Stefaan De Smet

Tutor: Prof. dr. ir. Stefaan De Smet

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in Master of Science in de bio-ingenieurswetenschappen: landbouwkunde

Academiejaar: 2019 - 2020



Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.
Universiteitsbibliotheek Gent, 2020.

This page is not available because it contains personal information.
Ghent University, Library, 2020.

WOORD VOORAF

Deze masterproef was een unieke kans om mijzelf te verdiepen in het productie- en verwerkingsproces van rundvlees alsook vleeskwaliteit in het algemeen. Door deze thesis kreeg ik een gedetailleerde inkijk van het volledige slachtproces van runderen. Het originele onderwerp van deze masterproef werd op het laatste moment gewijzigd waardoor de ontwikkeling en afwerking van deze thesis zich over een langere periode heeft afgespeeld, maar door een goede samenwerking met het slachthuis en mijn begeleiders werd de masterproef succesvol afgerond.

Daarom wil ik als eerste het slachthuis Euro Meat Group (EMG), het slachtpersoneel en in het bijzonder Stefaan Lescouhier bedanken die mij geholpen hebben met de organisatie en logistiek van mijn praktische metingen en dataverzameling. Alsook de klanten van het slachthuis die mij de toestemming hebben gegeven om stalen te nemen van hun karkassen.

Daarnaast wil ik ook het labopersoneel van LANUPRO bedanken die mij ondersteund en geholpen hebben tijdens de praktische proeven in zowel het slachthuis als in het labo. Vooral Els Vossen wil ik bedanken die mij zeer goed heeft begeleid tijdens deze laboproeven.

Als belangrijkste persoon wil ik natuurlijk mijn promotor professor Stefaan De Smet bedanken die ondanks de moeilijke momenten mij steeds ondersteunde en bleef begeleiden om deze thesis afgewerkt te krijgen.

Ik wens u veel leesplezier toe.

PREAMBULE

Deze thesis werd afgewerkt tijdens het academiejaar 2019-2020. Begin 2020 kreeg België en andere landen over de wereld te kampen met het coronavirus SARS-CoV-2 en de bijhorende ziekte COVID-19. Sinds maart 2020 zijn in België bepaalde Corona-maatregelen van kracht gegaan voor allerlei sectoren waaronder het onderwijs. Sinds woensdag 18 maart 2020 werden alle niet-essentiële onderzoeksactiviteiten op de campussen van Universiteit Gent opgeschort.

Deze maatregelen hebben weinig tot geen invloed uitgeoefend op het eindresultaat van deze thesis. De praktische metingen en proeven in het slachthuis EMG te Moeskroen en in het labo op campus Coupure van de UGent werden reeds afgerond voor 16 maart 2020. Enkel tijdens het schriftelijk gedeelte en de afwerking van deze thesis werd in mindere mate hinder ondervonden.

Deze preambule werd in overleg tussen de student en de promotor opgesteld en door beiden goedgekeurd.

INHOUDSOPGAVE

Verklaring van auteursrecht	3
Woord vooraf.....	5
Preambule.....	7
Inhoudsopgave.....	9
Lijst met afkortingen	11
Nederlandse samenvatting	13
Summary.....	15
1 Inleiding.....	17
2 Literatuurstudie.....	19
2.1 <i>Het slachtproces</i>	19
2.1.1 Inleiding	19
2.1.2 Behandeling voor het slachten	19
2.1.3 Bedwelmen.....	20
2.1.3.1 Definitie	20
2.1.3.2 Fixatie	21
2.1.3.3 Bedwelmings technieken	21
2.1.3.3.1 Mechanisch bedwelmen.....	21
2.1.3.3.2 Elektrisch bedwelmen	23
2.1.3.4 Bewustzijn	24
2.1.3.5 Toekomstige bedwelmings technieken	24
2.1.4 Na het verbloeden	25
2.1.5 Religieus slachten	25
2.1.5.1 Halal vlees.....	25
2.1.5.2 Koosjer vlees.....	25
2.2 <i>Diertype</i>	26
2.2.1 Karkasclassificatie	26
2.2.2 Diertypen in Vlaanderen.....	27
2.3 <i>Biochemie van spieren</i>	30
2.3.1 Structuur van spieren	30
2.3.2 Spiervezeltypen	31
2.3.3 Spiercontractie	32
2.3.4 Energiebalans in levende spieren	33
2.4 <i>Transformatie van spieren naar vlees</i>	34
2.4.1 Inleiding	34
2.4.2 Het postmortale metabolisme	35
2.4.2.1 Het fosfogene systeem	36

2.4.2.2	Glycogenolyse.....	37
2.4.2.3	Anaerobe glycolyse.....	38
2.4.2.4	Mitochondriale ademhaling	41
2.4.3	Verzuring van spierweefsel	42
2.5	<i>Vleeskwaliiteit</i>	47
2.5.1	Malsheid	47
2.5.2	Waterbindingscapaciteit	47
2.5.3	Kleur	48
2.5.4	DFD	49
3	Onderzoeksdoelstellingen	51
4	Methodologie	53
4.1	<i>Proef 1: Verloop van postmortale glycolyse bij drie diertypen</i>	53
4.2	<i>Proef 2: Eigenschappen van vleesstalen bij drie diertypen</i>	55
4.3	<i>Statistische analyse</i>	58
5	Resultaten en discussie	61
5.1	<i>Proef 1: Verloop van postmortale glycolyse bij drie diertypen</i>	61
5.2	<i>Proef 2: Eigenschappen van vleesstalen bij drie diertypen</i>	66
6	Algemene conclusie	71
	Bibliografie	73
	Bijlage	81

LIJST MET AFKORTINGEN

ADP	Adenosinedifosfaat
AK	Adenylaatkinase
AMP	Adenosinemonofosfaat
ATP	Adenosinetrifosfaat
CK	Creatinekinase
Cr	Creatine
DeoxyMb	Deoxymyoglobine
EFSA	European Food Safety Authority
GP	Glycogeenfosforylase
HSA	Humane Slaughter Association
IMP	Inosinemonofosfaat
M	Melkkoe
MetMb	Metmyoglobine
NAD	Nicotinamideadenine-dinucleotide
NADP	Nicotinamideadenine-dinucleotidefosfaat
OxyMb	Oxymyoglobine
PCr	Creatinefosfaat/ Fosfocreatine
PFK	Fosfofructokinase
Pi	Vrije fosfaatgroep
PK	Pyruvaatkinase
T	Temperatuur
VK	Vleeskoe
VS	Vleesstier

NEDERLANDSE SAMENVATTING

In deze thesis wordt de invloed van diertype op het verloop van de postmortale glycolyse bij runderen onderzocht. Drie verschillende diertypen werden geïdentificeerd namelijk melkkoeien, vleeskoeien en vleesstieren. Alle vleeskoeien en vleesstieren behoren tot het Belgisch Witblauwras. In een eerste proef werd het verloop van de postmortale glycolyse van de drie verschillende diertypen in kaart gebracht a.d.h.v. pH- en temperatuurmetingen in de *M. longissimus dorsi* op 1, 3, 5 en 24 uur post mortem. In totaal werden 204 karkassen opgevolgd, bestaande uit 93 melkkoeien, 34 vleeskoeien en 77 vleesstieren. Het pH- en temperatuurverloop van vleeskoeien en vleesstieren waren niet significant verschillend. Melkkoeien hadden significant lagere karkastemperaturen en hogere pH-waarden t.o.v. de andere diertypen. Een aantal karkassen van de vleeskoeien en vleesstieren ondervonden *heat shortening*, terwijl karkassen van melkkoeien een hoger risico hadden op *cold shortening*. In een tweede proef werden vleesstalen van de *M. longissimus dorsi* afkomstig van de drie diertypen geanalyseerd op biochemische eigenschappen en vleeskwaliteitskenmerken die verband houden met het postmortale metabolisme. In totaal werden stalen genomen van 16 melkkoeien, 8 vleeskoeien en 10 vleesstieren. Voor deze proef werden volgende analyses uitgevoerd: kleurmetingen, bepaling van het glycolytisch potentieel, bepaling van het carnosine- en anserinegehalte, en activiteitsmetingen van drie enzymen (lactaatdehydrogenase, succinaatdehydrogenase en glutathionperoxidase). Vlees afkomstig van vleesstieren hadden de hoogste L*-waarde (bleke kleur), terwijl vleeskoeien de hoogste a*-waarde (rode kleur) hadden. Melkkoeien hadden significant donkerder en minder rood vlees t.o.v. de andere diertypen. Het glycolytisch potentieel was duidelijk significant hoger bij vleeskoeien en vleesstieren dan melkkoeien. Het carnosinegehalte was significant hoger voor vleeskoeien en vleesstieren t.o.v. melkkoeien, maar voor het anserinegehalte werd geen significant verschil gevonden tussen diertypen. Aan de hand van de enzymactiviteit van lactaatdehydrogenase en succinaatdehydrogenase werd bevestigd dat de spieren van vleeskoeien en vleesstieren een hoger aandeel glycolytische spiervezels bevatten t.o.v. melkkoeien. Het vlees van vleesstieren vertoonde de hoogste activiteit voor glutathionperoxidase en dit van vleeskoeien de laagste activiteit.

Kernwoorden: Rundvlees, glycolyse, karkas, diertype, kwaliteit.

SUMMARY

This study focuses on the effect of animal type on post-mortem glycolysis in cattle. Three distinct animal types were identified which are dairy cows, beef cows and beef bulls. All beef cows and bulls in this study belong to the Belgian Blue beef breed. The aim of the first experiment was to determine the course of post-mortem glycolysis according to animal type by means of pH and temperature measurements in the *M. longissimus dorsi* at 1, 3, 5 and 24 hour post mortem. In total 204 carcasses were measured, consisting of 93 dairy cows, 34 beef cows and 77 beef bulls. The pH and temperature values were not significantly different between beef cows and beef bulls. Dairy cows had significantly lower carcass temperatures and higher pH values compared to the two beef types. A number carcasses of beef cows and bulls experienced heat shortening, while carcasses from dairy cows had a higher risk of cold shortening. In a second experiment, meat samples of the *M. longissimus dorsi* were taken from 16 dairy cows, 8 beef cows and 10 beef bulls. The aim of this experiment was to analyse several biochemical properties and meat quality traits which relate to early post-mortem metabolism. The analyses consisted of measurement of meat colour, glycolytic potential, carnosine and anserine content, and the activity of three enzymes (lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and glutathione peroxidase). The colour of meat from beef bulls had the highest L*-value (paler) and meat from beef cows were significantly more red (higher a*-value). Dairy cows had a significantly darker and less red meat colour compared to the other animal types. The glycolytic potential was clearly significantly higher in beef cows and beef bulls compared to dairy cows. The carnosine content was also significantly higher for beef cows and beef bulls compared to dairy cows, but there was no significant difference for the anserine content between animal types. Based on the enzyme activity of lactate dehydrogenase and succinate dehydrogenase, it was confirmed that beef cows and bulls contain a higher proportion of glycolytic muscle fibers compared to dairy cows. Meat from beef bulls had the highest activity of glutathione peroxidase and meat from beef cows had the lowest activity.

Key words: Beef, glycolysis, carcass, animal type , quality.

1 INLEIDING

Rundvlees wordt beschouwd als een belangrijk en kostbaar levensmiddel. Het heeft een hoge voedingswaarde en is een rijke bron van onder andere hoogwaardige eiwitten, essentiële aminozuren, essentiële vetzuren, zink, selenium, ijzer en vitamines zoals vitamine B12 (De Smet & Vossen, 2017). In 2018 produceerde België 216.000 ton rundvlees, waarvan maar liefst 200.166 ton werd geëxporteerd naar het buitenland. Veilig en kwaliteitsvol rundvlees is dus een belangrijk Belgisch exportproduct. De totale Belgische populatie aan runderen in 2018 bedroeg ongeveer 2,4 miljoen dieren (Belgian Meat Office, 2019). De vleesveehouderij in België wordt gekenmerkt door zijn intensief karakter en maakt voornamelijk gebruik van het Belgisch Witblauwras. Een deel van de zoogkoeien wordt gehouden op gemengde bedrijven, waar bijvoorbeeld ook melkvee aanwezig is en het jongvee niet noodzakelijk ter plaatse wordt afgemest. In de meeste gevallen gaat het echter om gespecialiseerde vleesveebedrijven, waar de runderen worden aangehouden tot ze slachtklaar zijn. Anderzijds zijn er ook bedrijven die niet instaan voor zijn eigen reproductie en uitsluitend jongvee aankopen om deze af te mesten tot een slachtklaar gewicht. De mannelijke dieren bestaan voor het grootste deel uit jonge stieren, meestal met een leeftijd minder dan 24 maanden. De geslachte vrouwelijke volwassen dieren bestaan vooral uit reforme koeien en vaarzen waarmee niet verder wordt gefokt. Vooral melkkoeien die uit de melkproductie worden gehaald en afgeschreven zoogkoeien vallen onder de term reforme koe. Aangezien melkkoeien niet gehouden worden voor de vleesopbrengst is de kwaliteit van het vlees echter matig en de opbrengst lager t.o.v. vleesvee.

Tijdens de postmortale transformatie van spierweefsel naar vlees veranderen de structurele en biochemische eigenschappen van het spierweefsel. De anaerobe glycolyse speelt hierbij een cruciale rol. Deze transformatie start tijdens het slachtproces wanneer de runderen worden gekeeld en het dier sterft. Door een tekort aan zuurstof kan enkel via het anaeroob metabolisme energie worden geproduceerd in de spiercellen. De anaerobe glycolyse levert energie door spierglycogeen om te zetten tot melkzuur, met de verzuring van het spierweefsel tot gevolg. De snelheid en de intensiteit van de postmortale glycolyse, in combinatie met de temperatuurdaling door koeling, heeft een diepgaand effect op de uiteindelijke kwaliteit van het vlees zoals kleur, waterbindend vermogen en malsheid. Verschillende genetische en omgevingsfactoren kunnen het glycolyseproces in spieren beïnvloeden zoals ras, spiervezeltype, geslacht, leeftijd, productiesysteem, stress voor het slachten, manier van verdoven en het koelproces van de karkassen. In deze masterproef wordt gefocust op de invloed van het type rund op het verloop van de postmortale glycolyse.

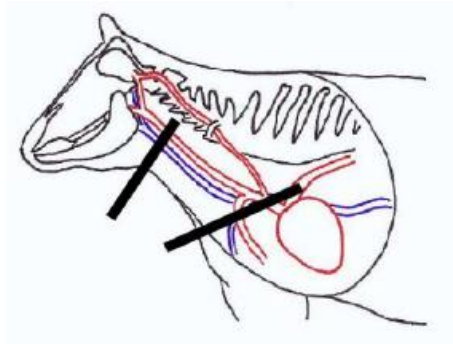
2 LITERATUURSTUDIE

2.1 Het slachtproces

2.1.1 Inleiding

Slachten betekent het doden van een dier via verbloeding. Verbloeden of kelen gebeurt door de belangrijkste halsslagaders in de nek met een scherp mes door te snijden. Op deze manier verliest het lichaam van het dier veel bloed. Er volgt een snelle daling van de bloeddruk en de toevoer van zuurstof naar de hersenen wordt stopgezet. Indien het dier niet vooraf werd verdoofd, zal hij pas na een bepaalde hoeveelheid bloedverlies zijn bewustzijn verliezen. Uiteindelijk houdt het hart op met kloppen en zal het dier sterven.

Naast de halsslagaders worden de hersenen ook voorzien van bloed via de vertebrale slagaders. Daarom wordt aangeraden niet enkel de halsslagaders, maar ook de vertebrale slagaders in de borststreek door te snijden om het uitbloeden te versnellen. Onderstaande Figuur 2.1 toont de posities om beide typen aderen door te snijden tijdens het slachten van een rund.



Figuur 2.1: Positie van de neksnede en snede in de borststreek bij een rund (EFSA, 2004)

Dit hoofdstuk behandelt enkel het slachtproces voor runderen zoals het wordt toegepast in de meeste commerciële slachthuizen. Het slachtproces wordt beschreven vanaf het transport naar het slachthuis tot de koeling van de karkassen. In dit hoofdstuk worden de belangrijkste stappen aangehaald tijdens het slachtproces die een mogelijk effect hebben op de postmortale glycolyse en vleeskwiteit.

2.1.2 Behandeling voor het slachten

De slachtklare runderen worden getransporteerd van de stal naar het slachthuis. Runderen zijn sociale dieren en ondervinden stress wanneer ze individueel verplaatst of geladen worden. Daarom wordt aangeraden de dieren zoveel mogelijk in kleine koppels of groepen te laden. Het laden gebeurt op deze manier sneller en de dieren ervaren minder stress. De afstand en tijd tijdens het transport dienen zo kort mogelijk gehouden te worden (Ferguson & Warner, 2008).

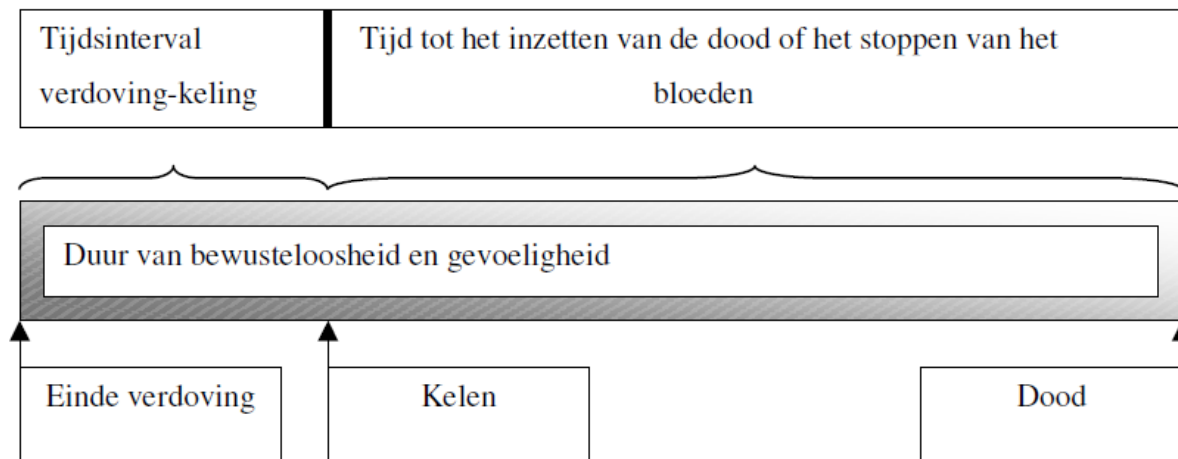
Tijdens het ontvangen van de dieren in het slachthuis wordt nagegaan of alle dieren zich in een gezonde fysieke toestand begeven. Zieke of kreupele dieren moeten meteen uit hun lijden verlost worden door ze op de wagen of in de stal te bedwelmen. Het gebruik van elektrische prikkers wordt te allen tijde afgeraden (Warner et al., 2007). Er moeten voldoende drinkvoorzieningen in de stal aanwezig zijn. De stal moet iedere dag zo proper mogelijk worden gemaakt. Te lange wachttijden tussen aankomst en slachten moeten vermeden worden. Een maximale wachttijd van drie uur wordt aangeraden. Langere wachttijden hebben een negatief effect op het welzijn van een rund. Slachthuizen zijn wettelijk verplicht om runderen voeder te verschaffen bij wachttijden langer dan twaalf uur. Dit werd beschreven in de Europese verordening (EG) Nr. 1099/2009, inzake de bescherming van dieren bij het doden. Deze maatregelen worden getroffen om acute of chronische stress zoveel mogelijk te vermijden en het welzijn van de dieren te garanderen. Dit heeft niet enkel een effect op het dierenwelzijn, maar ook op de uiteindelijke kwaliteit van het rundvlees (Ferguson & Warner, 2008).

2.1.3 Bedwelmen

2.1.3.1 Definitie

Het doel van bedwelmen of verdoven is een dier ongevoelig maken voor pijn en stress tijdens en na het slachten (Gregory & Grandin, 2007). Algemeen zorgen bedwelmings technieken voor een permanent of tijdelijk verlies van bewustzijn en sterft het dier enkel door het verbloeden. Indien geen bedwelmings wordt toegepast voor het kelen, komt het dierenwelzijn in het gedrang door pijn, angst en andere neveneffecten. Bedwelmen wordt niet enkel toegepast om het dierenwelzijn te garanderen, maar zorgt ook voor een betere veiligheid voor het slachtpersoneel. Volgens de verordening EC 1099/2009 moeten alle dieren in de Europese Unie verplicht voor het slachten verdoofd worden met uitzondering van het religieus slachten. Echter in Vlaanderen geldt sinds 1 januari 2019 alsook in Wallonië sinds 1 september 2019 een totaalverbod op onverdoofd slachten waar geen uitzondering wordt gemaakt op religieus slachten (Departement Omgeving, z.d.).

Het *stun-to-stick* interval of de tijd tussen het bedwelmen en kelen dient zo kort mogelijk gehouden te worden. Bij runderen mag deze niet langer duren dan 60 seconden (EFSA, 2004). Runderen verliezen namelijk relatief traag hun bewustzijn door bloedverlies t.o.v. andere diersoorten zoals schapen of geiten. Zonder bedwelmings kan de tijd tussen het doorsnijden van de halsslagaders en het verliezen van bewustzijn variëren tussen 19 tot 113 seconden (Daly et al., 1988; EFSA, 2004). Humaan of diervriendelijk slachten betekent dat de duur van het bedwelmings effect de periode tussen de bedwelmings en het inzetten van de dood volledig kan overbruggen. Dit wordt schematisch weergegeven in Figuur 2.2.



Figuur 2.2: Schematische weergave van de tijdsintervallen die vereist zijn bij diervriendelijk slachten (EFSA, 2004)

2.1.3.2 Fixatie

Runderen moeten vaak eerst gefixeerd worden alvorens te bedwelmen. Op deze manier kan de bedwelming op een correcte manier worden toegepast en verlaagt de kans op een slechte bedwelming. In de meeste commerciële slachthuizen wordt gebruik gemaakt van een bedwelgings- of fixatiebox. Dit zijn smalle boxen waarin het rund wordt gefixeerd in een rechtopstaande positie met aan de voorkant een opening voor de kop van het rund. De dieren moeten op een niet stressvolle manier in de box worden gedreven. Meestal zijn de boxen uitgerust met een kopfixator die de kop met behulp van een kinlift optilt en stilhoudt. Eens het dier succesvol werd gefixeerd, moet deze zo snel mogelijk bedwelmd en gekeeld worden.

2.1.3.3 Bedwelmingstechnieken

Meerdere verdovings- of bedwelmingstechnieken zijn beschikbaar om dieren te bedwelmen. De bedwelmingstechnieken die het meest worden toegepast bij runderen zijn mechanische en elektrische technieken. Andere technieken zoals bedwelmen met behulp van een gasmengsel of een elektrisch waterbad worden nauwelijks toegepast bij runderen, maar wel bij andere diersoorten zoals varkens en kippen (EFSA, 2004). De meest gangbare techniek om runderen te bedwelmen in commerciële slachthuizen zijn de mechanische methoden (Oliveira et al., 2018).

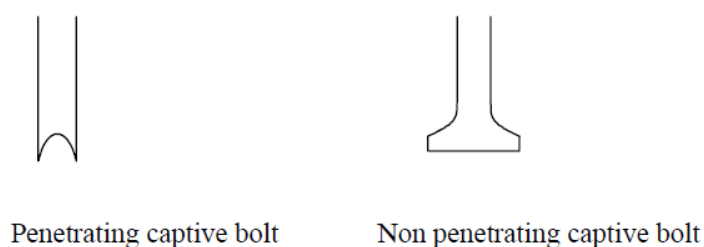
2.1.3.3.1 Mechanisch bedwelmen

Er worden in de praktijk twee mechanische bedwelmingstechnieken toegepast op runderen namelijk de doordringende (*penetrative*) en de niet-doordringende (*non-penetrative*) technieken (Blackmore & Delany, 1988). Deze methoden zijn gebaseerd op het induceren van een neurologische disfunctie en/of schade aan hersenweefsel door kinetische energie over te brengen van het toestel naar de hersenen. Hierdoor verliest het dier zijn bewustzijn en wordt ongevoelig voor pijn.

De doordringende methoden maken gebruik van een penschiettoestel (*captive bolt*) met een scherpe pin. Een penschiettoestel is een pistool dat op het voorhoofd van het rund wordt geplaatst en dat met grote kracht een pin in de hersenen schiet. Deze kan pneumatisch

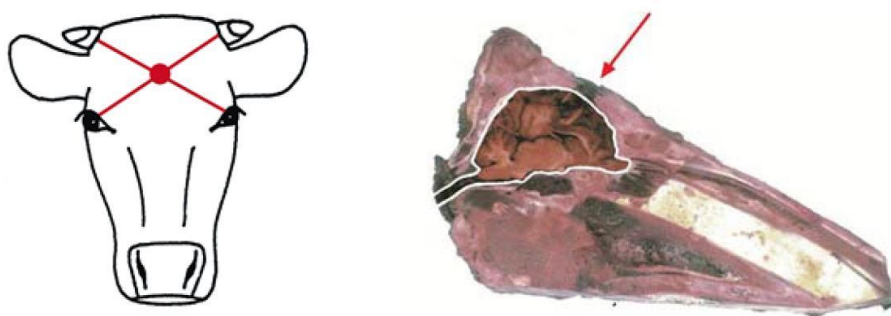
aangedreven worden of m.b.v. patronen. De pin vernietigt hersenweefsel waardoor deze bedwelming als een onomkeerbare of niet-reversibele methode wordt aanzien waarbij het dier na toepassing niet meer zijn natuurlijk gedrag zal kunnen uiten. Een rund kan via deze methode tot 10 minuten of langer zijn bewustzijn verliezen (EFSA, 2004).

De niet-doordringende methode maakt gebruik van kopslagtoestellen met een stompe pin. De techniek lijkt erg op het penschiettoestel, maar de pin zal de schedel en dus de hersenen niet penetreren. Deze kan gezien worden als een omkeerbare bedwelmingmethode, omdat het hersenweefsel niet wordt aangetast en het rund mogelijk terug bij bewustzijn kan komen. Naast een hersenschudding kan deze methode ernstige schedelbreuken en hersenbloedingen veroorzaken met de dood als gevolg. Onderstaande Figuur 2.3 toont de vorm van het uiteinde van de pin van beide toestellen.



Figuur 2.3: De top van de pin van een penschiettoestel (links) en een kopslagtoestel (rechts) (EFSA, 2004)

Op het vlak van dierenwelzijn wordt het penschiettoestel met scherpe pin geprefereerd, omdat de dieren veel langer hun bewustzijn verliezen alsook bij correct gebruik de kans op een geslaagde bedwelming veel hoger ligt (Oliveira et al., 2018). De bekwaamheid van de operator en de onderhoudstoestand van het bedwelmingstoestel hebben hier een grote invloed op. Wanneer een bedwelmingspoging mislukt, ervaart het dier grotere hoeveelheden angst en stress t.o.v. slachten zonder bedwelming (EFSA, 2004). Onderstaande Figuur 2.4 duidt de optimale schietpositie aan voor de toepassing van het toestel om succesvol runderen te mechanisch bedwelmen.



Figuur 2.4: Optimale schietposities met penschiet- en kopslagtoestel bij runderen (HSA, 2013)

2.1.3.3.2 Elektrisch bedwelmen

Bij elektrisch bedwelmen wordt een bepaalde hoeveelheid stroom door de hersenen van een dier geleid met behulp van twee of drie elektroden. Dit zorgt voor een verlies van bewustzijn en ongevoeligheid voor pijn in een zeer korte tijd. Daarom wordt deze methode vaak gezien als een humane of diervriendelijke manier van bedwelmen (Gregory & Grandin, 2007).

De stroom brengt het dier in een tijdelijke toestand van epilepsie die uit drie verschillende fasen bestaat (Simmons & Daly, 2004; Llonch et al., 2015). Tijdens de eerste fase ondergaat het dier een epileptische aanval. De elektrische stroom zorgt voor een verstoring van de neuronen en de afgifte van neurotransmitters in de hersenen (Holleben et al., 2010). Daaruit volgt de depolarisatie van de hersencellen waardoor een epileptische aanval wordt uitgelokt (Blackmore & Delany, 1988). In de tweede fase wordt de hersenactiviteit onderdrukt waardoor het dier zijn bewustzijn verliest. Gedurende de laatste fase of de herstelfase wordt de hersenactiviteit langzaam hersteld en komt het dier terug bij bewustzijn.

Er wordt onderscheid gemaakt tussen twee verschillende methoden van elektrisch bedwelmen op basis van de posities van de elektroden. De eerste methode is de *head-only* methode. Hierbij wordt een elektrische stroom enkel door het hoofd van het rund geleid. Hierdoor verliest het dier voor een bepaalde periode zijn bewustzijn. Deze methode wordt als een reversibele methode gezien, omdat het dier in de meeste gevallen na enige tijd terug bij bewustzijn kan komen en opnieuw normaal zal functioneren. Het dier zal dus enkel sterven door het verbloeden.

De tweede elektrische bedwelmingmethode is een niet-reversibele methode waarbij de stroom niet enkel door het hoofd, maar ook langs het hart door het volledige lichaam wordt gestuurd. Afhankelijk van de stroomparameters kan deze *head-to-body* methode naast een bedwelmend effect ook een harstilstand veroorzaken waardoor het dier sneller zal sterven. Beide methoden eisen dat het dier eerst gefixeerd wordt zodat de elektroden goed contact maken om voldoende stroom over te brengen.

Bij gebruik van de conventionele *head-only* methode zal na gemiddeld 30 tot 40 seconden het rund terug bij bewustzijn komen (Daly et al., 1988). Het is dus van cruciaal belang dat het verbloeden zo snel mogelijk na de bedwelming gebeurt om te garanderen dat het dier bedwelmd blijft tot het gestorven is. Het correct positioneren van de elektroden, het instellen en aanhouden van de geschikte elektrische parameters en het natmaken van de vacht hebben een grote invloed op de slaagkans van de bedwelming.

Australië en Nieuw-Zeeland maken courant gebruik van een systeem gebaseerd op de *head-only* methode om runderen te bedwelmen. Dit resulteerde in de *Jarvis Beef stunner*. Runderen krijgen een elektrische stroom van maximaal 3,5 A door een voltage van 550 V. Deze techniek kan ook gebruikt worden voor de productie van halal vlees. De elektrische bedwelming wordt gecombineerd met een vorm van elektro-immobilisatie om de kans op post-stun convulsies te verlagen (Gilbert et al., 1984; Wotton et al., 2000; Weaver & Wotton, 2009).

2.1.3.4 Bewustzijn

Nadat een bedwelming werd toegepast, moet nagegaan worden op de dieren of de bedwelming succesvol was en of de dieren niet terug tot bewustzijn komen. De aan- of afwezigheid van bewustzijn kan direct bepaald worden door gebruik te maken van een EEG of elektro-encefalogram. Echter het toepassen van deze methode in commerciële slachthuizen is praktisch onmogelijk. Daarom wordt het bewustzijn indirect geëvalueerd aan de hand van een aantal visuele indicatoren.

Indicatoren van een succesvolle bedwelming en verlies van bewustzijn zijn (Terlouw et al., 2016):

- Verlies van staande lichaamshouding/ in elkaar zakken
- Geen vocalisatie
- Geen rechtende reflex van kop of lichaam
- Afwezigheid van ritmische ademhaling
- Afwezigheid van de corneareflex
- Afwezigheid van andere oogreflexen
- Geen respons op pijnlijke stimuli
- ...

Wanneer één of meerdere van bovenstaande indicatoren afwezig zijn na het bedwelmen, dient het dier zo snel mogelijk een tweede maal verdoofd te worden. In de praktijk worden indicatoren zoals de afwezigheid van ritmisch ademen, geen vocalisatie, het verliezen van de lichaamshouding en andere factoren zoals hangende oren en tong het meest gecontroleerd (EFSA, 2004).

2.1.3.5 Toekomstige bedwelmingstechnieken

Er worden nog steeds nieuwe technieken onderzocht om runderen op een snellere en betere manier te bedwelmen. Recent wordt geëxperimenteerd met een nieuwe techniek om runderen elektrisch te bedwelmen. De SPUC-methode of *Single Pulse Ultra-high Current* is een variant op de *head-only* techniek waarbij een stroom van 70 A met een voltage van 5000 V wordt opgewekt en door de hersenen wordt gestuurd gedurende 50 ms. Het rund zou voor een langere periode tot 4 minuten zijn bewustzijn verliezen t.o.v. 40 seconden bij de conventionele elektrische methode (Robins et al., 2014). Aangezien de SPUC-methode wordt gezien als een omkeerbare methode, kan deze eventueel worden toegepast tijdens halal slachten.

DTS of *Diathermic Syncope®* is een nieuwe manier van bedwelmen gebaseerd op elektromagnetische energie. Het DTS-systeem stuurt microgolven door de kop van een rund. De opgewekte elektromagnetische energie zorgt voor een temperatuurstijging in de hersenen. Deze vorm van hyperthermie in de hersenen zorgt voor een verlies van bewustzijn zolang deze tussen de 43 en 50 graden Celsius blijft. Dit is opnieuw een omkeerbare methode van bedwelmen (McLean et al., 2017). De onderdrukking van de hersenactiviteit kan 80 seconden tot 4 minuten duren (Small et al., 2019).

2.1.4 Na het verbloeden

Nadat het dier bijna volledig is uitgebloed, volgt een reeks stappen om het gedode rund om te vormen tot een commercieel aanvaardbaar karkas. Meestal wordt het verdoofde rund eerst aan een achterpoot opgehesen om dan pas de halsslagaderen door te snijden. Dit vergemakkelijkt het uitbloeden en zo kan het bloed in een apart bad worden opgevangen. Er dient zo weinig mogelijk bloed in het lichaam achter te blijven, want achterblijvend bloed heeft negatieve effecten op de kwaliteit en de houdbaarheid van het vlees. Vervolgens wordt de kop van het lichaam verwijderd en apart verwerkt. Na het verwijderen van de poten begint het afhuiden of uitslachten. Organen en ingewanden zoals de luchtpijp, longen, hart, darmen, maag, lever, milt, nieren, uier etc. worden verwijderd. Het karkas wordt doormidden gezaagd tot een linker- en rechterhelft. Resterend slachtafval en overtollig vet worden van het karkas ontdaan. Het is belangrijk dat alle messen en ander materiaal regelmatig gespoeld en schoongemaakt worden om contaminatie te vermijden.

De karkassen worden op het einde van de slachtlijn gewogen, geclassificeerd en geregistreerd. Om de traceerbaarheid van het vlees te waarborgen, worden de oren met het oormerk van het slachtdier apart bewaard. De wettelijke plicht voor traceerbaarheid komt uit verordening EG 178/2002. Het karkas is klaar om gekoeld te worden. De karkassen worden door een koelgang geleid waar voorgekoelde lucht tussen de karkassen wordt geblazen. Uiteindelijk worden de gekoelde karkassen in koelcellen geplaatst tot deze worden verdeeld in de voor- en achterkwartieren en verder versneden worden tot individuele stukken vlees.

2.1.5 Religieus slachten

2.1.5.1 Halal vlees

Vlees kan enkel als halal vlees worden verkocht wanneer deze voldoet aan een aantal strenge voorwaarden zoals de diersoort en manier van slachten (Regenstein et al., 2003). Een belangrijke voorwaarde voor halal slachten is dat het dier enkel sterft door het verbloeden. Het dier moet dus voor en tijdens het kelen in leven zijn. Om deze reden worden dieren vaak onverdoofd geslacht voor de productie van halal vlees. Indien de dieren toch worden verdoofd, moeten reversibele bedwelmings technieken gebruikt worden. Anders kan niet gegarandeerd worden dat het dier enkel door het verbloeden is gestorven en niet door de bedwelmings techniek. Het toepassen van mechanische doordringende bedwelmings technieken worden niet geaccepteerd omdat deze niet-reversibele technieken zijn. Enkel reversibele technieken zoals *head-only* elektrisch bedwelmen worden in sommige situaties toegelaten voor de productie van halal vlees (Farouk, 2013).

2.1.5.2 Koosjer vlees

Net zoals bij halal vlees moet koosjer vlees voldoen aan strenge voorwaarden. Tijdens het slachten van dieren voor de productie van koosjer vlees moet het dier niet enkel levend zijn tijdens het kelen, maar ook bij volle bewustzijn. Bedwelmings technieken worden dus niet toegelaten bij het slachten.

2.2 Diertype

2.2.1 Karkasclassificatie

Aan het einde van de slachtlijn worden alle goedgekeurde karkassen gewogen en krijgen ze een kwaliteitsbeoordeling op basis van een algemeen classificatiesysteem. Het schema van de indeling van karkassen van runderen is vastgesteld door de Europese Unie. Alle verplichte informatie omtrent traceerbaarheid en karkasclassificatie wordt op een etiket gedrukt en aan beide karkashelften bevestigd.

Het etiket moet o.a. volgende informatie bevatten:

- Het erkenningsnummer van het slachthuis
- Het identificatienummer van het rund
- De slachtdatum
- De leeftijd van het rund
- Het warm karkasgewicht
- De categorie
- De beveleedsheidsklasse
- De vetheidsklasse

De indeling van karkassen is gebaseerd op drie aspecten namelijk diercategorie, beveleedsheid en vetbedekking. Bij de etikettering van de karkassen wordt het indelingsresultaat weergegeven als een code. Tabel 2.1 geeft een overzicht van de verschillende groepen voor de categorie. Deze zijn onder andere gebaseerd op de leeftijd en het geslacht van het dier. Vanaf een leeftijd van 8 maanden moeten deze runderen verplicht ingedeeld worden. De beveleedsheid of conformatie geeft informatie omtrent de grootte en vorm van de spieren op het karkas. De beveleedsheidsklassen zijn gebaseerd op het SEUROP-klassement (Tabel 2.2) waarbij de score varieert van superieure (S) tot geringe (P) beveleedsheid. Het laatste aspect of de vetheid beschrijft de graad van vetbedekking van het karkas (Tabel 2.3). Zowel de beveleedsheid als de vetheid worden nogmaals onderverdeeld in subklassen met de tekens -, = en +. Een karkas kan dus bijvoorbeeld de indelingscode 'AS=2-' krijgen wat overeenkomt met een karkas van een jonge stier met superieure beveleedsheid en een lichte vetbedekking.

Tabel 2.1: Indeling naar categorie (Departement Landbouw & Visserij, 2014)

Code	Omschrijving
A	Stieren tot 24 maanden (jonge stieren)
B	Stieren van 24 maanden en ouder (oude stieren)
C	Ossen
D	Gekalfde runderen (koeien)
E	Niet-gekalfde runderen (vaarzen)
Z	Runderen die ten minste 8 maanden oud zijn, maar jonger zijn dan 12 maanden

Tabel 2.2: Indeling naar beveleesdheid (Departement Landbouw & Visserij, 2014)

Code	Omschrijving
S	Superieure beveleesdheid
E	Uitstekende beveleesdheid
U	Zeer goede beveleesdheid
R	Goede beveleesdheid
O	Matige beveleesdheid
P	Geringe beveleesdheid

Tabel 2.3: Indeling naar vetheid (Departement Landbouw & Visserij, 2014)

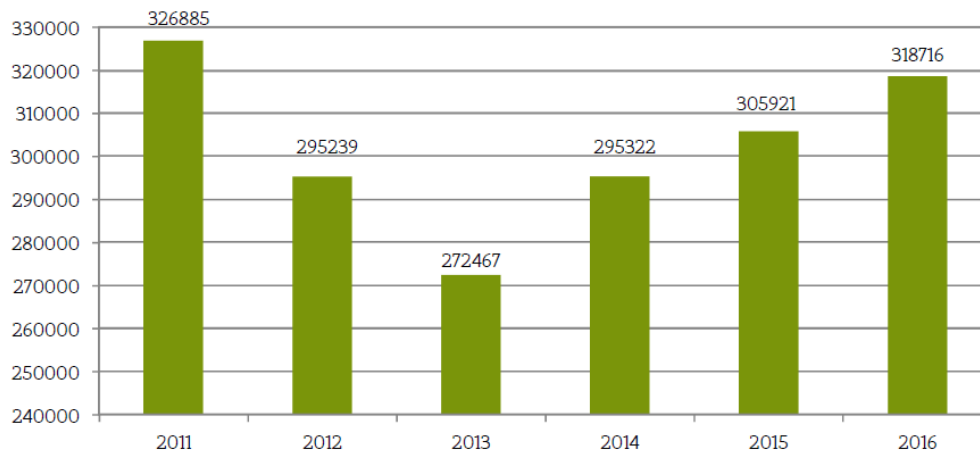
Code	Omschrijving
1	Geringe vetbedekking
2	Lichte vetbedekking
3	Middelmatige vetbedekking
4	Sterk vervet
5	Zeer sterk vervet

2.2.2 Diertypen in Vlaanderen

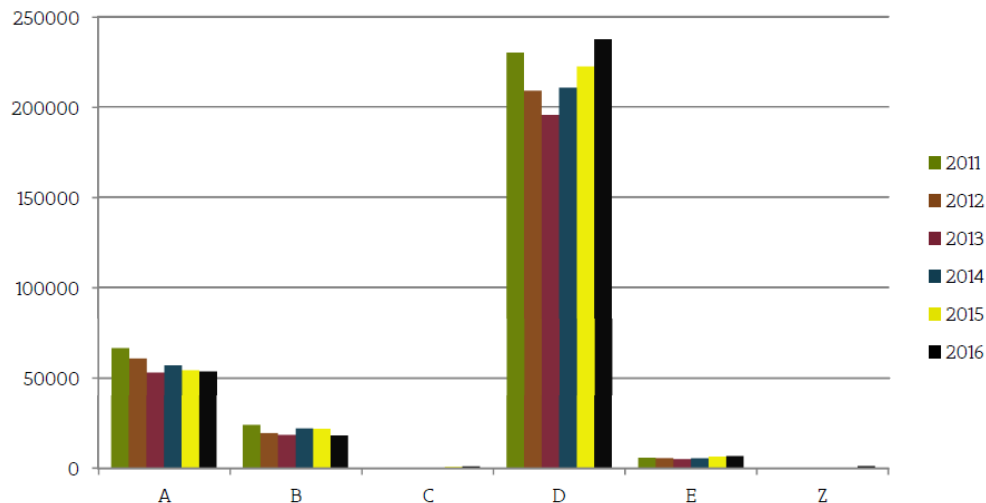
In Vlaanderen wordt jaarlijks een overzicht opgemaakt van het totaal aantal geslachte runderen en de resultaten van de indeling. Figuur 2.5 geeft een overzicht van het aantal geslachte runderen in Vlaanderen van 2011 tot 2016. In 2016 werden in totaal 318716 volwassen runderen in Vlaanderen geslacht. Figuur 2.6 geeft het aantal runderen ingedeeld volgens categorie. Categorie D of de categorie van de gekalfde runderen (koeien) bevat het meeste aantal dieren en bestaat voornamelijk uit melkkoeien aangevuld met koeien van het vleestype. Deze categorie vertegenwoordigt ongeveer drie kwart van het totaal aan geslachte runderen in 2016. De tweede belangrijkste categorie zijn de jonge stieren (code A) wat ongeveer 17 procent van het totaal uitmaakt. Verder wordt de rest aangevuld met dieren uit categorie B (6%) en E (2%). Categorie C (0,4%) en Z (0,5%) zijn nauwelijks vertegenwoordigd in Vlaamse slachthuizen.

Deze trend wordt weerspiegeld in de statistieken van het totaal aantal geslachte runderen in België. In 2017 bedroeg het totaal aantal geslacht grootvee 537644 dieren. Deze werd samengesteld uit 366.013 koeien (68%), 158.861 stieren (30%), 12.602 varzen (2%) en slechts 168 ossen (0,03%) (Statbel, 2018).

De Vlaamse rundveestapel in 2017 beschikte over 309.605 melkkoeien en 148.607 zoogkoeien. Vlaanderen beschikt over ongeveer 60 procent van het totaal aantal Belgische melkkoeien (VLAM Marketingdienst, 2019).

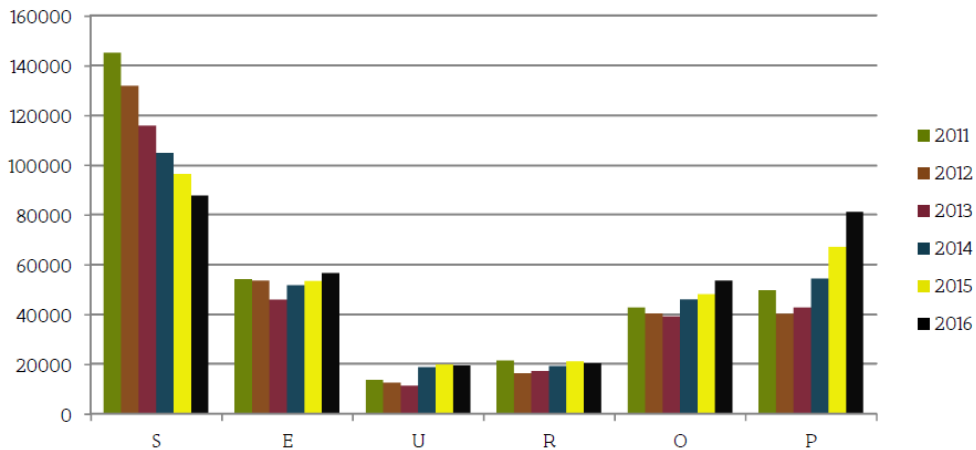


Figuur 2.5: Aantal geslachte volwassen runderen in Vlaanderen in de periode 2011 tot 2016 (Departement Landbouw & Visserij, 2014)

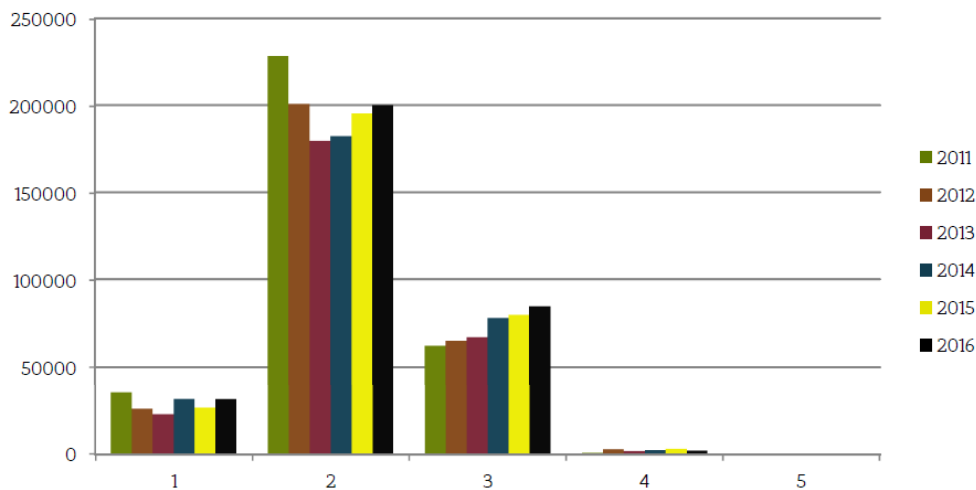


Figuur 2.6: Aantal ingedeelde runderen volgens categorie in Vlaanderen in de periode 2011 tot 2016 (Departement Landbouw & Visserij, 2014)

Het aantal dieren onderverdeeld per beveleedheidsklasse wordt weergegeven in Figuur 2.7. De procentuele aandelen van iedere klasse in 2016 bedroegen in dalende volgorde 28% (S), 25% (P), 18% (E), 17% (O), 6% (U) en 6% (R). De S-klasse wordt voornamelijk toegewezen aan stieren en koeien van het Belgisch Witblauwras. Karkassen afkomstig van andere rundveerassen behorende tot het vleestype worden meestal in de E-, U- of R-klasse ingedeeld. De meerderheid van karkassen met een beveleedheidscore O of P zijn afkomstig van reforme melkkoeien. Op het vlak van vetbedekking (Figuur 2.8) beschikken de meeste karkassen over een vetscore van 2 (63%). Sommige karkassen beschikken over een score van 1 (10%) of 3 (26%), maar zelden over een vetscore 4 of 5.



Figuur 2.7: Aantal ingedeelde runderen volgens beveleedsheid in Vlaanderen in de periode 2011 tot 2016 (Departement Landbouw & Visserij, 2014)



Figuur 2.8: Aantal ingedeelde runderen volgens vetheid in Vlaanderen in de periode 2011 tot 2016 (Departement Landbouw & Visserij, 2014)

Uit al deze gegevens kan geconcludeerd worden dat in Vlaanderen op economisch vlak de drie belangrijkste diertypen voor de productie van rundvlees bestaan uit:

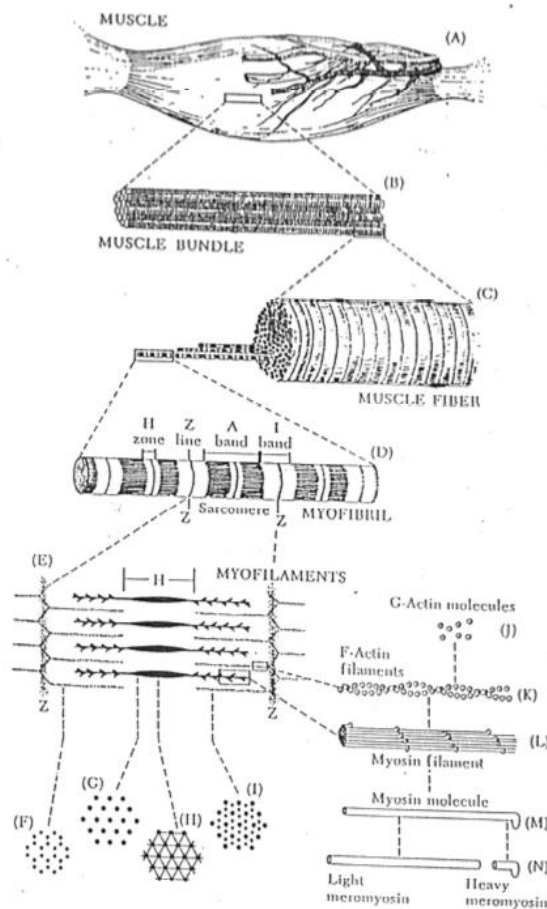
1. (Reforme) melkkoeien
2. Koeien van het vleestype
3. Stieren van het vleestype

2.3 Biochemie van spieren

2.3.1 Structuur van spieren

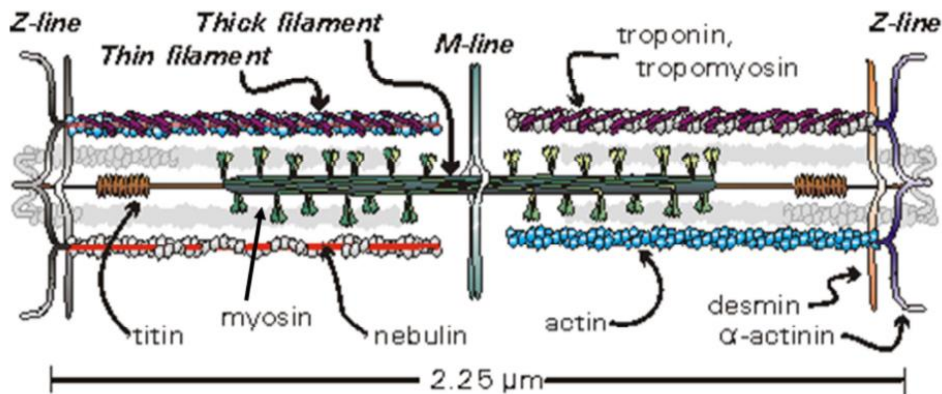
Er bestaan drie verschillende soorten spierweefsel: dwarsgestreept, glad en hartspierweefsel. Vlees bestaat voornamelijk uit dwarsgestreept spierweefsel afkomstig van skeletspieren. Skeletspieren zorgen voor gecontroleerde bewegingen van het lichaam en de organen. Deze spieren zijn voor ongeveer 90% opgebouwd uit spiervezels en voor ongeveer 10% uit bind- en vetweefsel. De spiervezels zijn gebundeld in spiervezelbundels en vormen in zijn geheel een spier (Figuur 2.9). De spieren, spiervezelbundels en spiervezels zijn omgeven door de respectievelijke bindweefsellagen epi-, peri- en endomysium. Skeletspieren bevatten in mindere mate vaat- en zenuwweefsel.

Spiervezels zijn langwerpige polynucleaire cellen met een lengte van enkele centimeters en een diameter van ongeveer 10 tot 100 μm . Deze zijn opgebouwd uit myofibrillen met een diameter tussen de 1 en 2 μm (Listrat et al., 2016). Myofibrillen beschikken over een cytoskelettaire structuur en bevinden zich samen met de mitochondriën en andere organellen in het sarcoplasma. De myofibrillen bestaan uit dikke filamenten opgebouwd uit myosine en dunne filamenten opgebouwd uit actine. De contractiele eiwitten myosine en actine spelen een belangrijke rol bij de contractie van spieren. De filamenten bevinden zich tussen twee Z-membranen gerangschikt in sarcomeren, de kleinste functionele eenheden van een spier.



Figuur 2.9: Structuur van skeletspieren (De Smet & Vossen, 2017)

Onderstaande Figuur 2.10 geeft een overzicht van de structuur van een sarcomeer. De sarcomeerlengte of de lengte tussen twee aangrenzende Z-lijnen varieert tussen 1,5 en 3 μm . Naast de contractiele myofibrillaire eiwitten bevatten sarcomeren nog andere soorten eiwitten zoals cytoskelettaire eiwitten. Zo bevat het Z-membraan o.a. α -actinine en desmine. Titine verbindt myosine horizontaal met de Z-membranen, terwijl nebuline de actine en myosine filamenten verticaal en parallel met de Z-membranen samenhouden.



Figuur 2.10: Structuur van een sarcomeer (De Smet & Vossen, 2017)

2.3.2 Spiervezeltypen

Individuele spieren zijn samengesteld uit verschillende soorten spiervezels, maar worden geassocieerd met het overwegend spiervezeltype. Spiervezels worden over het algemeen gekenmerkt door hun metabolische en contractiele eigenschappen. Deze contractiele eigenschappen hangen voornamelijk af van de myosine *heavy chain* isovormen aanwezig in de dikke filamenten. Algemeen worden vier verschillende soorten gehanteerd namelijk de types 1, 2A, 2X en 2B. De ATPase-activiteit van deze isovormen is gerelateerd aan hun contractiesnelheid: langzaam (type 1) en snel (types 2A, 2X en 2B). Hun individuele biologische eigenschappen worden weergegeven in onderstaande Tabel 2.4.

Spiervezels van type 1 worden vaak geassocieerd met rode spieren. Deze bevatten hogere gehalten aan myoglobine, zijn beter doorbloed en bevatten meer mitochondriën t.o.v. blekere spieren. Ze zijn meer ingesteld op een aeroob/oxidatief metabolisme en leveren efficiënter en langer energie. Deze spieren bevatten vaak hogere gehalten aan vetweefsel. Spiervezels van type 1 trekken trager samen ('*slow-twitch*') en worden ingezet voor het behouden van de lichaamshouding of tijdens langdurige inspanningen.

Bleke of witte spieren bevatten overwegend type 2B of snel-glycolytische spiervezels. Deze spieren met een overwegend anaeroob metabolisme hebben een minder ontwikkelde doorbloeding en een lager gehalte aan mitochondriën. Ze beschikken over een hogere glycolytische capaciteit en grote reserves aan glycogeen. Deze vezels produceren sneller energie onder de vorm van ATP waardoor ze sneller kunnen samentrekken ('*fast-twitch*'). Ze worden actief tijdens snelle, korte en intense inspanningen. Spiervezels van type 2A beschikken over zowel metabole eigenschappen van type 1 (oxidatief) als type 2B (glycolytisch). Type 2X is een intermediair type tussen 2A en 2B.

Diverse methoden zijn beschikbaar om spiervezeltypes te onderscheiden. Een eerste methode zijn de histochemische technieken. Dit betekent het maken van spierweefselcoupes en het microscopisch typeren na specifieke kleuringen. Een andere methode is gebaseerd op activiteitsmetingen van enzymen zoals succinaatdehydrogenase of lactaatdehydrogenase om oxidatieve en glycolytische vezels te onderscheiden (Gauthier, 1969).

Herkauwers zoals schapen en runderen produceren voornamelijk rood vlees grotendeels samengesteld uit oxidatieve spiervezels. In feite komen spiervezels van type 2B niet voor in schapen en worden deze slechts in enkele runderspieren gevonden met sterke verschillen tussen rassen (Listrat et al., 2016). Varkens- en kippenvlees daarentegen bestaan overwegend uit glycolytische spiervezels, wat voor de blekere kleur zorgt. Echter niet alle spieren van eenzelfde karkas behoren tot hetzelfde spiervezeltype en kunnen dus onderling verschillen in type en kleur. De distributie van spiervezels wordt beïnvloed door verschillende factoren zoals diersoort, leeftijd, ras, geslacht, voeding, toepassing van groeibevorderende stoffen enz. (Lefaucheur & Gerrard, 2000). De aard van de spiervezels kan veranderen naargelang de hoeveelheid lichaamsbeweging en activiteit van de spier.

Tabel 2.4: Eigenschappen van de verschillende spiervezeltypes (Lefaucheur, 2010)

	I	IIA	IIX	IIB
Contraction speed	+	+++	++++	+++++
Myofibrillar ATPase	+	+++	++++	+++++
Contraction threshold	+	+++	++++	+++++
Contraction time per day	+++++	++++	+++	+
Fatigue resistance	+++++	++++	++	+
Oxidative metabolism	+++++	++++	++	+
Glycolytic metabolism	+	++++	++++	+++++
Phosphocreatine	+	+++++	+++++	+++++
Glycogen	+	+++++	++++	+++++
Triglycerides	+++++	+++	+	+
Phospholipids	+++++	++++	+++	+
Vascularization	+++++	+++	+, ++	+
Myoglobin	+++++	++++	++	+
Buffering capacity	+	+++	+++++	+++++
Z line width	+++++	+++	+++	+
Diameter	++	+, ++	++++	+++++

¹+: very low; ++: low; +++: medium; ++++: high; +++++: very high.

2.3.3 Spiercontractie

De contractie van spieren is gebaseerd op de 'sliding filament' theorie waarbij de myosine- en actinefilamenten over elkaar worden geschoven. Spiercontractie resulteert in de verkorting of het opspannen van spieren. Tijdens de contractie verkort de sarcomeerlengte en na spierrelaxatie zal deze terug toenemen.

Na de aankomst van een zenuwsignaal in de spier verhoogt de permeabiliteit van het sarcolemma. Dit zorgt voor een depolarisatie van de spiercellen en heeft uiteindelijk de vrijstelling van membraangebonden calciumionen als gevolg. Het verhoogde aantal vrije calciumionen zal reageren met het troponine/tropomyosine-complex ter hoogte van de actinefilamenten waardoor de ATPase-activiteit van de myosinemoleculen geactiveerd wordt. Er ontstaat een binding tussen myosine en actine waarna de filamenten over elkaar worden getrokken. Deze binding tussen actine en myosine is reversibel en afhankelijk van de verhouding tussen de concentraties van ATP en ADP. De intensiteit van de contractie is afhankelijk van het aantal moleculen ATP dat per tijdseenheid verdwijnt of de activiteit van het myofibrillair enzym ATPase.

Tijdens de relaxatie van de spier wordt het zenuwsignaal onderbroken en de vrije calciumionen worden terug membranair gebonden. Dit resulteert in het inactiveren van het myosine ATPase en de bezetting van de bindingsplaatsen op actine door tropomyosine. Myosine kan niet meer binden met actine waardoor de sarcomeren zich terug in een rusttoestand begeven.

2.3.4 Energiebalans in levende spieren

ATP is het centrale molecuul omtrent het energiemetabolisme in cellen en vervult de rol als drager van chemische energie. Wanneer ATP wordt gehydrolyseerd tot ADP en een vrije fosfaatgroep (Pi) door ATPase wordt deze energie terug afgegeven en gebruikt voor o.a. de spiercontractie. De relatief stabiele concentratie van vrije ATP-moleculen in levende spiercellen bedraagt ongeveer 5 tot 8 μmol per gram spier (Berg et al., 2002). Deze hoeveelheid is slechts voldoende om twee tot vier seconden energie te leveren. Spiercontractie tijdens zware inspanningen kan resulteren in een 100-voudige toename van de ATP-behoefte in vergelijking met de rusttoestand (P. W. Hochachka & McClelland, 1997). Om spiercontractie te behouden, moet ATP worden geregenereerd met een snelheid die complementair is aan de ATP-behoefte. Er zijn drie energiesystemen om ATP in spieren aan te vullen: het fosfagene systeem, de glycolyse en de mitochondriale ademhaling.

Deze drie energiesystemen verschillen in de gebruikte substraten, intermediaire producten, maximale snelheid van ATP-synthese en de totale hoeveelheid ATP gegenereerd (Baker et al., 2010). Spieren kunnen gebruik maken van vier potentiële brandstoffen voor de productie van energie. Dit zijn creatinefosfaat (PCr), glycogeen, glucose of lipiden. PCr en glycogeen worden intramusculair opgeslagen. Glucose en lipiden worden vooral aangevoerd via het bloedplasma in de spieren. Het fosfagene systeem maakt gebruik van het intramusculair creatinefosfaat (PCr) om op een zeer snelle anaerobe manier ATP te regenereren. Dit is slechts een zeer korte manier om energie te produceren en dus onvoldoende om tijdens lange inspanningen energie te blijven leveren. Daarom wordt in levend spierweefsel de oxidatieve energieproductie geprefereerd. Glucose of lipiden worden volledig afgebroken in de mitochondriën onder aerobe omstandigheden. Mitochondriale ademhaling is een efficiënt proces voor de productie van ATP, maar verloopt relatief traag. Hierdoor kan tijdens perioden van ernstige stress of tijdens zeer zware inspanningen de aerobe capaciteit overschreden worden en moet beroep gedaan worden op het anaerobe metabolisme. Glucose wordt tijdens de anaerobe glycolyse omgezet tot lactaat om op een snelle manier toch aan de ATP-behoefte te voldoen. In sectie 2.4.2 worden deze energiesystemen verder besproken in de context van het postmortaal metabolisme in spierweefsel.

2.4 Transformatie van spieren naar vlees

2.4.1 Inleiding

De transformatie van spieren naar vlees omvat verschillende fysiologische en biochemische processen die door het dier en zijn weefsels worden opgeroepen in een vergeefse poging om de homeostatische controle te herstellen. Bij het slachten stopt de bloedsomloop, waardoor de aanvoer van zuurstof en energiedragers zoals glucose of lipiden naar het spierweefsel, alsook de afvoer van metabolieten wordt stopgezet. Echter de vraag naar energie in het lichaam neemt niet meteen af. *Post mortem* wordt ATP verbruikt voor onwillekeurige spiercontracties, instandhouding van het membraanpotentiaal en vooral om de calciumionengradiënt in het sarcoplasmatisch reticulum in de spiercellen te behouden (Pösö & Puolanne, 2005).

Door het tekort aan zuurstof kan enkel via het anaeroob metabolisme energie worden geproduceerd in een poging om homeostase in de spier te herstellen. De onmiddellijk beschikbare energiebronnen in spieren, vrije ATP-moleculen en creatinefosfaat, worden opgebruikt in een zeer korte tijd. Daarna wordt de toevoer van ATP voorzien door de beperkte reserves glycogeen om te zetten tot lactaat via anaerobe glycolyse.

Aangezien het gevormde lactaat niet meer kan worden verwijderd via het bloed of worden afgebroken, hoopt lactaat zich op in de spieren. Dit valt samen met een pH-daling in de spier, hoewel de melkzuurvorming niet de echte oorzaak is van de pH-daling. De pH in gezonde spieren van zoogdieren varieert tussen 7,1 tot 7,3 en zal normaal op een niet-lineaire manier dalen tot een ultieme pH van ongeveer 5,5 tot 5,6 in postmortale spieren (Pearson & Young, 1989). Dit proces heet de verzuring van het spierweefsel. Het bereiken van de ultieme pH valt samen met de beëindiging van de glycolyse en ATP-hydrolyse. Dit wordt verklaard door een gebrek aan beschikbaar substraat (glycogeen) of het inactiveren van één of meerdere glycolytische enzymen vanwege de zure omstandigheden in de spiercellen. Het glycolyseproces bij runderen kan ongeveer 24 tot 48 uur duren, afhankelijk van het koelingsproces, tot deze volledig is beëindigd en de ultieme pH wordt bereikt (Pearson & Young, 1989).

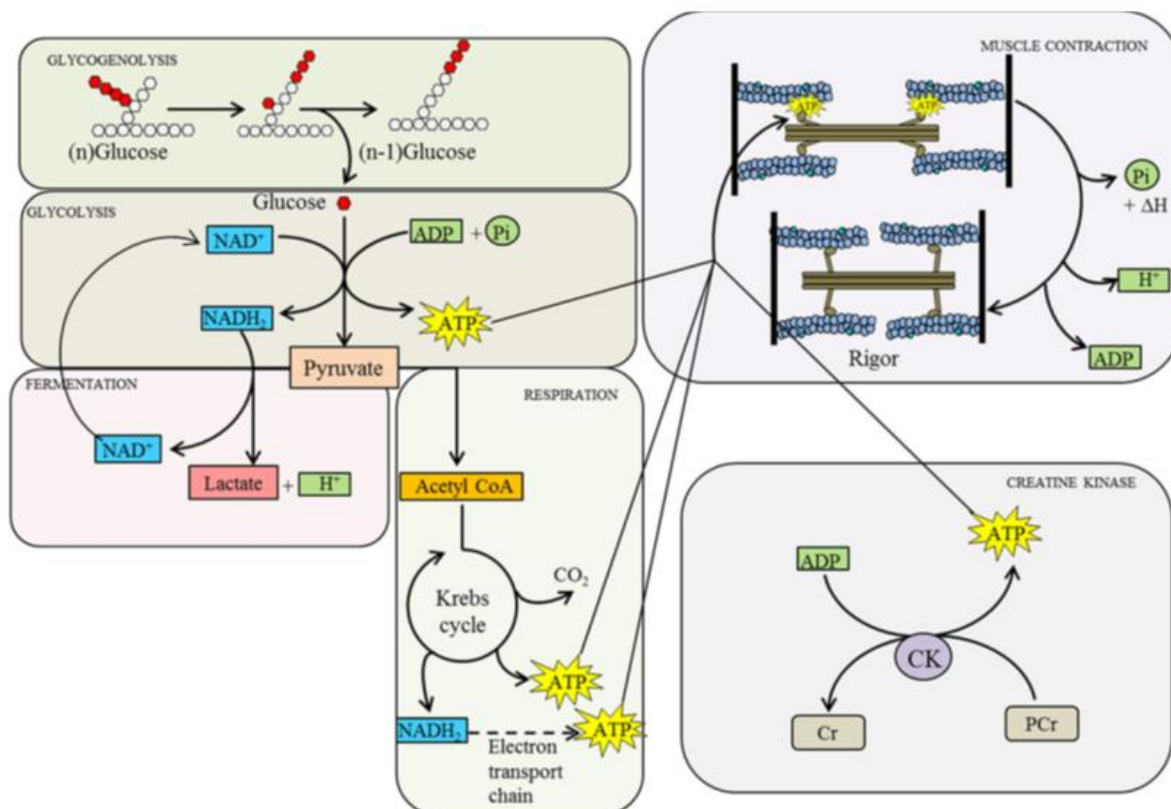
De actine- en myosinefilamenten kunnen alleen gescheiden worden wanneer een ATP-molecule wordt gebonden aan myosine. Wanneer de voorraden ATP uiteindelijk uitgeput raken, worden de overlappende actine- en myosinefilamenten onomkeerbaar gebonden. Dit wordt geassocieerd met de verkorting van de sarcomeren en een verstijving van de spieren. Dit fenomeen heet *rigor mortis* (De Smet & Vossen, 2017).

De glycolytische enzymkinetiek en het verloop van de glycolyse wordt beïnvloed door allerlei factoren. Deze factoren kunnen diergebonden zijn alsook bepaalde maatregelen voor, tijdens of na het slachten. Het verloop van de glycolyse heeft namelijk een grote invloed op een aantal aspecten van de uiteindelijke vlees kwaliteit zoals malsheid, het waterhoudend vermogen en kleur.

2.4.2 Het postmortale metabolisme

Post mortem wordt de zuurstoftoevoer via het bloed naar de spieren stopgezet en gebeurt de productie van ATP a.d.h.v. anaeroob metabolisme. Dit gebeurt via het fosfagene systeem en anaerobe glycolyse. Aangezien glucose niet meer wordt aangevoerd via het bloedplasma in het spierweefsel worden de intramusculaire glycogeenvoorraden gebruikt om de glycolyse te voeden. Glycogeen wordt eerst afgebroken tijdens glucogenolyse om vervolgens gebruikt te worden in de glycolyse voor de productie van pyruvaat. Door de anaerobe omstandigheden wordt pyruvaat verder omgezet tot lactaat. Echter een zeer klein deel van de totale hoeveelheid ATP zou mogelijks kort na het slachten door mitochondriale respiratie geproduceerd kunnen worden, aangezien myoglobine functioneert als een soort zuurstofbuffer waardoor een bepaalde hoeveelheid zuurstof kan worden voorzien in spieren kort na het slachten (Pösö & Puolanne, 2005).

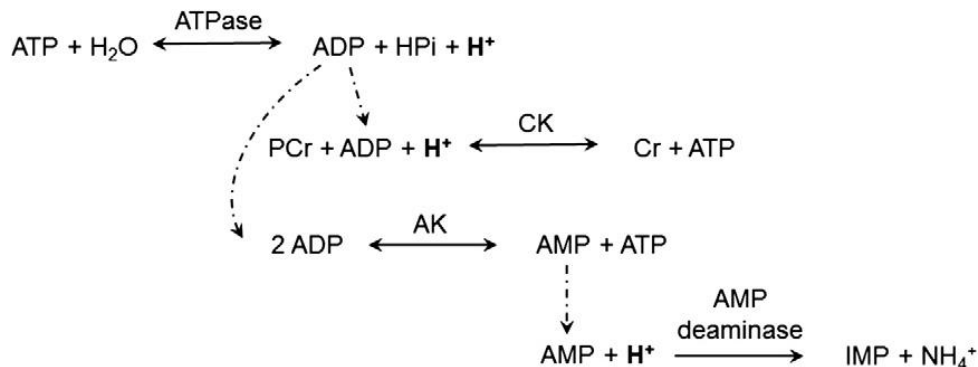
Een vereenvoudigd schematisch overzicht van de belangrijkste routes voor postmortale ATP-productie wordt gepresenteerd in Figuur 2.11.



Figuur 2.11: Een vereenvoudigde weergave van het energiemetabolisme van postmortale spieren (Kuffi et al., 2018)

2.4.2.1 Het fosfagene systeem

Er zijn drie reacties die het fosfagene systeem omvatten en deze worden samen met de hydrolyse van ATP weergegeven in onderstaande Figuur 2.12. Dit is de snelste manier om de ATP-gehalten in spieren te behouden of te herstellen, maar is van zeer korte duur.



Figuur 2.12: De hydrolyse van ATP door ATPase, het fosfagene energiesysteem voor de productie van ATP m.b.v. creatinekinase (CK) en adenylaatkinase (AK), en de AMP-deaminase reactie (Scheffler et al., 2011)

De eerste stap is de creatinekinase reactie. Hierbij wordt creatinefosfaat (PCr) omgezet tot creatine (Cr) met behulp van het enzym creatinekinase (CK). Tijdens deze omzetting wordt een fosfaatgroep overgezet naar ADP met de vorming van ATP als gevolg. Het is belangrijk om te weten dat deze reactie waterstofionen of protonen verbruikt. In postmortaal spierweefsel zijn de PCr-reserves zeer snel uitgeput met een stijging van de ADP-concentraties tot gevolg. In rusttoestand varieert de PCr-concentratie van 18 tot 23 μmol per gram spierweefsel (Bendall, 1973; Ferguson & Gerrard, 2014). Er zijn aanwijzingen dat het verdwijnen van PCr kort na het slachten relevant kan zijn bij de ontwikkeling van een afwijkende vleeskwaleiteit. Dit werd al reeds vastgesteld in varkensspieren (Scheffler et al., 2011), maar nog niet bij runderen.

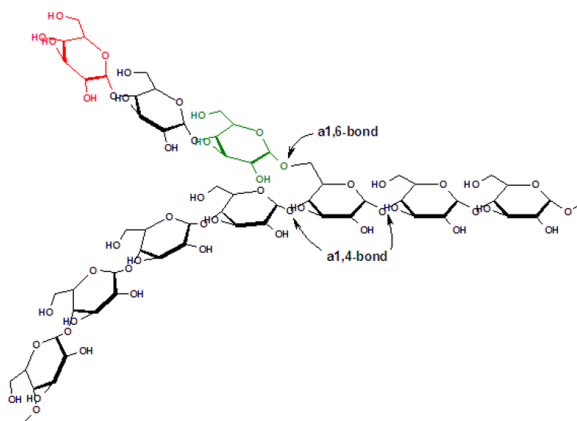
De tweede reactie of de adenylaatkinase reactie in het fosfagene systeem zorgt voor de productie van AMP. Door een stijging in het gehalte ADP zal het enzym adenylaatkinase (AK) twee ADP-moleculen omzetten tot ATP en AMP. Het genereren van AMP is bijzonder belangrijk, omdat AMP kan gezien worden als een belangrijke regulator van het energiemetabolisme in spiercellen. AMP werkt namelijk in op bepaalde fosforylase-enzymen zoals glycogeenfosforylase en fosfofructokinase (Winder & Thomson, 2007).

De laatste reactie van het fosfagene systeem, de AMP-deaminase reactie, produceert geen ATP, maar is sterk gekoppeld aan de vorige reactie. Toch is deze stap belangrijk omdat het omzetten van AMP naar IMP noodzakelijk is om de stijgende AMP-concentratie in de cel terug te doen dalen. Het laag houden van de AMP- en ADP-concentratie in spieren, ondanks kleine verminderingen in ATP, zorgt voor het in stand houden van de ATP-hydrolyse om voldoende energie te blijven leveren tijdens de spiercontractie (Ferguson & Gerrard, 2014).

Zodra 70 procent van de PCr-voorraad is afgebroken, nemen de ATP-niveaus snel af (Bate-Smith & Bendall, 1949; Wicks et al., 2019). Enkel via anaerobe glycolyse vanuit spierglycogeen kan ATP nog postmortaal geregenereerd worden.

2.4.2.2 Glycogenolyse

Glucose wordt in spieren van zoogdieren opgeslagen onder de vorm van glycogeen. Glycogeen is een meervoudig vertakte polymeer van glucosemoleculen en wordt opgeslagen in de lever en skeletspieren. Tijdens de glycogenese of de synthese van glycogeen in de lever worden glucosemoleculen aan elkaar gekoppeld a.d.h.v. α -1,4-verbindingen. Echter tijdens de synthese wordt soms gebruik gemaakt van α -1,6-verbindingen wat de vertakte structuur van glycogeen veroorzaakt (Figuur 2.13). De sterk vertakte structuur laat toe om snel glucose vrij te stellen uit de glycogeenopslag. De gemiddelde concentratie van glycogeen in gezonde spieren van runderen bedraagt 75 tot 120 μmol per gram spierweefsel (Monin, 1981; Ferguson et al., 2007; Ferguson & Gerrard, 2014). Glycogeengehalten variëren tussen spieren, afhankelijk van hun overwegend spiervezeltype wat een weerspiegeling is van hun primerend metabolisch energiesysteem. Uit studies is gebleken dat de glycogeenconcentratie toenam in spieren van runderen met een hoger percentage aan type 2-spiervezels (Monin, 1981; Lacourt & Tarrant, 1985).



Figuur 2.13: Structuur van een glycogeenmolecule (De Smet & Vossen, 2017)

Glycogeen speelt een essentiële rol in de omzetting van spieren tot vlees na het slachten van dieren (Roach et al., 2012). Aangezien glucose niet via het bloed kan aangevoerd worden om te gebruiken als substraat voor de glycolyse, zal beroep worden gedaan op de voorraden spierglycogeen. Glycogenolyse of de afbraak van glycogeen zorgt voor de opeenvolgende vrijmaking van glucose-1-fosfaatresiduen uit glycogeen door het enzym glycogeenfosforylase (GP) (Lehninger et al., 1993). Glycogeenfosforylase splitst zijn substraat door het toevoegen van een anorganische fosfaatgroep op de α -1,4-koppelingen van de buitenketens van glycogeenmoleculen, hetgeen glucose-1-fosfaat oplevert. Vervolgens katalyseert fosfoglucomutase de isomerisatie van glucose-1-fosfaat tot glucose-6-fosfaat. Zodra glycogeenfosforylase het vierde glucosemonomeer vanaf het vertakkingspunt op een glycogeenmolecule heeft bereikt, breekt een *debranching*-enzym (α -1,6-glucosidase) de α -1,6-koppelingen waardoor een vrije molecule glucose vrijkomt. De hoofdketen en de resterende buitentakken zijn opnieuw vatbaar voor de verdere afbraak door glycogeenfosforylase. Dit volledige proces vereist geen input van ATP.

Het enzym glycogeenfosforylase heeft twee verschillende vormen, een actieve vorm (GP_a) en een minder actieve vorm (GP_b). Deze worden gereguleerd door substraat- en allosterische controlemechanismen. Om deze reden heeft dit enzym een invloed op de snelheid van de

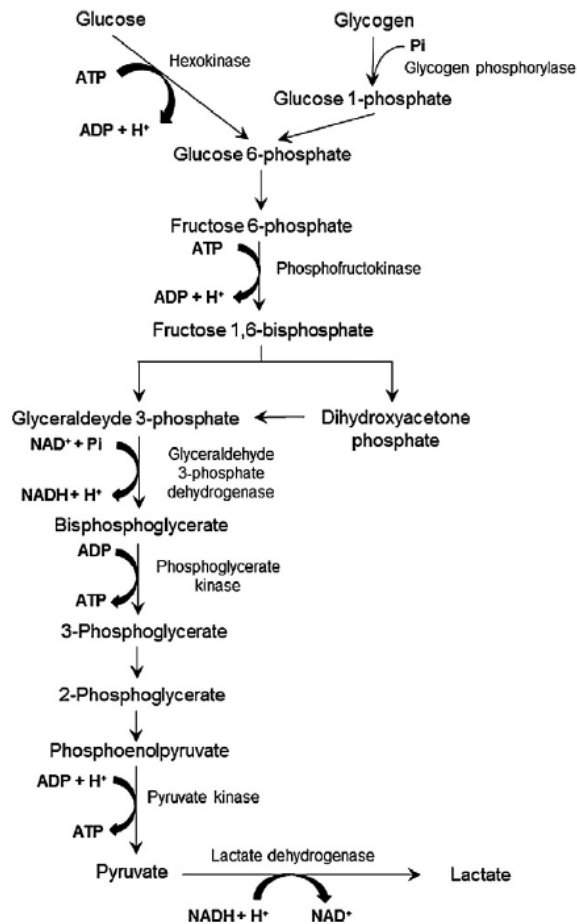
glycogenolyse (Stanley & Connett, 1991). Hoewel GPb minder actief is, zal het nog steeds in staat zijn tot activering door een verhoging van het AMP-gehalte en/of het calciumgehalte in de spiercel. De omzetting van GPb naar GPa wordt gereguleerd door fosforylasekinase, dat op zijn beurt wordt beïnvloed door factoren zoals het calciumgehalte en de pH in spieren (Meinke & Edstrom, 1991). Glycogeenfosforylase wordt ook allosterisch gereguleerd waarbij AMP en IMP krachtige activators zijn, terwijl ADP, ATP en glucose-6-fosfaat de activiteit van glycogeenfosforylase remmen (Connet & Sahlin, 1996).

Experimentele resultaten laten zien dat er steeds een bepaalde hoeveelheid glycogeen achterblijft in spieren. Deze hoeveelheid bedraagt ten minste 10 tot 20 μmol glycogeen per gram spier, maar kan veel hoger zijn, tot 80 $\mu\text{mol/g}$, afhankelijk van de starthoeveelheid glycogeen in de spier. Zelfs in postmortaal spierweefsel wanneer de ultieme pH wordt bereikt, kan een resterende hoeveelheid glycogeen terug gevonden worden (Immonen & Puolanne, 2000). Omdat de postmortale glycogenolyse kan stoppen ondanks de aanwezigheid van residueel glycogeen, wordt gespeculeerd dat het glycogeen-debranching-enzym de snelheid en mate van de glycogenolyse en glycolyse kan beïnvloeden. Kylä-Puhju et al. (2005) rapporteerden dat de activiteit van het debranching-enzym in varkensvlees slechts zwak werd beïnvloed door de pH, maar de activiteit nam sterk af wanneer de temperatuur daalde van 39 en 42 °C naar 4 en 15 °C. Daarom kan de activiteit van het debranching-enzym de postmortale glycolyse sterk beïnvloeden en daalt de pH sneller wanneer karkassen trager afkoelen. Een snelle koeling van het spierweefsel kan de activiteit van dit enzym beperken en dus ook de glycogenolyse alsook de glycolyse remmen.

2.4.2.3 Anaerobe glycolyse

Glycolyse onder postmortale omstandigheden start vanuit glucose-6-fosfaat, het eindproduct van de glycogenolyse, en omvat een reeks van 9 biochemische reacties om vanuit één molecule glucose-6-fosfaat uiteindelijk twee moleculen pyruvaat te vormen. Net zoals bij de glucogenolyse wordt het glycolyseproces gestimuleerd door een toename van AMP, intramusculair vrij calcium en anorganische fosfaten in de spiercel. De vrije moleculen glucose als gevolg van glycogenolyse worden waarschijnlijk postmortaal niet gefosforyleerd, omdat glucose-6-fosfaat een krachtige remmer van hexokinase blijkt te zijn (Ferguson & Gerrard, 2014). Daarom wordt de hexokinase reactie waarbij glucose wordt omgezet tot glucose-6-fosfaat als eerste originele stap van de glycolyse onder postmortale omstandigheden overgeslagen. Onderstaande Figuur 2.14 geeft een overzicht van de volledige glycolytische pathway vanuit glucose of glycogeen tot de vorming van lactaat.

De belangrijkste functie van postmortale glycolyse is de fosforylering van ADP tot ATP. Vaak wordt de glycolyse gescheiden in twee fasen. De eerste fase of de voorbereidende fase omvat alle reacties om uiteindelijk het tussenproduct glyceraldehyde-3-fosfaat te vormen. Deze fase verbruikt ATP-moleculen, waarbij ATP het terminale fosfaat levert tijdens de fosforyleringsreacties m.b.v. de enzymen hexokinase en fosfofructokinase. In de tweede fase wordt glyceraldehyde-3-fosfaat verder omgezet tot pyruvaat. De uiteindelijke ATP-productie gebeurt tijdens de fosfoglyceraatkinase en pyruvaatkinase reacties. Het overslaan van de hexokinase reactie in de eerste fase blijkt energetisch gunstig te zijn aangezien deze stap ATP-moleculen verbruikt. De totale netto ATP-productie bedraagt ongeveer 3 ATP-moleculen per molecule glucose-6-fosfaat.



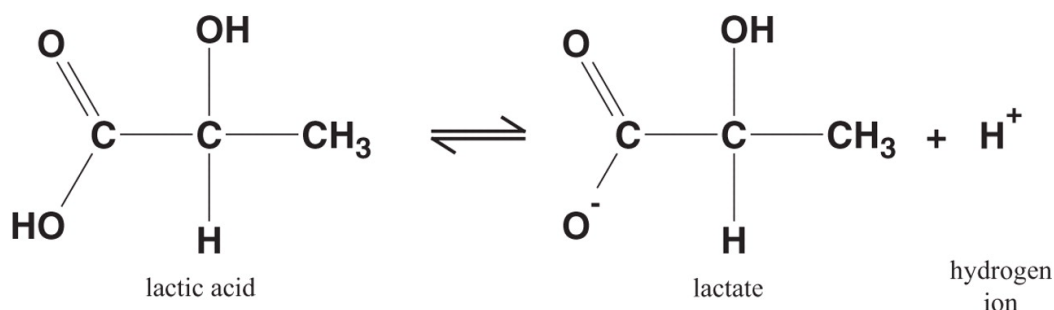
Figuur 2.14: De glycolytische pathway vanuit glucose of glycogeen tot de vorming van lactaat (Scheffler et al., 2011)

De glycolyse wordt sterk beïnvloedt door de ATPase-activiteit in postmortaal spierweefsel. Direct of indirect worden de activiteiten van bepaalde glycolytische enzymen gereguleerd door de verhoudingen tussen ATP en ADP in het cytoplasma van de spiercel. Wanneer ATP overvloedig aanwezig is, zal de glycolyse geremd worden. Wanneer de concentratie van ADP in postmortale spieren toeneemt, neemt de glycolytische flux toe (Kastenschmidt et al., 1968).

Het verloop van de glycolyse kan toegeschreven worden aan meerdere factoren zoals de betrokken enzymen. Het eerste snelheidsbeperkend enzym van de glycolyse is fosfofructokinase (PFK), dat fructose-6-fosfaat omzet tot fructose-1,6-bisfosfaat. Hoge gehalten aan AMP, fructose-6-fosfaat, ADP en vrije fosfaten stimuleren de werking van PFK. Omgekeerd wordt de werking van PFK geremd door de aanwezigheid van hoge gehalten aan ATP en citraat. Dit enzym is echter niet verantwoordelijk voor het beëindigen van de glycolyse wanneer de omstandigheden in het spierweefsel te zuur worden. Uit proeven met spieren van varkens bleek PFK nog steeds activiteit te vertonen bij een pH van 5,35 (Schwägele & Honikel, 1988). Een ander belangrijk enzym voor het verloop van de glycolyse, pyruvaatkinase (PK), katalyseert de omzetting van fosfoenolpyruvaat tot pyruvaat op het einde van de glycolyse. Er bestaan minstens drie verschillende isovormen van dit enzym en deze worden negatief gereguleerd door ATP alsook door acetyl-CoA en vetzuren, beide substraten van de citroenzuurcyclus (Ferguson & Gerrard, 2014).

Een enzym dat geen deel uitmaakt van het glycolyseproces, maar wel mogelijk een belangrijke invloed heeft op het verloop van de postmortale glycolyse is het enzym AMP-kinase (AMPK). In levend weefsel werd namelijk aangetoond dat AMPK een belangrijke invloed heeft op de glycogenolyse en glycolyse in skeletspieren (Lehninger et al., 1993). Als gevolg van de hoge ATP-omzet en de adenylaatkinase reactie zal het gehalte aan cellulair AMP stijgen. Door de verhoogde verhouding tussen AMP en ATP wordt AMPK geactiveerd. Het geactiveerde AMPK reguleert het glycolyseproces door fosforylering van bepaalde enzymen zoals fosforylasekinase. Dit enzym zorgt op zijn beurt voor de activering van glycogeenfosforylase (GP) waardoor de glucogenolyse wordt gestimuleerd. Een ander belangrijk mechanisme waardoor AMPK de glycolyse verhoogt, is via de fosforylering van het enzym fosfofructokinase-2 (PFK-2). PFK-2 katalyseert namelijk de productie van fructose-2,6-bifosfaat, wat een krachtige allosterische activator is van fosfofructokinase (PFK). Zoals eerder vermeld is PFK het belangrijkste snelheidsbeperkende enzym van de glycolyse. Bij varkens werd een verband gevonden tussen een verhoogde AMPK-activering en de uiteindelijke vorming van varkensvlees met PSE-eigenschappen (Shen et al., 2006).

De verdere omzetting van pyruvaat tot lactaat wordt vaak beschouwd als onderdeel van de glycolyse onder anaerobe omstandigheden. Lactaat kan dus gezien worden als het ultieme eindproduct van het postmortale metabolisme. Tijdens de lactaatdehydrogenase reactie worden twee elektronen, een proton uit NADH en een extra proton uit het cytosol gebruikt om pyruvaat te reduceren tot lactaat. Het is belangrijk om te begrijpen dat de vorming van lactaat in spierweefsel twee doelen heeft. De eerste reden is de regeneratie van NAD^+ , een co-enzym dat vereist is voor de glyceraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase reactie (Lehninger et al., 1993). Indien NADH niet terug wordt omgezet tot NAD^+ , zal de glycolyse voortijdig worden stopgezet of verloopt het met een verlaagde snelheid. Ten tweede worden tijdens de reductie van pyruvaat tot lactaat protonen uit het cytosol verwijderd. Deze reactie heeft dus een bufferende werking. De vorming van lactaat zorgt dus voor een verlenging van de glycolyse door de regeneratie van NAD^+ en door de accumulatie van protonen te vertragen (Robergs et al., 2004). De pKa of de negatieve log van de dissociatieconstante van melkzuur bedraagt 3,8. Daarom wordt melkzuur voornamelijk gedissocieerd in postmortaal spierweefsel en bestaat deze onder de vorm van lactaat, de zuurrest van melkzuur (Figuur 2.15). De lactaataccumulatie wordt gebruikt als een goede indicator voor het verloop en de snelheid van de anaerobe glycolyse (Ferguson & Gerrard, 2014).



Figuur 2.15: Melkzuur en zijn gedissocieerde vorm lactaat (Phypers & Pierce, 2006)

2.4.2.4 Mitochondriale ademhaling

Bepaalde studies van Pösö & Puolanne (2005) suggereren dat ondanks het stoppen van de bloedsomloop na slachten een tijdelijk oxidatief metabolisme kan worden waargenomen in spieren. Deze zou verantwoordelijk zijn voor een kleine fractie (1-5%) van de totale postmortale ATP-productie. Dit wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van zuurstof gebonden aan myoglobine. Hochachka (2003) toonde aan dat myoglobine in staat is om de zuurstofniveaus in spierweefsel te bufferen tijdens grote inspanningen. Myoglobine kan tot 90 procent verzadigd zijn met zuurstof en geeft deze terug vrij bij een toename van fysieke stress. In rundvlees is het myoglobinegehalte sterk afhankelijk van o.a. spiertype en leeftijd. De variatie van de oxidatieve status van de spieren bij het overlijden en de hoeveelheid resterend bloed kan mogelijk een invloed hebben op het begin en de snelheid van de glycolyse (Pösö & Puolanne, 2005). Extra onderzoek op dit gebied is nodig om de volledige impact van de mitochondriën en de stopzetting van het oxidatieve metabolisme op het postmortale metabolisme en de uiteindelijke impact op de vleeskwiteit beter te kunnen begrijpen.

2.4.3 Verzuring van spierweefsel

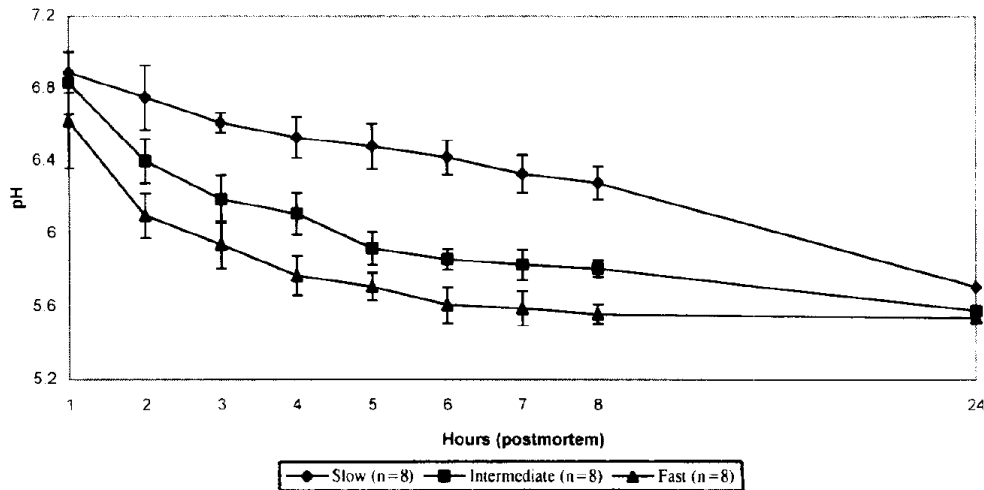
Het verzuringsproces in spieren wordt veroorzaakt door de accumulatie van waterstofionen/protonen (H^+) in het sarcoplasma. Dit gebeurt wanneer de productie van protonen de capaciteit om protonen te bufferen en/of af te voeren heeft overschreden. De belangrijkste bron van protonenproductie *post mortem* is de ATP-hydrolyse in combinatie met glycolyse. Telkens wanneer ATP wordt opgesplitst in ADP en P_i tijdens ATP-hydrolyse om energie te produceren, wordt een proton vrijgegeven. Daarnaast worden tijdens het postmortale glycolyseproces naast ATP-moleculen ook protonen afgegeven. Voor de productie van 2 moleculen pyruvaat vanuit één molecule glucose-6-fosfaat wordt gemiddeld één proton vrijgegeven. Het gebruik van spierglycogeen als bron van glucose-6-fosfaat, in tegenstelling tot bloedglucose, verzuurt het spierweefsel minder snel door het wegvallen van de hexokinase reactie. Traditioneel werd het verzuren verklaard door een verhoogde productie van melkzuur. Daarna wordt dit melkzuur, een zwak zuur met pK_a van 3,86, gedissocieerd met als gevolg de vorming van het zure zout lactaat en de afgifte van een proton. Deze theorie werd lactaatacidose genoemd. Deze overtuiging heeft dus geleid tot de interpretatie dat lactaatproductie verzuring veroorzaakt (Robergs et al., 2004). Echter blijkt geen biochemische ondersteuning te zijn voor deze theorie. Het eindproduct lactaat alsook de tussenproducten van de glycolyse worden gevormd als zure zouten waardoor ze niet kunnen functioneren als bron van protonen. Integendeel de productie van lactaat blijkt de verzuring van het spierweefsel te vertragen waardoor de glycolyse langer kan doorgaan.

Het accumulerend lactaat wordt in gezond spierweefsel uit de cellen verwijderd door de monocarboxylaat transporter om zo via het bloed verder gemetaboliseerd te worden in andere weefsels. Naast lactaat worden ook protonen door symport uit de cellen verwijderd (Juel et al., 2004). Daarnaast worden vrije protonen voornamelijk gebruikt door de mitochondria voor oxidatieve fosforylering en om de protonengradiënt in de intermembraneuze ruimte te behouden. *Post mortem* vallen deze systemen weg. In plaats daarvan hopen lactaat en protonen zich op in de spiercellen. Toch beschikken spieren over een bepaalde buffercapaciteit om het verzuringsproces te vertragen. De buffercapaciteit is groter in spieren die nodig zijn voor snelle inspanningen van korte duur en lager in spieren die gevoelig zijn voor langdurige activiteiten bij relatief lage intensiteit. Daarom is de buffercapaciteit in het algemeen groter in glycolytische spieren met spiervezels met een grote diameter en schaarse doorbloeding. Oxidatieve spieren met een kleinere vezeldiameter en hoge doorbloeding beschikken over een lagere buffercapaciteit (Pösö & Puolanne, 2005).

Het intracellulair buffervermogen kan ingedeeld worden in twee categorieën namelijk het metabolisch en het structureel buffervermogen. Het metabolisch buffervermogen omvat biochemische reacties waarbij protonen worden gebruikt als substraat en zo onrechtstreeks de accumulatie van protonen voorkomen. De twee belangrijkste reacties zijn de creatinekinase reactie en de lactaatdehydrogenase reactie. De creatinekinase reactie van het fosfagene systeem alkaliseert de spiercel, omdat tijdens deze reactie een proton wordt geconsumeerd. Het proton is vereist om de fosfaatgroep van PCr te vervangen, waardoor de tweede functionele groep, een amine, van creatine wordt voltooid. Tijdens de lactaatdehydrogenase reactie worden ook protonen uit het cytosol verwijderd. Wanneer de omzetting van pyruvaat tot lactaat wordt gekoppeld aan de glycolyse, zorgt dit voor de afname van gemiddeld één proton per molecule gemetaboliseerd glucose-6-fosfaat.

Het structureel buffervermogen wordt uitgeoefend door bepaalde oplosbare componenten zoals Pi, aminozuren en eiwitten. Deze verbindingen hebben de mogelijkheid om te binden met vrije intracellulaire protonen. De accumulatie van intramusculair Pi of vrije fosfaatgroepen wordt veroorzaakt door de snelle hydrolyse van ATP. Afhankelijk van de zuurtegraad kan een fosfaatgroep een proton opnemen. Echter de toename van intracellulair Pi is niet evenredig met het geaccumuleerde totaal via ATP-hydrolyse. Pi wordt namelijk opnieuw gebruikt als substraat voor bepaalde reacties in de glycolyse en glucogenolyse, waardoor hun potentieel bufferend vermogen niet wordt benut (Robergs et al., 2004). Carnosine en anserine zijn dipeptiden en bevatten elk het aminozuur histidine. Deze eiwitten worden aangetroffen in verschillende weefsels en diersoorten. Naast hun werking als antioxidant, beschikken ze over bufferende eigenschappen. Glycolytische spieren bevatten gemiddeld hogere gehalten aan deze eiwitten t.o.v. oxidatieve spieren (Purchas et al., 2004). Bij humane spieren werd vastgesteld dat vrouwen over gemiddeld lagere carnosinegehalten beschikken dan mannen (Everaert et al., 2011). In spieren van runderen worden hogere gehalten aan carnosine aangetroffen t.o.v. anserine (Boldyrev et al., 2013). Bij varkens werd een hoger carnosinegehalte in het spierweefsel gelinkt aan een hogere pH-waarde 24 uur na slachten, alsook betere kleurwaarden en waterhoudend vermogen. Uit dit onderzoek kan afgeleid worden dat vlees met hogere gehalten aan carnosine en anserine waarschijnlijk leiden tot betere vleeskwiteitseigenschappen (D'Astous-Pagé et al., 2017).

De accumulatie van protonen zorgt voor een daling van de zuurtegraad of pH in het spierweefsel. De pH in gezond spierweefsel van runderen varieert tussen 7,1 tot 7,3. De postmortale verzuring zal blijven doorgaan tot een ultieme pH wordt bereikt. Het verloop van de pH-daling gebeurt normaal op een niet-lineaire manier en eindigt met een ultieme pH van ongeveer 5,5 tot 5,6 (Pearson & Young, 1989). Bendall (1973) beweert dat de postmortale pH-daling tweefasig is. Deze wordt gekenmerkt door een eerste fase van minimale verandering in zuurtegraad (en ATP-gehalte), een vertragingfase, gevolgd door een snelle daling in pH. Tijdens de vertragingfase worden de spiercellen voor een korte periode gebufferd door de productie van ATP via de creatinekinase reactie van het fosfagene systeem. Echter kan de concentratie van PCr net voor het slachten afwijken van de rustconcentratie waardoor geen vertragingfase plaatsvindt (Ferguson & Gerrard, 2014). De afwezigheid van een vertragingfase bij conventioneel geslachte runderen is waarschijnlijk te wijten aan de combinatie van stress net voor het slachten en *post-stun* spiercontracties. Op deze manier wordt de PCr-voorraad snel uitgeput en volgt sneller de activatie van het glycolyseproces. Het verloop van de pH-daling is sterk verbonden met de snelheid van de glycolyse. De glycolytische snelheid in postmortale spieren wordt namelijk afgeleid uit metingen van de pH in functie van de tijd na slachten. De verzuring van spieren veroorzaakt veranderingen in de ionenbalans die leidt tot een verzwakking van de snelheid van glycolyse, omdat protonen de activiteiten van o.a. glycogeenfosforylase en fosfofructokinase remmen (Pösö & Puolanne, 2005). De snelheid van de postmortale glycolyse varieert sterk tussen dieren en zelfs tussen verschillende spieren afkomstig van eenzelfde karkas. Figuur 2.16 geeft het pH-verloop weer in de lange rugspier van runderen gedurende 24 uur na het slachten in een studie van O'Halloran et al. (1997). Hierbij werden de dieren in drie groepen ingedeeld. De bovenste curve behoort tot runderen waarbij de postmortale glycolyse in de lange rugspier aan een trager tempo verloopt waardoor de pH-daling trager verloopt t.o.v. de andere groepen. De snellere pH-daling waargenomen op de onderste curve verwijst naar runderen waar de glycolyse op een sneller tempo verloopt. De derde groep omvat een intermediaire groep waarbij de snelheid van de pH-daling zich tussen voorgaande groepen bevindt.



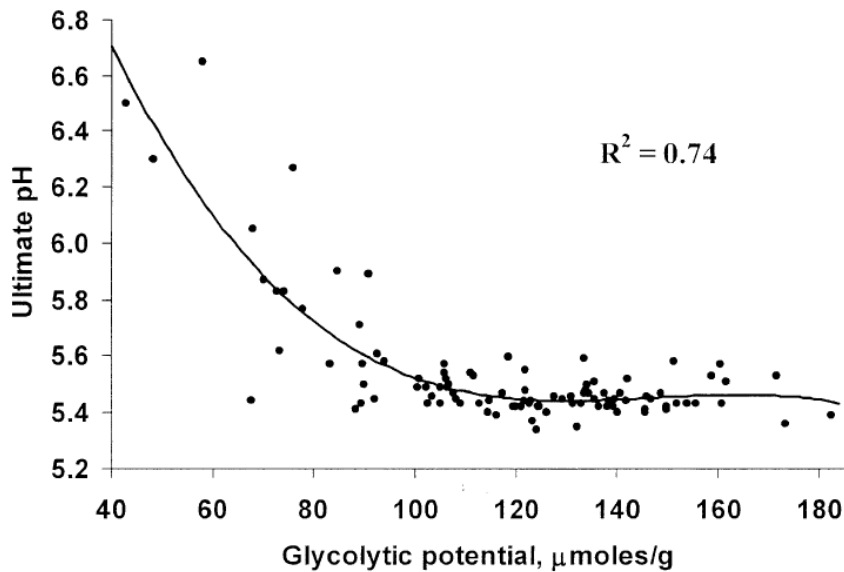
Figuur 2.16: Het verloop van de pH-daling in verschillende soorten lange rugspieren van runderen gedurende 24 uur na het slachten (O'Halloran et al., 1997)

Zoals eerder vermeld valt het bereiken van de ultieme pH samen met de beëindiging van de postmortale glycolyse. Dit wordt toegeschreven aan het inactiveren van één of meerdere glycolytische enzymen vanwege de te zure omstandigheden in het spierweefsel of door een gebrek aan voldoende glycogeen om de glycolyse te voeden. Bij gezonde runderen die nauwelijks stress ervaren voor het slachten, mag de glycogeenconcentratie geen beperkende factor zijn, omdat deze concentratie in het algemeen hoger is dan die nodig is om de normale ultieme pH (5,5–5,6) te bereiken. Uit onderzoeken naar de relatie tussen glycogeenconcentraties en de ultieme pH blijkt dat de uiteindelijke pH alleen wordt beïnvloed als het glycogeen niveau voor slachten zich onder een kritische drempel van 45-55 μmol glycogeen per gram spierweefsel bevindt (Immonen & Puolanne, 2000).

Een interessante indicator die naast de glycogeenconcentratie wordt gebruikt om een inzicht te krijgen in het pH-verloop is het glycolytisch potentieel. Deze beschrijft de theoretische lactaatproductie die plaatsvindt wanneer al het beschikbaar substraat werd omgezet door postmortale glycolyse. Het glycolytisch potentieel wordt meestal uitgedrukt als μmol lactaat per gram spierweefsel. Deze werd beschreven door Monin en Sellier (1985) a.d.h.v. volgende formule:

$$\text{Glycolytisch potentieel } [\mu\text{mol/g}] = \text{Lactaat} + 2 \times (\text{Glycogeen} + \text{Glucose} + \text{Glucose-6-fosfaat})$$

Een kromlijng verband werd gevonden tussen het glycolytisch potentieel en de ultieme pH in de lange rugspier van runderen (Wulf et al., 2002). Deze wordt grafisch weergegeven in Figuur 2.17. Hierbij werd een drempel van 100 μmol lactaat per gram spierweefsel vastgesteld. Indien het glycolytisch potentieel zich boven deze drempel bevindt, heeft deze weinig effect op de ultieme pH. Onder deze drempel heeft het glycolytisch potentieel een duidelijke invloed op de ultieme pH. Hoe lager het glycolytisch potentieel, hoe hoger de ultieme pH. Een hogere ultieme pH in vlees kan aanleiding geven tot DFD-eigenschappen. Daarom kan een laag glycolytisch potentieel geassocieerd worden met verhoogde incidentie van DFD-vlees (Wulf et al., 2002).

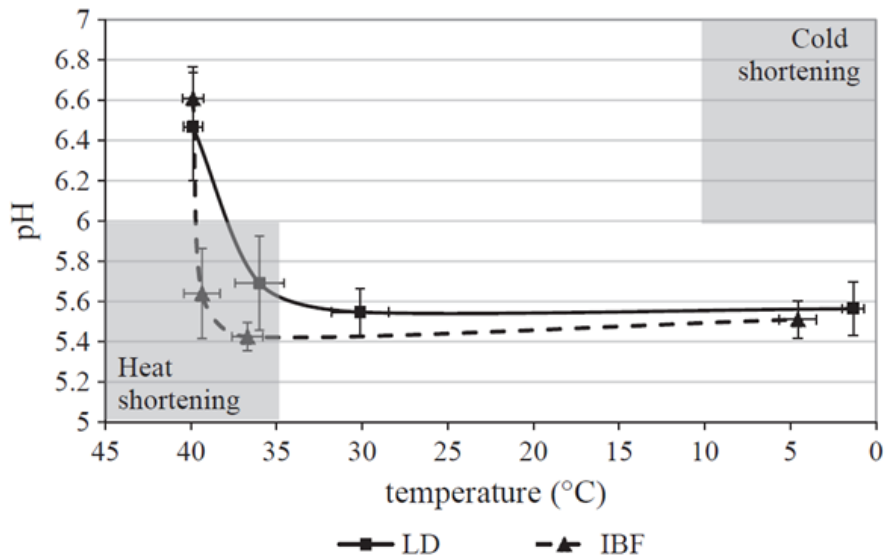


Figuur 2.17: De relatie tussen glycolytisch potentieel en ultieme pH in de lange rugspier van runderen (n = 100 rundkarkassen) (Wulf et al., 2002)

De duur en snelheid van het glycolyseproces, zoals het geval is voor de meeste biochemische reacties, wordt sterk beïnvloed door de temperatuur. Het is belangrijk om te erkennen dat variaties in glycolytische snelheid kunnen worden waargenomen, zelfs bij constante temperaturen (Ferguson & Gerrard, 2014). In de context van malsheid van vlees en andere eigenschappen van vleeskwaliteit is de interactie tussen postmortale glycolyse en temperatuur in spieren van groot belang. *Post mortem* ondergaan spiervezels contracties en onder bepaalde omstandigheden kan dit leiden tot sarcomeer-/spierverkorting of *shortening*. Dit heeft een groot effect op de malsheid van het rundvlees, en indirect op andere kwaliteitseigenschappen zoals waterbindend vermogen (WBC), kleur en kleurstabiliteit (Pastsart et al., 2013). De postmortale evolutie van temperatuur en pH bepaalt de mate van sarcomeerverkorting (Honikel et al., 1983). Twee fenomenen worden waargenomen omtrent postmortale spierverkorting. Wanneer kort na slachten de pH van het spierweefsel zeer snel daalt, terwijl het karkas nauwelijks de tijd heeft om af te koelen, resulteert dit in *heat shortening*. De combinatie van een lage zuurtegraad en een hoge temperatuur wordt geassocieerd met een verhoogde denaturatie van eiwitten, inferieure vleeskwaliteit en PSE-eigenschappen. Dit vlees beschikt over een blekere kleur, slechtere kleurstabiliteit, zachtere structuur en een verlaagd waterbindend vermogen (Pastsart et al., 2013). *Heat shortening* werd reeds waargenomen in bepaalde spieren van de bil bij runderen van het Belgisch Witblauwras. Deze grote spieren worden getypeerd door een relatieve snelle postmortale pH-daling gecombineerd met een trage temperatuurdaling. Door de grote omvang van deze spieren verloopt het warmtetransport naar het oppervlak trager waardoor de kerntemperatuur van de spier relatief hoog blijft t.o.v. andere spieren (Kuffi et al., 2018). Het koelingsproces van de karkassen heeft een grote invloed om *heat shortening* te voorkomen. Een proces genaamd *hot boning* waarbij het karkas al wordt versneden in individuele stukken en de beenderen worden verwijderd, wordt toegepast om zo sneller vlees af te laten koelen. Deze toepassing wordt gebruikt om *heat shortening* te vermijden in grote spieren.

Een relatief trage pH-daling in combinatie met een snelle daling in temperatuur zorgt voor het tweede fenomeen van sarcomeerverkorting namelijk *cold shortening*. Dit komt vooral voor bij oppervlakkige spieren van karkassen die zeer snel gekoeld worden. Vooral spieren met een overwegend aandeel aan oxidatieve spiervezels ondervinden *cold shortening*. Een procedure die wordt toegepast om dit fenomeen te vermijden heet *electrical stimulation*. Hierbij wordt een elektrische stroom toegepast op het karkas kort na het slachten. Dit stimuleert het postmortale metabolisme met een snellere pH-daling als gevolg (De Smet & Vossen, 2017).

Thompson (2002) definieerde een pH-T-diagram waarin de combinaties van pH en temperatuur worden weergegeven die kunnen leiden tot *heat shortening* of *cold shortening*. Dit diagram werd geïmplementeerd in Figuur 2.18 door Pastsart et al. (2013) op metingen in twee spieren bij stieren van het Belgisch Witblauwras. Volgens het diagram van Thompson (2002) vindt *heat shortening* plaats wanneer de pH zich onder de 6 bevindt terwijl de temperatuur van de spier zich nog boven 35 °C bevindt. *Cold shortening* gebeurt als de temperatuur van het spierweefsel al onder 10-12 °C is gezakt terwijl de pH zich nog boven de 6 bevindt.



Figuur 2.18: Gemiddelde waarden (n=40) voor postmortale pH en temperatuur voor de *M. longissimus dorsi* (LD) en de binnenkant van de *M. biceps femoris* (IBF). De meetpunten vertegenwoordigen respectievelijk van links naar rechts metingen gebeurt 1, 3, 5 en 48 uur na slachten (Pastsart et al., 2013)

2.5 Vleeskwaliteit

De kwaliteit van vlees kan beoordeeld worden a.d.h.v. zijn *fitness for use*. Dit wordt gebaseerd op aspecten die belangrijk zijn voor de uiteindelijke consument of een producent van vleesproducten. De belangrijkste aspecten waar de postmortale glycolyse een bepaalde invloed op uitoefent en hier besproken worden, zijn malsheid, waterbindend vermogen en kleur. Deze primaire aspecten kunnen op een directe en objectieve manier bepaald worden. Daarna worden het belangrijkste defect van rundvlees op het vlak van vleeskwaliteit nogmaals besproken namelijk DFD-vlees. PSE-vlees of bleek (pale), zacht (soft) en waterig (exudative) vlees wordt nauwelijks vastgesteld bij rundvlees, maar eerder bij varkensvlees.

2.5.1 Malsheid

Het eerste kwaliteitsaspect malsheid of *tenderness* kan beschreven worden als de kracht die nodig is om een stuk (on)bereid vlees te snijden of kauwen. De belangrijkste factoren die bijdragen aan de uiteindelijke malsheid van een stuk vlees zijn het gehalte aan bindweefsel, de hoeveelheid intramusculair vet en de toestand van de spiervezels na *rigor mortis* (De Smet & Vossen, 2017). Het bindweefselgehalte, wat voornamelijk bestaat uit collageen, en het intramusculair vet worden zeer weinig beïnvloed door het postmortale metabolisme. De fenomenen *heat shortening* en *cold shortening* werden al reeds beschreven in sectie 2.4.3. Deze vormen van sarcomeerverkorting voordat de spieren *rigor mortis* zijn ingetreden, zorgen voor gemiddeld taaier vlees. Alsook heeft de ultieme pH een invloed op malsheid. Vaak wordt hogere taaierheid waargenomen bij vlees met een ultieme pH tussen 5,8 tot 6,2 (Ponnampalam et al., 2017). Toch kan de malsheid van een stuk vlees na het slachten verbeteren wanneer deze onderworpen worden aan een bepaald rijpingsproces. Tijdens deze vermalsingsfase of *aging* breken proteolytische enzymen structurele en andere spiereiwitten af wat resulteert in myofibrillaire breuken langs de Z-lijnen. Titine en tropomyosine zijn voorbeelden van afbreekbare structurele spiereiwitten (Listrat et al., 2016). Daarnaast wordt de structuur van het bindweefsel veranderd door de afbraak van de dwarsverbindingen tussen de collageenvezels. Nogmaals de hoeveelheid bindweefsel of collageen blijft ongewijzigd, maar de structuur van het bindweefsel verandert. Deze veranderingen leiden tot malser vlees. Een gekend voorbeeld van zo'n proteolytisch systeem is het calpaïne/calpastatine-complex. Calpaïne, het proteolytisch enzym, wordt geactiveerd door een stijging van het calciumionengehalte in het spierweefsel. Calpastatine functioneert als een inhibitor van calpaïne en wordt beïnvloed door de zuurtegraad. De heersende omstandigheden van pH en temperatuur na slachten beïnvloeden de snelheid van de activering of inactivering van calpaïne (Ferguson & Gerrard, 2014). Rundvlees wordt gebruikelijk voor een periode van 7 dagen of meer gerijpt afhankelijk van de bewaringsomstandigheden.

2.5.2 Waterbindingscapaciteit

Waterbindingscapaciteit of het waterbindend vermogen van vlees wordt beïnvloedt door de netto lading van spiereiwitten alsook door sterische effecten (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). De netto-lading van eiwitten is afhankelijk van de zuurtegraad. Wanneer de pH het iso-elektrisch punt van de spiereiwitten ($pI=5-5,3$) benadert, zal de netto elektrische lading dalen tot nul (De Smet & Vossen, 2017). Dit resulteert in een verlaagde afstotingskracht tussen de spiereiwitten waardoor de myofibrillen compacter worden. Hierdoor wordt minder water

weerhouden in de spieren met dripverlies tot gevolg. De meerderheid van het water in vlees wordt namelijk gebonden tussen de myosine- en actinefilamenten. Zuurder vlees verhoogt dus de kans op grotere hoeveelheden dripverlies. Sterische effecten ontstaan door capillaire krachten opgewekt door de schikking van de myosine- en actinefilamenten. Als *post mortem* de sarcomeren verkorten en de spieren worden samengetrokken tijdens *shortening*, wordt intracellulair water uit het vlees naar buiten geperst. Een slechte waterbindingscapaciteit is niet enkel ongewenst omwille van het vochtverlies en bijhorende taaiheid, maar ook omwille van het gewichtsverlies dat optreedt tijdens de bewaring, wat leidt tot economische verliezen.

2.5.3 Kleur

Vleeskleur is een zeer belangrijk criterium dat een invloed heeft op het koopgedrag van vleesconsumenten, omdat deze wordt gebruikt als een indicatie van de versheid en kwaliteit van het vlees (Ponnampalam et al., 2013). De kleur van een stuk vlees wordt bepaald door verschillende eigenschappen zoals het myoglobinegehalte, de chemische toestand van myoglobine en de reflectie-eigenschappen. Het gehalte aan myoglobine in spierweefsel is gerelateerd aan het overwegend spiervezeltype. Oxidatieve spieren bevatten gemiddeld hogere myoglobinegehalten t.o.v. glycolytische spieren wat resulteert in hun donkerrode kleur. Gemiddeld bedraagt de concentratie van myoglobine in spieren van runderen tussen 4 tot 20 mg per gram spierweefsel (De Smet & Vossen, 2017). De toestand van myoglobine is afhankelijk van het zuurstofgehalte van het spierweefsel. Drie verschillende vormen van myoglobine werden vastgesteld en iedere vorm resulteert in een andere vleeskleur. Myoglobinemoleculen hebben een grote affiniteit voor zuurstofmoleculen door zijn ijzerbevattende haemgroepen. Dit ijzer kan verschillende oxidatietoestanden aannemen afhankelijk van de zuurstofconcentratie, wat resulteert in de verschillende vormen van myoglobine. De typische heldere rode kleur van myoglobine wordt gelinkt aan zijn eerste vorm namelijk oxymyoglobine (OxyMb). Wanneer zuurstof overvloedig aanwezig is, zal een zuurstofmolecule binden op de zesde bindingsplaats van ijzer. Dit ijzer bevindt zich in zijn gereduceerde of ferro-vorm (Fe^{2+}). In een anaerobe omgeving wordt geen zuurstofmolecule gebonden aan de haemgroep van myoglobine. Het ijzer bevindt zich opnieuw in de ferro-vorm (Fe^{2+}). Deze tweede vorm van myoglobine wordt deoxymyoglobine (DeoxyMb) genoemd en geeft een paarsrode kleur. De derde vorm, metmyoglobine (MetMb), wordt gevormd wanneer de zuurstofconcentratie een zeer laag niveau bereikt in de spiercellen. In de plaats van zuurstof wordt een watermolecule gebonden aan het ijzer. Dit ijzer bevindt zich in een andere oxidatietoestand, de ferri-vorm (Fe^{3+}), waardoor het vlees een onaantrekkelijke bruine kleur krijgt. Afhankelijk van de bewaaromstandigheden van het vlees kan het myoglobine van vorm veranderen en dus een andere kleur aannemen. De vleeskleur wordt beïnvloed door verschillende factoren zoals leeftijd, geslacht, spiervezeltype, ultieme pH, bewaringsomstandigheden, vleesverpakking en gehalte antioxidanten in het vlees (De Smet & Vossen, 2017).

Kleur wordt objectief gemeten aan de hand van een kleurenschaal gebaseerd op het 1931 CIE-systeem. De a^* -waarde beschrijft de roodheid van een stuk vlees. Hoe hoger/lager deze waarde, hoe roder/groener de vleeskleur. De b^* -waarde beschrijft de geelheid. Opnieuw hoe hoger/lager de b^* -waarde, hoe geler/blauwer de kleur. Als laatste beschrijft de L^* -waarde of reflectiewaarde de donkerheid van een bepaald stuk vlees. Deze varieert tussen 0 (zwart) en 100 (wit). Vlees bevat gemiddeld L^* -waarden tussen 30 tot 65 en a^* -waarden tussen 2 tot 30 (De Smet & Vossen, 2017). De reflectie wordt deels bepaald door de aanwezigheid van

vloeistof aan het vleesoppervlak als gevolg van dripverlies, waardoor het vlees een blekere kleur vertoont. Dit vochtverlies wordt bepaald door de waterbindingscapaciteit.

2.5.4 DFD

Een belangrijk defect dat werd vastgesteld op het vlak van vlees kwaliteit bij rundvlees is het voorkomen van DFD-vlees. DFD is de Engelstalige afkorting van *dark, firm* en *dry* vlees, en betekent dus letterlijk donker, taai en droog vlees. DFD wordt geassocieerd met een donkere paarsrode kleur, ongewenste smaak, hoge taaiheid en een korte houdbaarheid. DFD-vlees wordt nog steeds vastgesteld en leidt tot significante economische globale verliezen (Ponnampalam et al., 2017). Karkassen met een kans op DFD-vlees worden gedetecteerd op basis van kleur of ultieme pH van één bepaalde spier zoals de lange rugspier. Meestal wordt vlees met een ultieme pH boven 5,9–6 gecategoriseerd als DFD (Ferguson et al., 2001). Een hoge ultieme pH verhoogt de kans op microbiële groei en heeft een negatieve invloed op de houdbaarheid (Egan & Shay, 1998). Op het vlak van kleur kan de donkere kleur verklaard worden door een verlaagde lichtreflectie aan het vleesoppervlak. Dit wordt op zijn beurt veroorzaakt door een hogere waterbindingscapaciteit waardoor minder vocht wordt afgegeven. DFD beschikt over hogere a^* -waarden door een groter aandeel aan deoxymyoglobine t.o.v. normaal vlees. Door het droger vleesoppervlak kan zuurstof moeilijker het vleesoppervlak penetreren. Dit zorgt voor de hogere gehalten aan deoxymyoglobine (De Smet & Vossen, 2017).

De oorzaak van DFD-vlees wordt verklaard door de uitputting van de glycogeenvorraden in de spieren *ante mortem*. Dit leidt tot een vroegtijdige stopzetting van de postmortale glycolyse met een hogere ultieme pH tot gevolg. Wulf et al. (2002) heeft een duidelijk verband gevonden tussen glycolytisch potentieel, ultieme pH en incidentie van DFD. Wanneer het glycolytisch potentieel zich onder de grens van 100 μmol per gram spierweefsel begeeft, verhoogt de kans op DFD-vlees. De behandeling van de dieren voorafgaand aan het slachten heeft een grote invloed op het glycogeen gehalte in de spieren. De grootte van de glycogeen uitputting hangt af van de intensiteit en duur van verschillende stressoren en de stressgevoeligheid van het dier. Belangrijke gekende stressoren zijn ondermaats voederen, langdurig transport, laden en lossen, het opdrijven met elektrische prikkers, veranderingen in sociale structuur, verandering van omgeving, klimatologische omstandigheden et cetera (Ferguson & Gerrard, 2014).

3 ONDERZOEKSDOELSTELLINGEN

Deze thesis omvat twee onderzoeksdoelstellingen:

1. Het verloop van de postmortale glycolyse van drie verschillende diertypen (reforme melkkoeien, koeien van het vleestype en stieren van het vleestype) in kaart brengen a.d.h.v. pH- en temperatuurmetingen op vier verschillende tijdstippen na slachten (Proef 1). Het doel van deze metingen is om te achterhalen of het koelproces en/of het verzuringsproces significant verschillen tussen karkassen van de drie diertypen. Gebaseerd op de combinatie van de pH- en temperatuurmetingen van de individuele karkassen wordt de incidentie en duur van *heat shortening* of *cold shortening* bij deze diertypen bepaald, om daaruit af te leiden of een bepaald diertype een hoger risico vertoont op één van deze vormen van postmortale spierversporing.
2. Op vleesstalen van karkassen van dezelfde drie diertypen bepaalde kwaliteitsaspecten en biochemische eigenschappen onderzoeken die verband houden met het postmortale metabolisme (Proef 2). Deze proef omvat vier verschillende analyses namelijk kleurmetingen, bepaling van het glycolytisch potentieel, bepaling van het carnosine- en anserinegehalte, en activiteitsmetingen van drie enzymen (lactaatdehydrogenase, succinaatdehydrogenase en glutathionperoxidase). De doelstelling van deze proef is opnieuw om te achterhalen of er significante verschillen aanwezig zijn tussen diertypen en of deze eigenschappen gelinkt kunnen worden aan het verloop van de postmortale glycolyse.

4 METHODOLOGIE

4.1 Proef 1: Verloop van postmortale glycolyse bij drie diertypen

In totaal werden voor deze proef 204 runderen opgevolgd en gemeten na slachten. Alle runderen werden in hetzelfde commercieel slachthuis Euro Meat Group (EMG) te Moeskroen geslacht. De metingen werden verspreid over 10 verschillende slachtdagen (Tabel 4.1). Het slachtproces begint bij het lossen van de veewagens nadat de runderen werden getransporteerd van de veebedrijven of veemarkten naar het slachthuis. De runderen verblijven voor een bepaalde periode in de wachtstallen om vervolgens in groep geleid te worden naar de bedwelmingsbox. Het slachthuis maakt gebruik van een doordringende mechanische bedwelmingsmethode. Dit is een pneumatisch aangedreven penschiettoestel dat manueel wordt toegepast op de kop van het rund. Na een succesvolle bedwelming worden de dieren opgehesen en volgt het kelen door met een scherp mes de halsslagaders in de nek door te snijden. De verdere handelingen om het dier tot twee commerciële karkashelften om te vormen, werden al reeds besproken in sectie 2.1.4. Op het einde van de slachtlijn wordt de karaksclassificatie uitgevoerd door een erkende classificeerder, worden de karkassen gewogen en wordt op beide karkashelften een etiket bevestigd. Hierna volgt het koelproces dat ongeveer 50 tot 60 minuten na het kelen begint en start met een koeltunnel die bestaat uit drie zones. Hier wordt voorgekoelde lucht tussen de karkassen geblazen. Het resultaat van dit traject is een karkas dat aan de oppervlakte quasi droog is waardoor oppervlakkige kiemen weinig kans hebben om uit te groeien. De karkassen worden uiteindelijk in frigo's geplaatst met een temperatuur van ongeveer 2°C om verder uit te koelen. Deze karkassen verblijven gewoonlijk minstens 24 uur in deze frigo's voordat ze het slachthuis verlaten.

Gegevens van ieder rundkarkas werden afgelezen van het etiket. Een foto van zo'n etiket wordt weergegeven in Figuur 4.1. Volgende informatie werd overgenomen van het etiket:

- Land van herkomst
- Sanitel- of identificatienummer van het rund
- Slachtdatum
- Leeftijd van het rund
- Warm karkasgewicht
- Karkasindeling (Groep, SEUROP-score en vetheid)

Het toebehorende diertype van het rund werd afgeleid uit de karkasindeling en het bijhorende runderpaspoort a.d.h.v. het identificatienummer.



Figuur 4.1: Voorbeeld van etiket in het slachthuis bevestigd aan beide karkashelften (eigen foto)

De pH- en temperatuurmetingen werden uitgevoerd 1, 3, 5 en 24 uur na het kelen in de lange rugspier (*musculus longissimus dorsi*). De pH-meting werd uitgevoerd door gebruik te maken van een Knick Portamess pH-meter met een Mettler Toledo LoT406-M6-DXK-S7/25 elektrode of een N 5800 A pH-combinatie elektrode van SI-Analytics. Op eenzelfde tijdstip werd de pH twee- tot driemaal gemeten om vervolgens hiervan het gemiddelde te berekenen. De pH die werd gemeten 24 uur na het kelen, wordt in deze proef gezien als de ultieme pH van het vlees. De temperatuur werd gemeten met een Testo 105 handthermometer met standaard steekvoeler. De precieze locatie van de meting gebeurde steeds op de linker karkashelft in de lange rugspier ter hoogte van de 7^{de} en 8^{ste} rib. De diepte van de meting is afhankelijk van het diertype. Karkassen van melkkoeien werden op een diepte van 4 cm gemeten terwijl runderen van het vleestype op 8 cm diepte met als doel steeds de pH en temperatuur in het centrum van de spier te bepalen. De eerste meting werd uitgevoerd net voor de karkassen de koeltunnel binnengaan en komt overeen met ongeveer 1 uur na het kelen. De andere metingen werden uitgevoerd in de frigo's terwijl de karkassen verder uitkoelen.

De duur van potentiële *shortening* werd berekend op basis van pH- en temperatuurgrenzen gedefinieerd door Thompson (2002). *Heat shortening* of warmteconcentratie vindt plaats wanneer de pH daalt onder 6 terwijl de temperatuur van de spier zich nog boven 35 °C bevindt. *Cold shortening* of koudeconcentratie gebeurt wanneer de pH-waarde nog niet gedaald is onder 6, maar het karkas al reeds afgekoeld is tot onder 10 °C. Deze tijdstippen werden bepaald door gebruik te maken van lineaire interpolatie tussen de twee dichtstbijzijnde meetpunten.

4.2 Proef 2: Eigenschappen van vleesstalen bij drie diertypen

Voor deze proef werden in totaal 34 vleesstalen genomen van rundkarkassen behorende tot verschillende diertypen. De slachtingen werden verspreid over drie verschillende slachtdagen, waarbij de melkkoeien op twee opeenvolgende dagen werden geslacht en de runderen van het vleestype op dezelfde dag (Tabel 4.2). Alvorens de staalname werd uitgevoerd, werden deze karkassen opnieuw opgevolgd en het verloop van de pH en temperatuur gemeten identiek zoals bij proef 1. Alle karkassen verbleven minstens 24 uur in de frigo's na het slachten. Echter het eerste deel van de karkassen afkomstig van melkkoeien verbleven ongeveer 24 uur langer in de frigo t.o.v. het tweede deel, want deze werden op hetzelfde moment geladen. De staalname zelf gebeurde net voordat de karkassen werden geladen vanuit de frigo's van het slachthuis op een koelwagen. Alle karkashelften werden voor het laden versneden in een voor- en achterkwartier. Op dit snijvlak afkomstig van de linker karkashelft werd een staal lange rugspier genomen van minstens 100 gram. Deze stalen werden genummerd, in een plastic zakje gestoken en in een koelbox meteen overgebracht naar het labo.

Zodra de stalen waren aangekomen in het labo werden deze bij een constante kamertemperatuur van 12 °C blootgesteld aan de lucht. Alle stalen hebben minstens 30 minuten kunnen bloemen waarna de kleur op het snijvlak werd gemeten. De kleur- en reflectiewaarden werden gemeten met een Hunterlab Miniscan XE Plus-toestel. De gehalten metmyoglobine, oxymyoglobine en deoxymyoglobine worden berekend a.d.h.v. de reflectiewaarden bij de golflengten 520, 530, 570, 580 en 700 nm, en door gebruik te maken van formules gedefinieerd door Lindahl et al. (2001). Na het uitvoeren van de kleurmetingen werden de stalen omgevormd tot homogene stalen. Dit gebeurde door overtollig vet van de stalen te verwijderen en enkele minuten te vermalen met een La Moulinette XXL hakmolen. Vervolgens werden de stalen vacuüm verpakt en in een vriezer bewaard bij een temperatuur van -80 °C.

Het bepalen van het glycolytisch potentieel van een vleesstaal gebeurt door de gehalten melkzuur, glycogeen, glucose en glucose-6-fosfaat te bepalen en de formule van Monin en Sellier (1985) toe te passen die reeds werd besproken in sectie 2.4.3. Eerst worden vleesextracten gemaakt van de stalen door gebruik te maken van perchloorzuur (HClO_4). Aan exact 5 gram homogeen staal wordt 40 mL perchloorzuur (0,6 M) toegevoegd en gehomogeniseerd met de Ultra turrax (type 18/10, Janke und Kunkel, KG, Duitsland) gedurende 1 minuut (8000 tpm). Deze suspensie wordt gefilterd met filterpapier en nogmaals gespoeld met perchloorzuur (0,6 M) tot het totaal volume van het extract 100 mL bedraagt. Deze perchloorzuurextracten werden bewaard in de vriezer bij een temperatuur van -20°C.

De melkzuurconcentratie in het vleesstaal werd bepaald volgens de Conway techniek. Voor deze analyse wordt een standaardreeks van 0 tot 1,5 μmol melkzuur per mL aangemaakt. Eerst wordt 1 mL extract of standaard aan één kant in de midden-ring van een Conwayschaal gebracht. Aan de andere kant van de midden-ring wordt 1 mL verzadigde ceriumoplossing gebracht. In de centrale ring wordt 2 mL Seca-oplossing (828 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 5012 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in 50 mL water, voeg 75 mg semi-carbazide toe en leng aan tot 100 mL met gedestilleerd water, pH 7) gebracht. In de buitenste ring wordt 1,5 mL verzadigde ceriumoplossing gebracht. De Conwayschaal wordt zo goed mogelijk afgesloten met een

deksel. Het extract of standaard en de ceriumoplossing in de midden-ring worden met elkaar in contact gebracht door ze in elkaar te laten vloeien. Deze schalen overnachten bij kamertemperatuur om de oplossing verder te laten diffunderen. De volgende dag wordt 1 mL Seca-oplossing uit de centrale ring overgebracht in een zuivere proefbuis. De Seca-oplossingen met de standaarden werden 10 maal verdund, en deze met de vleesstalen werden 40 maal verdund met gedestilleerd water. Uiteindelijk wordt de absorptie bij 224 nm van deze verdunningen gemeten met een spectrofotometer. Aan de hand van de regressierechte van de standaardreeks en rekening houdend met de verdunningen wordt de melkzuurconcentratie van de stalen berekend. De resultaten worden uitgedrukt in μmol lactaat per gram vlees. Het melkzuurgehalte van alle stalen en standaarden werd in duplo bepaald en daarvan werd het gemiddelde genomen.

De som van de gehalten aan glycogeen, glucose en glucose-6-fosfaat wordt tijdens eenzelfde analyse bepaald. Deze analyse is gebaseerd op de methode voor het bepalen van het glycolytisch potentieel van spierweefsel in muizen beschreven door Shen et al. (2005). Een standaardreeks van 0 tot 6,0 μmol glucose per mL werd voor deze analyse bereid. Eerst wordt 0,5 mL perchloorzuurextract of standaard in een tube met dop gebracht. Hieraan wordt 2,5 mL amyloglucosidase-oplossing (1 mg/mL amyloglucosidase in 0,2 M acetaatbuffer met pH 4,8) toegevoegd. Deze tubes worden kort geschud en geïncubeerd voor 2 uur in een warmwaterbad bij 37°C. Daarna worden de tubes 5 minuten gekoeld op ijs. Aan 40 μL van deze oplossing wordt 0,8 mL assaybuffer (1 mM ATP, 1 mM NADP, 2,5 U glucose-6-fosfaatdehydrogenase/mL en 2,5 U hexokinase/mL in 0,1 M Tris-HCl met pH 7,4) toegevoegd. Na ongeveer 1 uur werd de absorptie van deze oplossing gemeten bij 340 nm m.b.v. een spectrofotometer. Aan de hand van de regressierechte van de standaardreeks werd de totale hoeveelheid aan glycogeen, glucose en glucose-6-fosfaat van de stalen berekend. Opnieuw werd voor ieder staal en standaard de concentratie minstens twee keer bepaald en hiervan werd het gemiddelde genomen. De resultaten worden uitgedrukt in μmol glucose per gram vlees. Het glycolytisch potentieel wordt uitgedrukt in μmol lactaat per gram vlees en werd berekend a.d.h.v. de formule van Monin en Sellier (1985).

Het carnosine- en anserinegehalte werd bepaald op basis van de methode beschreven door Kobe et al. (2011). Eerst wordt 2 gram homogeen vleesstaal afgewogen. Hieraan wordt 8 mL extractiebuffer (0,01 M fosfaatbuffer met pH 7,4) toegevoegd en vervolgens wordt deze suspensie gehomogeniseerd met de Ultra turrax. Aan 0,8 mL van dit extract wordt 3,2 mL extractiebuffer en 2 mL acetonitrile toegevoegd. De stalen worden overnacht bewaard bij een temperatuur van 4°C en vervolgens gedurende 10 minuten bij 4°C aan 3000 tpm gecentrifugeerd. De bovenste vloeistoflaag wordt gefilterd met behulp van een cellulosespuitfilter met een poriegrootte van 0,20 μm . De stalen worden geanalyseerd door 20 μL te injecteren in een HPLC-toestel. Het HPLC-toestel werd uitgerust met een aminopropyl EC250/4.6 Nucleosil 120-7 NH_2 -kolom (Machery-Nagel, Düren, Duitsland ref. 720058.46). Een diode array detector werd gebruikt bij 210 nm (Agilent). De concentraties werden berekend a.d.h.v. een standaardreeks met gekende concentraties tussen 0,02 en 0,14 mg per mL van zowel carnosine als anserine. De scheiding werd op isocratische wijze uitgevoerd met een stroomsnelheid van 1 mL per minuut. De mobiele fase bestond uit acetonitrile/200 mM fosfaatbuffer (pH 5) in een verhouding van 60/40. De resultaten worden uitgedrukt in mg carnosine of anserine per gram vlees.

Tenslotte werd de enzymactiviteit van lactaatdehydrogenase, succinaatdehydrogenase en glutathionperoxidase bepaald. Deze drie metingen maken gebruik van hetzelfde extract. Aan 2 gram homogeen vleesstaal wordt 8 mL extractiebuffer (0,01 M fosfaatbuffer met pH 7,5) toegevoegd en vervolgens wordt deze suspensie gehomogeniseerd voor 30 seconden met de Ultra turrax. Deze stalen dienen zoveel mogelijk op ijs gehouden te worden. De extracten worden gedurende 30 minuten bij 4 °C aan 4200 tpm gecentrifugeerd en daarna worden ze gefilterd met filterpapier. Voor de meting van lactaatdehydrogenase wordt dit extract 40 maal verdund door 3,9 mL extractiebuffer aan 0,1 mL extract toe te voegen. In een proefbuis worden 2,8 mL NADH-oplossing (0,39 mM in 0,1 M fosfaatbuffer met pH 7,5), 0,1 mL pyruvaatoplossing (34 mM in 0,1 M fosfaatbuffer met pH 7,5) en 0,1 mL verdund extract samengevoegd. Deze oplossing wordt gemengd, meteen overgebracht in een cuvette en in een spectrofotometer gestoken. De absorptie wordt gedurende 5 minuten bij 37°C gemeten bij een golflengte van 340 nm. De enzymactiviteit wordt berekend door gebruik te maken van de Lambert-Beer formule. De extinctiecoëfficiënt van NADH bij 340 nm bedraagt 6,22 liter per mmol per cm. De richtingscoëfficiënt van de daling van de absorptiecurve werd berekend voor stalen van het runderen van het melktype tussen de 100 en 250 seconden en voor het vleestype tussen de 50 en 155 seconden. De activiteit van lactaatdehydrogenase wordt uitgedrukt als de hoeveelheid pyruvaat (μmol) dat wordt omgezet tot lactaat per minuut per gram vlees bij pH 7,5 en 37°C.

Het bepalen van de activiteit van succinaatdehydrogenase is gebaseerd op de methode beschreven door Green en Narahara (1980), en Armstrong en Staples (2010). Hiervoor wordt 1 mL assaybuffer (55 mM KH_2PO_4 , 25 mM sucrose, 55 mM succinaat en 0,11% w/v iodinitrotetrazoliumchloride met pH 7,4) aan 0,2 mL onverdund vleesextract toegevoegd. Dit mengsel wordt geschud en meteen in een cuvet in de spectrofotometer gestoken. Opnieuw wordt de absorptie gemeten gedurende 10 minuten bij 37 °C bij een golflengte van 490 nm. De enzymactiviteit wordt berekend door gebruik te maken van de Lambert-Beer formule. De extinctiecoëfficiënt van iodinitrotetrazoliumchloride bij 490 nm bedraagt $2,0 \times 10^4$ liter per mmol per cm (Green & Narahara, 1980). De richtingscoëfficiënt van de stijging van de absorptiecurve werd voor alle stalen berekend tussen 75 en 500 seconden. De activiteit van succinaatdehydrogenase wordt uitgedrukt als de hoeveelheid succinaat (nmol) dat wordt omgezet tot fumarate per minuut per gram vlees bij pH 7,4 en 37°C.

Als laatste wordt de activiteit van het enzym glutathionperoxidase gemeten. Deze methode werd beschreven door Hernández et al. (2004). Eerst werden de vleesextracten driemaal verdund door 200 μL gedemineraliseerd water aan 100 μL vleesextract toe te voegen. In een proefbuis worden 0,3 mL verdund extract, 2,65 mL mediumoplossing (1,13 mM gereduceerd glutathion, 0,57 mM EDTA, 1,13 mM NaN_3 en 0,017 U/mL glutathionreductase in 50 mM fosfaatbuffer met pH 7), 26 μL NADPH-oplossing (17,3 mM in 50 mM fosfaatbuffer met pH 7) en 20 μL H_2O_2 -oplossing (22,5 mM) samengevoegd. Dit mengsel wordt geschud en meteen in een cuvet in de spectrofotometer gestoken. De absorptie wordt gedurende 8 minuten bij 25°C gemeten bij een golflengte van 340 nm. De enzymactiviteit wordt berekend door gebruik te maken van de Lambert-Beer formule. De extinctiecoëfficiënt van NADPH bij 340 nm bedraagt 6,22 liter per mmol per cm. De richtingscoëfficiënt van de daling van de absorptiecurve werd voor alle stalen berekend tussen 10 en 300 seconden. De activiteit van glutathionperoxidase wordt uitgedrukt als de hoeveelheid NADPH (μmol) geoxideerd tot NADP^+ per minuut per gram vlees bij pH 7 en 25°C.

4.3 Statistische analyse

Het gemiddelde en de standaarddeviatie van de verschillende parameters werden berekend voor elk van de drie diertypen. Voor beide proeven werd enkel diertype beschouwd als vaste factor in het statistisch model. Het gemiddeld warm karkasgewicht en leeftijd bij slachten verschillen sterk tussen diertypen, maar deze verschillen zijn ook typisch voor de beschouwde diertypen, en het was daarom niet aangewezen deze variabelen mee te nemen als co-variabelen. Ook slachtdatum werd niet in rekening gebracht in de modellen. Tabel 4.1 en 4.2 geven het aantal dieren van elk diertype per slachtdatum weer voor respectievelijk proef 1 en 2. Hieruit wordt afgeleid dat op geen enkele slachtdag runderen van alle drie diertypen werden gemeten. Enkel vleeskoeien en vleesstieren werden op enkele dagen samen gemeten, maar alle melkkoeien werden op aparte slachtdagen gemeten. Om deze reden werd besloten om slachtdatum niet mee te nemen als factor in het model. Er moet dus rekening gehouden worden met een mogelijke invloed van slachtdageffecten. We verwachten evenwel niet dat dit de resultaten sterk zal beïnvloeden omdat alle dieren onder dezelfde omstandigheden werden geslacht.

Het effect van diertype werd daarom getest aan de hand van een *one-way* ANOVA in SPSS indien de voorwaarde van homoscedasticiteit niet werd geschonden. Homoscedasticiteit of de homogeniteit van variantie werd gecontroleerd aan de hand van Levene's test. Verschillen tussen diertypen werden vervolgens vergeleken met de *post hoc* Tukey HSD-test waar het significantieniveau werd gesteld op $p \leq 0,05$. Indien de voorwaarde van homoscedasticiteit werd geschonden, werd de Welch's test uitgevoerd. Verschillen tussen diertypen werden dan vergeleken met de *post hoc* Games-Howell test waar het significantieniveau werd gesteld op $p \leq 0,05$.

Tabel 4.1: Overzicht van het aantal dieren van elk diertype per slachtdatum tijdens proef 1

	M (n=93)	VK (n=34)	VS (n=77)
18/10/2018	15		
15/11/2018	12		
19/11/2018	16		
27/11/2018	19		
10/12/2018			30
4/03/2019		13	10
20/05/2019		13	27
24/06/2019	11		
25/06/2019	20		
8/07/2019		8	10

Tabel 4.2: Overzicht van het aantal dieren van elk diertype per slachtdatum tijdens proef 2

	M (n=16)	VK (n=8)	VS (n=10)
24/06/2019	8		
25/06/2019	8		
8/07/2019		8	10

5 RESULTATEN EN DISCUSSIE

5.1 Proef 1: Verloop van postmortale glycolyse bij drie diertypen

Tabel 5.1 geeft een overzicht van het warm karkasgewicht, de slachtleeftijd en de pH- en temperatuurmetingen per diertype, samen met de statistische significantie van de verschillen. Melkkoeien (M) zijn de oudste dieren met een gemiddelde leeftijd van 66 maanden. Echter deze leeftijd kan sterk variëren t.o.v. de andere diertypen. Tijdens deze proef werd namelijk een leeftijd van minimum 24 maanden tot maximaal 135 maanden vastgesteld. Melkkoeien beschikken over het laagste gemiddeld karkasgewicht van 265 kg. Vleeskoeien (VK) zijn beduidend ouder dan de vleesstieren, maar zijn nog steeds gemiddeld jonger dan de melkkoeien met een gemiddelde leeftijd van 52 maanden. Vleeskoeien beschikken over het hoogste gemiddeld karkasgewicht met 535 kg t.o.v. de andere diertypen. Vleesstieren (VS) worden getypeerd als jongere runderen met een hoog warm karkasgewicht. De gemiddelde leeftijd van vleesstieren bedraagt 22 maanden en het warm karkasgewicht 513 kg. Alle vleeskoeien en vleesstieren tijdens deze proef behoren tot het Belgisch Witblauwras. De verschillen in leeftijd en gewicht kunnen deels verklaard worden door de productiesystemen en het rastype waartoe deze diertypen behoren. Dieren van het vleestype worden namelijk gekweekt om kwantitatief en kwalitatief vlees te produceren. Vleesstieren behorende tot het Belgisch Witblauwras bereiken op een relatief korte periode een hoog slachtgewicht, terwijl de vrouwelijke runderen van het vleestype eerst worden gebruikt voor reproductie om vervolgens op latere leeftijd geslacht te worden. Melkkoeien worden gehouden voor hun melkproductie. Bij vervanging worden deze reforme melkkoeien ofwel meteen naar het slachthuis gebracht ofwel afgemest gedurende een bepaalde periode met als doel een hogere vleesopbrengst te bekomen.

Het aantal runderen ingedeeld volgens karkasindeling voor elk diertype wordt weergegeven in Tabel A.1. De conformatie en het vetgehalte van alle vleeskoeien en vleesstieren zijn hetzelfde (S-klasse met vetscore 2) met uitzondering van drie vleeskoeien die behoren tot de E-klasse. Melkkoeien hebben een grotere variatie in karkasindeling. Ongeveer twee derde van de karkassen behoren tot de P-klasse (62) en de rest tot de O-klasse (31). De overmaat van karkassen kregen een vetscore 2. Slechts 16 karkassen kregen een vetscore 1. Tijdens deze proef werd ook het land van herkomst van alle runderen geregistreerd. Dit wordt schematisch weergegeven in Tabel A.2. Alle vleeskoeien en vleesstieren zijn Belgische runderen. Bij de melkkoeien werden zowel Belgische (77), Franse (14) en Duitse (3) dieren gemeten. De Franse melkkoeien worden gekenmerkt door een gemiddeld lagere vetscore, pH_{24u} bij ongeveer de helft van deze dieren hoger dan 6 bedraagt. Het effect van land van herkomst en karkasindeling worden hier niet verder besproken.

Tabel 5.1: Warm karkasgewicht, slachtleeftijd en pH- en temperatuurmetingen voor melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS) tijdens proef 1

	M (n=93)	VK (n=34)	VS (n=77)	Sign ¹
Gewicht ² (kg)	265 ± 43 ^c	535 ± 36 ^a	513 ± 55 ^b	***
Leeftijd (m)	66 ± 26 ^a	52 ± 9 ^b	22 ± 3 ^c	***
T _{1u} (°C)	36,1 ± 2,2 ^b	39,4 ± 0,4 ^a	39,4 ± 0,7 ^a	***
T _{3u} (°C)	17,6 ± 4,4 ^b	31,6 ± 1,8 ^a	31,4 ± 2,0 ^a	***
T _{5u} (°C)	9,9 ± 4,0 ^b	23,7 ± 1,4 ^a	24,0 ± 2,0 ^a	***
T _{24u} (°C)	1,8 ± 0,3 ^b	3,1 ± 0,6 ^a	3,5 ± 1,4 ^a	***
pH _{1u}	6,82 ± 0,15 ^a	6,63 ± 0,24 ^b	6,65 ± 0,19 ^b	***
pH _{3u}	6,57 ± 0,22 ^a	6,10 ± 0,23 ^b	6,06 ± 0,23 ^b	***
pH _{5u}	6,42 ± 0,25 ^a	5,81 ± 0,19 ^b	5,82 ± 0,24 ^b	***
pH _{24u}	5,77 ± 0,24 ^a	5,64 ± 0,05 ^b	5,62 ± 0,09 ^b	***

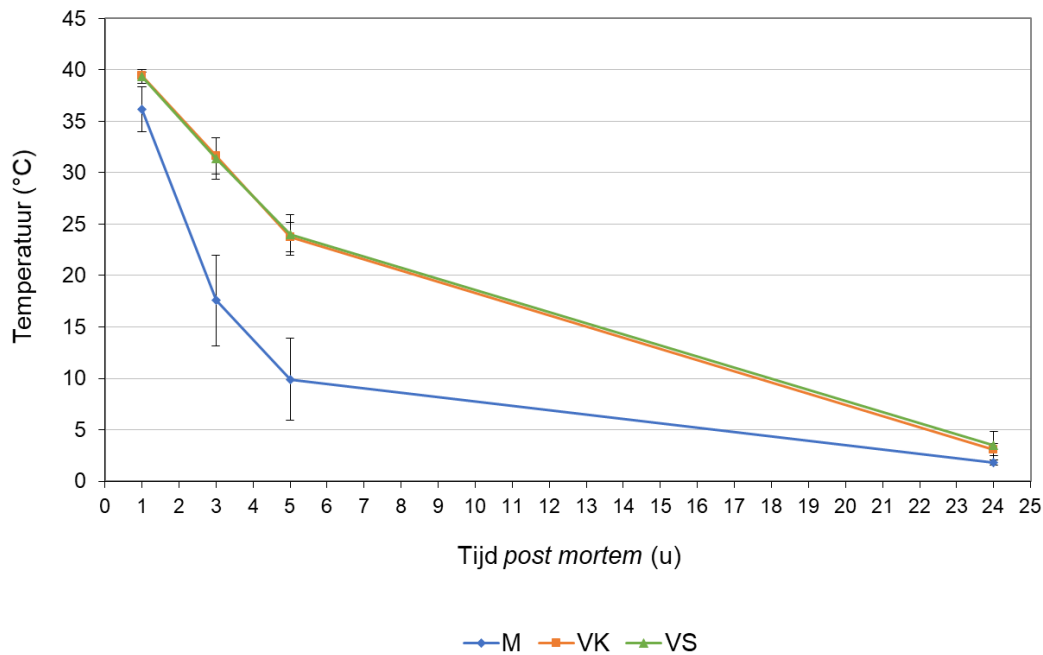
¹ NS (p > 0,05), * (p ≤ 0,05), ** (p ≤ 0,01), *** (p ≤ 0,001)

² Warm karkasgewicht

^{abc} Verschillende letters betekenen significantie tussen de groepen (p ≤ 0,05)

Het temperatuurverloop van elk diertype wordt grafisch weergegeven in Figuur 5.1. De karkastemperaturen zijn op geen enkel tijdstip significant verschillend tussen vleeskoeien en vleesstieren. De karkastemperaturen van de melkkoeien daarentegen zijn significant lager t.o.v. de runderen van het vleestype. Dit is logisch aangezien zwaardere karkassen met een betere conformatie trager afkoelen t.o.v. lichte platte karkassen onder dezelfde koelomstandigheden. Sommige runderen van het vleestype hebben een T_{1u} boven 40 °C. Deze lichte stijging in karkastemperatuur kan verklaard worden door de postmortale ATP-hydrolyse waar een deel van de geproduceerde energie onder de vorm van warmte wordt afgegeven in de spieren (Kuffi et al., 2018). Opmerkelijk is dat 10 vleesstieren geslacht op dezelfde dag een T_{24u} boven 6 °C hebben. Deze karkassen bevonden zich in een andere frigo t.o.v. de andere karkassen waar mogelijk een probleem met de koeling plaatsvond.

Het pH-verloop (Figuur 5.2) lijkt een gelijkaardige trend te vertonen, waar de pH-waarden op de verschillende tijdstippen opnieuw niet significant verschillen tussen vleeskoeien en vleesstieren. De pH-waarden van de melkkoeien zijn significant hoger t.o.v. de andere diertypen. Bij 13 melkkoeien werd een pH_{24u} hoger dan 6 gemeten waardoor deze worden gecategoriseerd als DFD indien de pH niet meer wijzigt. Bij de vleeskoeien en vleesstieren bleek geen enkele pH_{24u} zich boven 6 te bevinden. De lange rugspier of *M. longissimus dorsi* wordt vaak gebruikt in onderzoeken omtrent het postmortaal metabolisme en vleeskwaliteit omdat deze wordt gecategoriseerd als een belangrijke glycolytische spier. De gemiddelde spiervezelsamenstelling van de lange rugspier bij runderen bedraagt ongeveer 30% type 1, 18% type 2A en 52% type 2X (Listrat et al., 2016). Gebaseerd op de classificatie opgesteld door O'Halloran et al. (1997) wordt de lange rugspier van de vleeskoeien en vleesstieren ingedeeld als een snel glycolytische spier en van de melkkoeien als een traag glycolytische spier. Het verzuringsproces van spieren wordt beïnvloed door de temperatuur. Een hogere postmortale temperatuur in de spier resulteert in een hogere enzymactiviteit met een snellere pH-daling tot gevolg (Kuffi et al., 2018). Dit wordt nogmaals bevestigd aan de hand van onze resultaten.

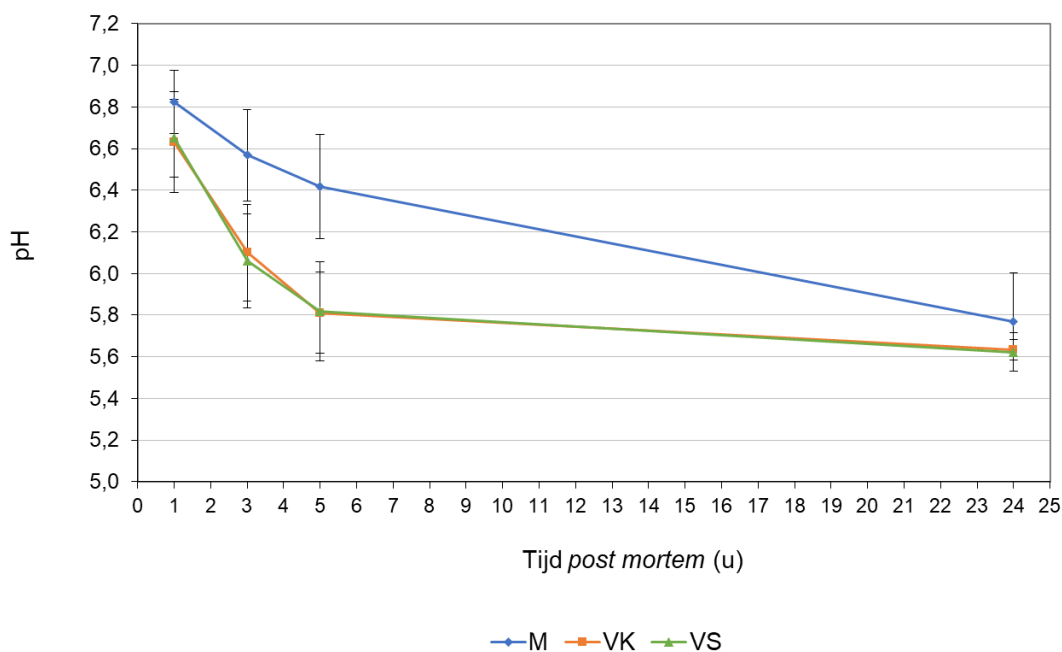


Figuur 5.1: Gemiddelde postmortale temperaturen met foutbalken (standaarddeviatie) in de lange rugspier van melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS).

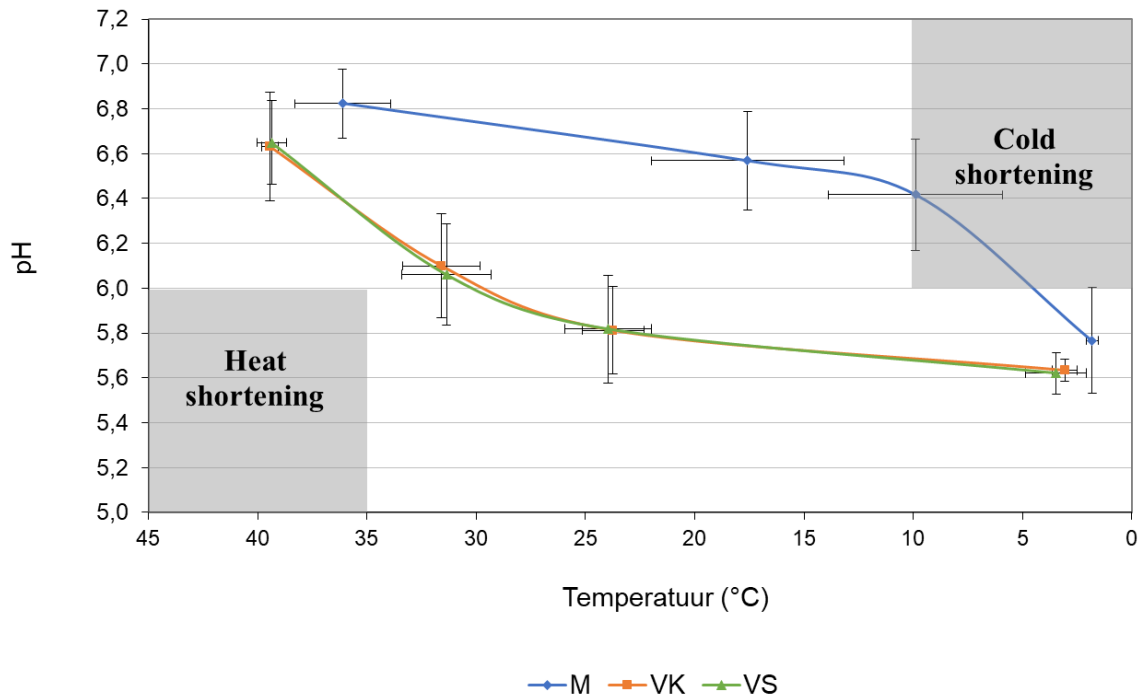
In Figuur 5.3 worden de gemiddelde pH-metingen weergegeven in functie van de temperatuur voor de drie diertypen. Hierbij worden de zones voor zowel *heat shortening* als *cold shortening* weergegeven gedefinieerd door Thompson (2002). Deze voorwaarden voor *shortening* werden reeds besproken in sectie 2.4.3. Slechts 2 vleeskoeien en 9 vleesstieren voldeden voor een bepaalde periode aan de voorwaarden voor *heat shortening*. Deze periode varieert van enkele minuten tot maximaal drie uur. Door een trage pH-daling gecombineerd met een snelle temperatuurdaling ondervonden de meeste melkkoeien een bepaalde periode *cold shortening*. Naast de 13 runderen die gecategoriseerd worden als DFD, ondervonden in totaal 62 melkkoeien enige vorm van *cold shortening*. Deze periode varieert van minimum enkele minuten tot maximaal 18 uren. Belangrijk om te onthouden is dat de periode van *shortening* werd berekend a.d.h.v. lineaire interpolatie tussen de twee dichtstbijzijnde meetpunten. Het werkelijk verloop van de temperatuur en pH is hoogstwaarschijnlijk niet lineair waardoor de berekende periode slechts een schatting is.

In een studie van Page et al. (2001) werd het effect van rastype onderzocht op bepaalde parameters zoals temperatuur, pH en kleur van spieren. Hierbij werd onderscheid gemaakt tussen o.a. runderen van het melktype (Holstein) en vleestype (Brahman). De runderen van het melktype hadden een lager warm karkasgewicht, hogere postmortale pH-waarden en lagere karkastemperaturen t.o.v. de Brahman-runderen. In een onderzoek van De Smet et al. (2000) werd het effect van het *double-muscling* genotype op karkas- en vleeskwiteit bij runderen van het Belgisch Witblauwras onderzocht. De oorzaak van dit verschijnsel is te wijten aan een mutatie in het myostatine-gen. De huidige witblauwpopulatie van het vleestype is homozygoot voor dit defecte myostatine-gen (mh/mh) (Nantier & Braam, 2006). Dubbel gespierde runderen beschikken over zwaardere karkassen met een betere conformatie en een groter aandeel glycolytische spiervezels t.o.v. normale runderen (Clinquart et al., 1998). De karkastemperatuur en pH kort na slachten waren voor dubbel gespierde runderen respectievelijk hoger en lager t.o.v. normale runderen. Dit reflecteert het hoger glycolytisch metabolisme bij dubbel gespierde runderen waartoe de diertypen vleeskoeien en vleesstieren behoren.

In een onderzoek van Pastsart et al. (2013) werd het postmortale temperatuur- en pH-verloop in de lange rugspier bepaald bij 40 stieren van het Belgisch Witblauwras op analoge wijze als in deze proef. De karkastemperaturen T_{1u} (39,9), T_{3u} (36,0) en T_{5u} (30,1) waren gemiddeld hoger t.o.v. de vleesstieren gemeten tijdens onze proef. De pH_{1u} (6,47), pH_{3u} (5,69) en pH_{5u} (5,55) waren duidelijk lager. De trage temperatuurdaling in combinatie met een snelle pH-daling resulteert in een korte periode waar de spieren *heat shortening* ondervinden. De gemiddelde duur van warmteconcentratie in de lange rugspier bedroeg 1,2 uur. Een mogelijke oorzaak van deze afwijkingen met onze resultaten is het koelproces dat werd toegepast in de slachthuizen, waar onze karkassen sneller gekoeld werden om de incidentie van *heat shortening* te reduceren.



Figuur 5.2: Gemiddelde postmortale pH-waarden met foutbalken (standaarddeviatie) in de lange rugspier van melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS).



Figuur 5.3: Gemiddelde waarden met foutbalken (standaarddeviatie) voor postmortale pH en temperatuur in de lange rugspier van melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS). De meetpunten vertegenwoordigen respectievelijk van links naar rechts metingen gebeurt 1, 3, 5 en 24 uur na slachten.

5.2 Proef 2: Eigenschappen van vleesstalen bij drie diertypen

De gemeten kenmerken worden voor elk diertype weergegeven in Tabel 5.2. Het gemiddeld warm karkasgewicht is opnieuw het hoogst bij de vleeskoeien en het laagst bij de melkkoeien. De gemiddelde leeftijd van vleesstieren is duidelijk lager t.o.v. de andere diertypen, maar tussen melkkoeien en vleeskoeien is de gemiddelde leeftijd niet significant verschillend. De karkasindeling per diertype wordt weergegeven in Tabel A.3. Alle runderen in deze proef zijn van Belgische afkomst. De karkastemperaturen van deze groep runderen volgen dezelfde trend zoals bij de eerste proef. Enkel de T_{1u} is significant hoger voor vleeskoeien t.o.v. de andere diertypen, maar de T_{1u} van melkkoeien en vleesstieren zijn niet significant verschillend. Alsook de pH wijkt nauwelijks af van de gemiddelde pH-waarden bij proef 1. Enkel de pH_{1u} tussen melkkoeien en vleeskoeien is significant verschillend. De pH_{3u} en pH_{5u} zijn opnieuw significant lager bij melkkoeien t.o.v. de andere diertypen. Opmerkelijk bij de pH_{24u} werd een p-waarde onder het significantieniveau ($\alpha=0,05$) bepaald, maar a.d.h.v. de *post hoc* test werden geen onderlinge significante verschillen gevonden tussen de verschillende diertypen. Bij drie melkkoeien werd een pH_{24u} boven 6 gemeten.

In tabel 5.3 worden de kleurparameters voor elk diertype weergegeven. Vleeskoeien beschikken over bleker vlees (hogere L^* -waarde) en melkkoeien over donkerder vlees (lagere L^* -waarde). Deze resultaten volgen de conclusie van De Smet et al. (2000) dat het vlees van dubbel gespierde runderen van het Belgisch Witblauwras een blekere kleur vertonen t.o.v. de normale runderen. Het onderzoek van Fiems et al. (2003) bevestigt dat het vlees van vleesstieren behorende tot het Belgisch Witblauwras bleker is dan dat van vleeskoeien. In rundvlees net zoals bij varkensvlees wordt een hoge temperatuur en een lage pH-waarde kort na het slachten geassocieerd met een blekere kleur (Pastsart et al., 2013). Steen et al. (1997) vond een significante negatieve correlatie tussen de L^* -waarde en pH op verschillende

Tabel 5.2: Warm karkasgewicht, slachtleeftijd en pH- en temperatuurmetingen voor melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS) tijdens proef 2

	M (n=16)	VK (n=8)	VS (n=10)	Sign ¹
Gewicht* (kg)	248 ± 21 ^c	548 ± 29 ^a	518 ± 20 ^b	***
Leeftijd (m)	58 ± 24 ^a	53 ± 11 ^a	20 ± 2 ^b	***
T_{1u} (°C)	37,1 ± 2,2 ^b	39,8 ± 0,3 ^a	38,6 ± 0,4 ^b	***
T_{3u} (°C)	16,6 ± 3,0 ^b	33,3 ± 0,7 ^a	31,7 ± 2,3 ^a	***
T_{5u} (°C)	8,7 ± 2,5 ^b	24,2 ± 0,6 ^a	24,4 ± 1,6 ^a	***
T_{24u} (°C)	1,8 ± 0,3 ^b	2,5 ± 0,2 ^a	2,6 ± 0,3 ^a	***
pH_{1u}	6,83 ± 0,14 ^a	6,57 ± 0,36 ^b	6,69 ± 0,13 ^{ab}	*
pH_{3u}	6,62 ± 0,21 ^a	6,07 ± 0,25 ^b	6,14 ± 0,17 ^b	***
pH_{5u}	6,48 ± 0,18 ^a	5,72 ± 0,12 ^c	5,91 ± 0,17 ^b	***
pH_{24u}	5,78 ± 0,21	5,65 ± 0,03	5,69 ± 0,05	*

¹ NS ($p > 0,05$), * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$)

² Warm karkasgewicht

^{abc} Verschillende letters betekenen significantie tussen de groepen ($p \leq 0,05$)

Tabel 5.3: Kleurwaarden en verhoudingen van de verschillende vormen van myoglobine voor melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS)

	M (n=16)	VK (n=8)	VS (n=10)	Sign ¹
L*	26,5 ± 2,7 ^c	33,6 ± 3,0 ^b	37,4 ± 3,3 ^a	***
a*	21,2 ± 1,7 ^c	28,7 ± 2,7 ^a	24,7 ± 1,7 ^b	***
b*	18,6 ± 1,5 ^b	23,2 ± 2,0 ^a	21,5 ± 1,7 ^a	***
DeoxyMb (%)	21,3 ± 6,9 ^a	5,6 ± 1,3 ^c	8,1 ± 1,9 ^b	***
MetMb (%)	15,1 ± 2,5 ^b	19,7 ± 1,6 ^a	16,8 ± 1,7 ^b	***
OxyMb (%)	63,6 ± 6,8 ^b	74,7 ± 1,8 ^a	75,1 ± 2,0 ^a	***

¹ NS (p > 0,05), * (p ≤ 0,05), ** (p ≤ 0,01), *** (p ≤ 0,001)

^{abc} Verschillende letters betekenen significantie tussen de groepen (p ≤ 0,05)

tijdstippen na het slachten in de lange rugspier bij dubbel gespierde stieren. Vleeskoeien hebben duidelijk roder vlees (hogere a*-waarde) t.o.v. de andere diertypen. Ook dit werd bevestigd in het onderzoek van Fiems et al. (2003) dat vlees van vleeskoeien gemiddeld een hogere a*-waarde hadden dan vleesstieren. De rodere kleur bij de vleeskoeien en vleesstieren kan gelinkt worden aan hun significant hoger percentage aan oxymyoglobine t.o.v. de melkkoeien. Page et al. (2001) rapporteerde ook negatieve correlaties tussen de kleurwaarden (L*, a* en b*) en de pH van vlees. Dit betekent wanneer de pH-waarde stijgt, de kleurtint van het vlees zal wijzigen naar een meer blauwe, groene en donkere vleeskleur. De vleeskleur wordt sterk beïnvloed door de reflectie van licht op het waterig vleesoppervlak en de oxidatietoestand van myoglobine. Een hoge pH resulteert namelijk in minder vrij water aan het vleesoppervlak wat zorgt voor een donkerdere kleur. De enzymactiviteit en het zuurstofverbruik van deze enzymen is ook hoger bij een hoge pH waardoor de oxidatie van myoglobine wordt geremd wat ook resulteert in een donkere kleur (Ledward et al., 1992).

De parameters in verband met het glycolytisch potentieel voor elk diertype worden weergegeven in Tabel 5.4. Vleeskoeien en vleesstieren beschikken over een significant hoger glycolytisch potentieel t.o.v. de melkkoeien omdat zowel de melkzuurconcentratie als de concentratie van de gemeten glycolytische metabolieten (glycogeen, glucose en glucose-6-fosfaat) hoger zijn. Uit metingen uitgevoerd door Wulf et al. (2002) werd een kromlijng verband gevonden tussen het glycolytisch potentieel en de ultieme pH van rundvlees. Hieruit werd geconcludeerd wanneer het glycolytisch potentieel zich boven 100 µmol lactaat per gram vlees bevond, de ultieme pH nauwelijks beïnvloed werd. Indien het glycolytisch potentieel zich onder deze drempel bevond, werd een lager glycolytisch potentieel geassocieerd met een hogere ultieme pH. Tijdens onze proef hadden 8 melkkoeien een glycolytisch potentieel onder 100 µmol lactaat per gram. Daarvan hebben 6 melkkoeien een pH_{24u} boven 5,8, waarvan 3 melkkoeien zelfs een pH_{24u} boven 6 hebben. Volgens een studie van Young et al. (2004) blijft zeer weinig residueel glycogeen over wanneer de ultieme pH zich boven 5,7 bevindt. Volgens deze auteur is de snelheid van pH-daling niet afhankelijk van de initiële glycogeenconcentratie in de spieren. Naarmate de ultieme pH stijgt, zal de concentratie van residueel glycogeen en melkzuur dalen terwijl de concentratie van de glycolytische tussenproducten zoals glucose-6-fosfaat relatief constant bleven. Immonen en Puolanne (2000) vonden een lineair verband tussen de ultieme pH en de melkzuurconcentratie in rundvlees. Daarnaast werd nogmaals het

kromlijng verband tussen de ultieme pH en het glycolytisch potentieel gevonden. De vleeskoeien en vleesstieren tijdens onze proef beschikken over een voldoende groot glycolytisch potentieel na het slachten om de postmortale pH van het vlees te doen dalen tot de gewenste ultieme pH (5,5-5,6). De melkkoeien hebben een gemiddeld lager glycolytisch potentieel waardoor de postmortale glycolyse waarschijnlijk vroegtijdig werd stopgezet door een gebrek aan substraat. Dit verklaart mogelijks de gemiddeld hogere pH-waarden gemeten 24 uur na het slachten.

Het carnosinegehalte (Tabel 5.5) is significant hoger bij vleeskoeien en vleesstieren t.o.v. melkkoeien. Echter werd geen significant verschil gevonden voor het anserinegehalte tussen de verschillende diertypen. Bij runderen is het gehalte aan carnosine steeds hoger dan anserine (Boldyrev et al., 2013). Een hoog carnosinegehalte draagt bij aan de hoge buffercapaciteit dat geassocieerd wordt met spieren met een hoger aandeel aan glycolytische spiervezels (Cornet & Bousset, 1999; Purchas et al., 2004). Dit betekent dat de lange rugspier afkomstig van vleeskoeien en vleesstieren over een hogere structurele buffercapaciteit beschikt t.o.v. deze afkomstig van melkkoeien. Volgens een onderzoek door Mateescu et al. (2012) bij Angus runderen werd geen verschil gevonden tussen het carnosinegehalte van stieren en koeien. Dit was ook het geval voor anserine.

Als laatste worden in Tabel 5.6 de enzymactiviteiten van lactaatdehydrogenase, succinaatdehydrogenase en glutathionperoxidase per diertype weergegeven. Aan de hand van de enzymactiviteit van lactaatdehydrogenase wordt bevestigd dat de lange rugspier van vleeskoeien en vleesstieren over een groter glycolytisch metabolisme beschikken dan de lange rugspier van melkkoeien. Een grotere activiteit van lactaatdehydrogenase wordt namelijk geassocieerd met een groter aandeel snel glycolytische spiervezels (Listrat et al., 2016). Deze grotere activiteit weerspiegelt zich in de snellere pH-daling bij de vleeskoeien en vleesstieren. De activiteit van succinaatdehydrogenase bij melkkoeien is ongeveer vier keer zo hoog als deze van vleeskoeien en vleesstieren. Dit bevestigt dat de lange rugspier van melkkoeien meer oxidatieve en minder glycolytische spiervezels bevat t.o.v. de andere diertypen. Tussen vleeskoeien en vleesstieren werd geen significant verschil gevonden van de activiteit van zowel lactaat- als succinaatdehydrogenase.

Rundvlees is gevoelig voor oxidatie van lipiden, wat leidt tot kwaliteitsverlies en verlies van zowel voedingswaarde als veiligheid. Glutathion speelt een centrale rol in de verdediging van spiercellen tegen oxidatieve stress. Glutathionperoxidase is een enzym met antioxidatieve werking dat de reductie van lipiden- en waterstofperoxiden tot minder schadelijke hydroxiden katalyseert (Daun et al., 2001). In onze proef is de activiteit van glutathionperoxidase significant verschillend tussen vleesstieren en vleeskoeien. Daun et al. (2001) rapporteerde dat glycolytische spieren een lagere activiteit van glutathionperoxidase vertonen t.o.v. spieren met een groter aandeel aan oxidatieve spiervezels. Onze resultaten kunnen deze theorie niet bevestigen aangezien melkkoeien die een lage glycolytische spieractiviteit vertonen een lagere glutathionperoxidase-activiteit vertonen t.o.v. de vleesstieren die duidelijk over een hogere glycolytische spieractiviteit beschikken.

Tabel 5.4: Parameters in verband met het glycolytisch potentieel voor melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS)

	M (n=16)	VK (n=8)	VS (n=10)	Sign ¹
Glycogeen + Glucose + Glucose-6-fosfaat (µmol/g)	18,1 ± 17,5 ^b	30,4 ± 12,9 ^{ab}	34,0 ± 13,4 ^a	*
Melkzuur (µmol/g)	67,9 ± 13,2 ^b	104,2 ± 3,6 ^a	102,2 ± 5,3 ^a	***
Glycolytisch potentieel (µmol/g)	104,2 ± 42,3 ^b	165,0 ± 23,7 ^a	170,1 ± 28,8 ^a	***

¹ NS (p > 0,05), * (p ≤ 0,05), ** (p ≤ 0,01), *** (p ≤ 0,001)

^{abc} Verschillende letters betekenen significantie tussen de groepen (p ≤ 0,05)

Tabel 5.5: Carnosine- en anserinegehalte voor melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS)

	M (n=16)	VK (n=8)	VS (n=10)	Sign ¹
Carnosine (mg/g)	2,12 ± 0,65 ^b	3,35 ± 0,42 ^a	3,47 ± 0,41 ^a	***
Anserine (mg/g)	0,37 ± 0,23	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,06	NS

¹ NS (p > 0,05), * (p ≤ 0,05), ** (p ≤ 0,01), *** (p ≤ 0,001)

^{abc} Verschillende letters betekenen significantie tussen de groepen (p ≤ 0,05)

Tabel 5.6: Enzymactiviteit van lactaatdehydrogenase, succinaatdehydrogenase en glutathionperoxidase voor melkkoeien (M), vleeskoeien (VK) en vleesstieren (VS)

	M (n=15)	VK (n=8)	VS (n=9)	Sign ¹
Lactaatdehydrogenase (µmol/min/g)	141 ± 27 ^b	242 ± 13 ^a	255 ± 25 ^a	***
Succinaatdehydrogenase (nmol/min/g)	20,0 ± 6,8 ^a	5,3 ± 1,8 ^b	5,1 ± 0,7 ^b	***
Glutathionperoxidase (µmol/min/g)	1,43 ± 0,33 ^{ab}	1,11 ± 0,27 ^b	1,71 ± 0,24 ^a	**

¹ NS (p > 0,05), * (p ≤ 0,05), ** (p ≤ 0,01), *** (p ≤ 0,001)

^{abc} Verschillende letters betekenen significantie tussen de groepen (p ≤ 0,05)

6 ALGEMENE CONCLUSIE

Karkassen afkomstig van vleesvee en melkvee kunnen makkelijk visueel van elkaar onderscheiden worden. Runderen van het vleestype produceren zware karkassen met grote ronde spieren en een uitgesproken helder rode kleur van het vlees, terwijl melkkoeien dunne platte karkassen leveren met een duidelijk lager vleespercentage en visueel meer vetweefsel. Uit de resultaten van ons onderzoek bleek dat het verloop van de postmortale glycolyse tussen koeien en stieren van het Belgisch Witblauwras nauwelijks verschilt. Door o.a. een snellere temperatuuurdaling en spieren met een lagere glycolytische activiteit verloopt de pH-daling bij melkkoeien veel trager en wordt de ultieme pH op een later tijdstip bereikt t.o.v. vleesrunderen. Meerdere melkkoeien hadden zelfs relatief hoge pH-waarden 24 uur na slachten. Door een optimaal koelproces van de karkassen werd in dit slachthuis slechts bij enkele vleeskoeien- en stieren *heat shortening* vastgesteld in de lange rugspier. Echter de karkassen van melkkoeien werden onder dezelfde omstandigheden gekoeld waardoor een groot deel van deze karkassen voor een bepaalde periode *cold shortening* ondergingen. Een aangepast koelproces voor karkassen van melkkoeien zou mogelijks de incidentie van *cold shortening* kunnen terugdringen. Aangezien het glycolyseproces bij runderen aan een relatief traag tempo verloopt, wordt de ultieme pH van het vlees pas op een later tijdstip bereikt t.o.v. andere diersoorten zoals varkens. Daarom is het aangeraden om niet enkel de pH 24 uur na slachten te meten, maar ook de pH 48 uur na slachten om zeker te zijn dat het glycolyseproces werd beëindigd en de ultieme pH van het vlees werd bereikt. Het hoger glycolytisch potentieel, carnosinegehalte, activiteit van lactaatdehydrogenase bij vleeskoeien en vleesstieren t.o.v. melkkoeien kunnen in verband gebracht worden met de hogere glycolytische activiteit van de spieren bij deze diertypen. Melkkoeien beschikken over spieren met hogere gehalten aan spiervezels van het oxidatieve type, wat werd aangetoond a.d.h.v. de activiteit van succinaatdehydrogenase. Belangrijk om te onthouden dat er moet rekening gehouden worden met een mogelijke invloed van slachtdageffecten. Een toekomstige analyse waarbij meerdere karkassen van alle diertypen op dezelfde slachtdagen worden gemeten zou dit effect in kaart kunnen brengen. Niet enkel het effect van slachtdagen, maar ook andere factoren kunnen verder onderzocht worden zoals nieuwe bedwelmingsmethoden, aangepaste koelprocessen of maatregelen om stress voor het slachten te reduceren. Kortom, de verzamelde data en resultaten van deze masterproef kunnen een basis vormen voor verdere onderzoeken omtrent de postmortale glycolyse, het slachtproces en de vleeskwaliteit bij runderen.

BIBLIOGRAFIE

- Armstrong, C., & Staples, J. F. (2010). The role of succinate dehydrogenase and oxaloacetate in metabolic suppression during hibernation and arousal. *Journal of Comparative Physiology B*, 180(5), 775–783.
- Baker, J. S., McCormick, M. C., & Robergs, R. A. (2010). Interaction among Skeletal Muscle Metabolic Energy Systems during Intense Exercise. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2010.
- Bate-Smith, E., & Bendall, J. (1949). Factors determining the time course of rigor mortis. *The Journal of physiology*, 110(1–2), 47–65.
- Belgian Meat Office. (2019). *Feiten & Cijfers 2019*.
- Bendall, J. (1973). Postmortem changes in muscle. *The structure and function of muscle*, 2(Part 1), 243–309.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*.
- Blackmore, D. W., & Delany, M. W. (1988). Slaughter of stock. A practical review and guide. *Slaughter of stock. A practical review and guide*.
- Boldyrev, A. A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiological Reviews*, 93(4), 1803–1845.
- Clinquart, A., Hornick, J. L., Van Eenaeme, C., & Istasse, L. (1998). Influence du caractère culard sur la production et la qualité de la viande des bovins Blanc Bleu Belge. *Productions Animales* 4 (11), 285-297.(1998).
- Connet, R. J., & Sahlin, K. (1996). *Control of glycolysis and glycogen metabolism*.
- Cornet, M., & Bousset, J. (1999). Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: Differences between red and white muscles. *Meat Science*, 51(3), 215–219.
- Daly, C. C., Kallweit, E., & Ellendorf, F. (1988). Cortical function in cattle during slaughter: Conventional captive bolt stunning followed by exsanguination compared with shechita slaughter. *The Veterinary Record*, 122(14), 325–329.

- D'Astous-Pagé, J., Gariépy, C., Blouin, R., Cliche, S., Sullivan, B., Fortin, F., & Palin, M.-F. (2017). Carnosine content in the porcine longissimus thoracis muscle and its association with meat quality attributes and carnosine-related gene expression. *Meat Science*, *124*, 84–94.
- Daun, C., Johansson, M., Önning, G., & Åkesson, B. (2001). Glutathione peroxidase activity, tissue and soluble selenium content in beef and pork in relation to meat ageing and pig RN phenotype. *Food Chemistry*, *73*(3), 313–319.
- De Smet, S., Claeys, E., Balcaen, A., van den Brink, D., Seynaeve, M., & Demeyer, D. (2000). Effect of the double-muscling genotype on carcass and meat quality in Belgian Blue slaughter bulls. *Proceedings 46th International Congress of Meat Science and Technology, Buenos Aires, Vol. 1, 2000*, 70–71.
- De Smet, S., & Vossen, E. (2017). *Cursus Technologie van Dierlijke Producten, partim Vleeskennis*. Departement Landbouw & Visserij. (2014, oktober 9). *Karkasclassificatie*. Departement Landbouw & Visserij. URL: <https://lv.vlaanderen.be/nl/dier/runderen/karkasclassificatie>, geraadpleegd op 7/12/2019
- Departement Omgeving. (z.d.). *Verbod op onverdoofd slachten*.
- EFSA. (2004). Welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. *The EFSA Journal 2004*, *45*, 1–29.
- Egan, A., & Shay, B. (1998). *The effect of pH on the microbiology and storage life of vacuum packaged meat*. Proc. Australian Workshop on Dark-Cutting in Cattle and Sheep. AMLRDC, Sydney South. NSW.
- Everaert, I., Mooyaart, A., Baguet, A., Zutinic, A., Baelde, H., Achten, E., Taes, Y., De Heer, E., & Derave, W. (2011). Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNBP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino acids*, *40*(4), 1221–1229.
- Farouk, M. M. (2013). Advances in the industrial production of halal and kosher red meat. *Meat science*, *95*(4), 805–820.

- Ferguson, D. M., Bruce, H., Thompson, J., Egan, A., Perry, D., & Shorthose, W. (2001). Factors affecting beef palatability—Farmgate to chilled carcass. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(7), 879–891.
- Ferguson, D. M., & Gerrard, D. E. (2014). Regulation of post-mortem glycolysis in ruminant muscle. *Animal Production Science*, 54(4), 464–481.
- Ferguson, D. M., Shaw, F. D., & Stark, J. L. (2007). Effect of reduced lairage duration on beef quality. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47(7), 770–773.
- Ferguson, D. M., & Warner, R. D. (2008). Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Science*, 80(1), 12–19.
- Fiems, L., De Campeneere, S., Van Caelenbergh, W., De Boever, J., & Vanacker, J. (2003). Carcass and meat quality in double-muscléd Belgian Blue bulls and cows. *Meat Science*, 63(3), 345–352.
- Gauthier, G. F. (1969). On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 95(3), 462–482.
- Gilbert, K. V., Devine, C. E., Hand, R., & Ellery, S. (1984). Electrical stunning and stillness of lambs. *Meat Science*, 11(1), 45–58.
- Green, J. D., & Narahara, H. (1980). Assay of succinate dehydrogenase activity by the tetrazolium method: Evaluation of an improved technique in skeletal muscle fractions. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 28(5), 408–412.
- Gregory, N. G., & Grandin, T. (2007). *Animal welfare and meat production*. CABI.
- Hernández, P., Zomeno, L., Ariño, B., & Blasco, A. (2004). Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. *Meat Science*, 66(3), 525–529.
- Hochachka, P. (2003). Intracellular convection, homeostasis and metabolic regulation. *Journal of experimental biology*, 206(12), 2001–2009.
- Hochachka, P. W., & McClelland, G. B. (1997). Cellular metabolic homeostasis during large-scale change in ATP turnover rates in muscles. *Journal of experimental biology*, 200(2), 381–386.

- Holleben, K. v, Wenzlawowicz, M. V., Gregory, N., Anil, H., Velarde, A., Rodriguez, P., Cenci Goga, B., Catanese, B., & Lambooj, B. (2010). Report on good and adverse practices: Animal welfare concerns in relation to slaughter practices from the viewpoint of veterinary sciences. *Dialrel Deliverable*, 1.3.
- Honikel, K. O., Roncalés, P., & Hamm, R. (1983). The influence of temperature on shortening and rigor onset in beef muscle. *Meat Science*, 8(3), 221–241.
- HSA. (2013). *Captive-bolt stunning*. URL: <https://www.hsa.org.uk/methods/captive-bolt-stunning>, geraadpleegd op 15/11/2019
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1), 194–204.
- Immonen, K., & Puolanne, E. (2000). Variation of residual glycogen-glucose concentration at ultimate pH values below 5.75. *Meat Science*, 55(3), 279–283.
- Juel, C., Klarskov, C., Nielsen, J. J., Krstrup, P., Mohr, M., & Bangsbo, J. (2004). Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H⁺ release from human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 286(2), E245–E251.
- Kastenschmidt, L., Hoekstra, W., & Briskey, E. (1968). Glycolytic intermediates and co-factors in “fast-” and “slow-glycolyzing” muscles of the pig. *Journal of Food Science*, 33(2), 151–158.
- Kobe, R., Ishihara, Y., Takano, J., & Kitami, H. (2011). Simultaneous determination of anserine and carnosine in chicken meat by hydrophilic interaction chromatography on an aminopropyl bonded silica gel column. *BUNSEKI KAGAKU*, 60(11), 859–863.
- Kuffi, K. D., Lescouhier, S., Nicolai, B. M., De Smet, S., Geeraerd, A., & Verboven, P. (2018). Modelling postmortem evolution of pH in beef M. biceps femoris under two different cooling regimes. *Journal of food science and technology*, 55(1), 233–243.
- Kylä-Puhju, M., Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Activity of porcine muscle glycogen debranching enzyme in relation to pH and temperature. *Meat science*, 69(1), 143–149.
- Lacourt, A., & Tarrant, P. V. (1985). Glycogen depletion patterns in myofibres of cattle during stress. *Meat Science*, 15(2), 85–100.

- Ledward, D., Johnston, D., & Knight, M. (1992). *The chemistry of muscle-based foods*. Royal Society of Chemistry.
- Lefaucheur, L. (2010). A second look into fibre typing–Relation to meat quality. *Meat science*, *84*(2), 257–270.
- Lefaucheur, L., & Gerrard, D. (2000). Muscle fiber plasticity in farm mammals. *J. Anim. Sci*, *77*(1), 19.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1993). *Principles of biochemistry*. Worth Publishers New York.
- Lindahl, G., Lundström, K., & Tornberg, E. (2001). Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. *Meat Science*, *59*(2), 141–151.
- Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Picard, B., & Bugeon, J. (2016). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *The Scientific World Journal*, 2016.
- Llonch, P., Rodríguez, P., Casal, N., Carreras, R., Muñoz, I., Dalmau, A., & Velarde, A. (2015). Electrical stunning effectiveness with current levels lower than 1 A in lambs and kid goats. *Research in veterinary science*, *98*, 154–161.
- Mateescu, R., Garmyn, A., O'neil, M., Tait Jr, R. G., Abuzaid, A., Mayes, M. S., Garrick, D. J., Van Eenennaam, A., VanOverbeke, D., & Hilton, G. (2012). Genetic parameters for carnitine, creatine, creatinine, carnosine, and anserine concentration in longissimus muscle and their association with palatability traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, *90*(12), 4248–4255.
- McLean, D., Meers, L., Ralph, J., Owen, J. S., & Small, A. (2017). Development of a microwave energy delivery system for reversible stunning of cattle. *Research in Veterinary Science*, *112*, 13–17.
- Meinke, M. H., & Edstrom, R. D. (1991). Muscle glycogenolysis. Regulation of the cyclic interconversion of phosphorylase a and phosphorylase b. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(4), 2259–2266.

- Monin, G. (1981). Muscle metabolic type and the DFD condition. In *The problem of dark-cutting in beef* (pp. 63–85). Springer.
- Monin, G., & Sellier, P. (1985). Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Science*, *13*(1), 49–63.
- Nantier, G., & Braam, M. (2006). *Dubbel gespierd: Management en fokkerij van het Belgisch-witblauwras in Vlaanderen en Nederland*.
- O'Halloran, G., Troy, D., & Buckley, D. (1997). The relationship between early post-mortem pH and the tenderisation of beef muscles. *Meat science*, *45*(2), 239–251.
- Oliveira, S. E. O., Gregory, N. G., Dalla Costa, F. A., Gibson, T. J., Dalla Costa, O. A., & da Costa, M. J. R. P. (2018). Effectiveness of pneumatically powered penetrating and non-penetrating captive bolts in stunning cattle. *Meat science*, *140*, 9–13.
- Page, J. K., Wulf, D. M., & Schwotzer, T. R. (2001). A survey of beef muscle color and pH. *Journal of animal science*, *79*(3), 678–687.
- Pastsart, U., De Boever, M., Claeys, E., & De Smet, S. (2013). Effect of muscle and post-mortem rate of pH and temperature fall on antioxidant enzyme activities in beef. *Meat science*, *93*(3), 681–686.
- Pearson, A. M., & Young, R. B. (1989). *Muscle and Meat Biochemistry*. Academic Press.
- Phypers, B., & Pierce, J. T. (2006). Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, *6*(3), 128–132.
- Ponnampalam, E. N., Butler, K. L., Burnett, V. F., McDonagh, M. B., Jacobs, J. L., & Hopkins, D. L. (2013). *Aged vacuum packaged lamb cuts are less brown than fresh muscle cuts under simulated retail display*.
- Ponnampalam, E. N., Hopkins, D. L., Bruce, H., Li, D., Baldi, G., & Bekhit, A. E. (2017). Causes and Contributing Factors to “Dark Cutting” Meat: Current Trends and Future Directions: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(3), 400–430.
- Pösö, A. R., & Puolanne, E. (2005). Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*, *70*(3), 423–434.

- Purchas, R., Rutherford, S., Pearce, P., Vather, R., & Wilkinson, B. (2004). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine. *Meat Science*, 66(3), 629–637.
- Regenstein, J. M., Chaudry, M. M., & Regenstein, C. E. (2003). The kosher and halal food laws. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 111–127.
- Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., & Tagliabracchi, V. S. (2012). Glycogen and its metabolism: Some new developments and old themes. *Biochemical Journal*, 441(3), 763–
- Robergs, R. A., Ghiasvand, F., & Parker, D. (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(3), R502–R516.
- Robins, A., Pleiter, H., Latter, M., & Phillips, C. J. C. (2014). The efficacy of pulsed ultrahigh current for the stunning of cattle prior to slaughter. *Meat science*, 96(3), 1201–1209.
- Scheffler, T. L., Park, S., & Gerrard, D. E. (2011). Lessons to learn about postmortem metabolism using the AMPK γ 3R200Q mutation in the pig. *Meat Science*, 89(3), 244–250.
- Schwägele, F., & Honikel, K. (1988). Studies in postmortem metabolism of PSE-prone pork muscles. In *Proc. 34th Int. Cong. Meat Sci. And Technol.* (pp. 26–28).
- Shen, Q. W., Jones, C. S., Kalchayanand, N., Zhu, M. J., & Du, M. (2005). Effect of dietary α -lipoic acid on growth, body composition, muscle pH, and AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice. *Journal of Animal Science*, 83(11), 2611–2617.
- Shen, Q. W., Means, W. J., Thompson, S. A., Underwood, K. R., Zhu, M. J., McCormick, R. J., Ford, S. P., & Du, M. (2006). Pre-slaughter transport, AMP-activated protein kinase, glycolysis, and quality of pork loin. *Meat Science*, 74(2), 388–395.
- Simmons, N. J., & Daly, C. C. (2004). Electrical stunning of sheep: Principles and auditing methods. In *Meat New Zealand Milestone Report E24*. Meat New Zealand Wellington, New Zealand.
- Small, A., Lea, J., Niemeyer, D., Hughes, J., McLean, D., McLean, J., & Ralph, J. (2019). Development of a microwave stunning system for cattle 2: Preliminary observations on behavioural responses and EEG. *Research in Veterinary Science*, 122, 72–80.
- Stanley, W. C., & Connett, R. J. (1991). Regulation of muscle carbohydrate metabolism during exercise. *The FASEB Journal*, 5(8), 2155–2159.

- Statbel. (2018). *Kerncijfers landbouw 2018. Belgische landbouw in cijfers*.
- Steen, D., Claeys, E., Uytterhaegen, L., De Smet, S., & Demeyer, D. (1997). Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscled beef. *Meat Science*, *45*(3), 307–319.
- Terlouw, C., Bourguet, C., & Deiss, V. (2016). Consciousness, unconsciousness and death in the context of slaughter. Part II. Evaluation methods. *Meat science*, *118*, 147–156.
- Thompson, J. (2002). Managing meat tenderness. *Meat Science*, *62*(3), 295–308.
- VLAM Marketingdienst. (2019). *Zuivelbarometer 2019*.
- Warner, R. D., Ferguson, Cottrell, J. J., & Knee, B. W. (2007). Acute stress induced by the preslaughter use of electric prodders causes tougher beef meat. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *47*(7), 782–788.
- Weaver, A. L., & Wotton, S. B. (2009). The Jarvis Beef Stunner: Effects of a prototype chest electrode. *Meat Science*, *81*(1), 51–56.
- Wicks, J., Beline, M., Gomez, J. F. M., Luzardo, S., Silva, S. L., & Gerrard, D. (2019). Muscle Energy Metabolism, Growth, and Meat Quality in Beef Cattle. *Agriculture*, *9*(9), 1–10.
- Winder, W. W., & Thomson, D. M. (2007). Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *47*(3), 332–347.
- Wotton, S. B., Gregory, N. G., Whittington, P. E., & Parkman, I. D. (2000). Electrical stunning of cattle. *Veterinary Record*, *147*(24), 681–684.
- Wulf, D. M., Emmett, R. S., Leheska, J. M., & Moeller, S. J. (2002). Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. *Journal of Animal Science*, *80*(7), 1895–1903.
- Young, O. A., West, J., Hart, A. L., & van Otterdijk, F. F. H. (2004). A method for early determination of meat ultimate pH. *Meat Science*, *66*(2), 493–498.

BIJLAGE

Tabel A.1: Aantal runderen volgens karkasindeling per diertype tijdens proef 1

	M (n=93)	VK (n=34)	VS (n=77)
DP1	14		
DP2	48		
DO1	2		
DO2	29		
DE2		3	
DS2		31	
AS2			62
BS2			15

Tabel A.2: Aantal runderen volgens land van herkomst per diertype tijdens proef 1

	M (n=93)	VK (n=34)	VS (n=77)
BE	76	34	77
FR	14		
DE	3		

Tabel A.3: Aantal runderen volgens karkasindeling per diertype tijdens proef 2

	M (n=16)	VK (n=8)	VS (n=10)
DP1	2		
DP2	14		
DE2		1	
DS2		7	
AS2			10

