

Enzymy proteolityczne z rodziny kalpain a jakość mięsa drobiowego

Joanna Doktor

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Genetyki i Hodowli Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Selekcja prowadzona na drobiu w celu uzyskania wysokich przyrostów masy ciała w stosunkowo krótkim czasie oraz osiągnięcia lepszego umięśnienia ptaków wywarła niekorzystny wpływ na uzyskiwany surowiec. Pogorszenie technologicznej i sensorycznej jakości mięsa ogranicza jego wykorzystanie w przetwórstwie.

W ocenie konsumenckiej jakość mięsa określają m.in.: barwa, zawartość tłuszczu, zapach oraz konsystencja, jednak większość konsumentów uważa kruchość za najważniejszą cechę jakościową. W celu poprawy kruchości mięsa konieczne jest przechowywanie go w temperaturze 3–5°C przez wymagany okres czasu, zależny od gatunku zwierzęcia. Podczas dojrzewania mięsa wzrasta jego kruchość oraz wykształcają się pożądane cechy smakowitości. Siła cięcia mięsa, która jest miernikiem kruchości, jest ściśle skorelowana z gęstością i średnicą włókien mięśniowych (Gwartney i in., 1992). Kruchość jest kontrolowana przez mechanizmy fizykochemiczne i biochemiczne, zachodzące głównie pośmiertnie w strukturach miofibrylarnych tkanki mięśniowej (Lee i in., 2008).

W obrębie tkanki mięśniowej, w miofibrylach (głównie na linii Z) zlokalizowane są kalpainy (EC 3.4.22.17). Są to wewnątrzkomórkowe proteazy cysteinowe, których aktywność jest zależna od stężenia jonów Ca^{2+} oraz ich specyficznego inhibitora – kalpastatyny (Suzuki i in., 1995). System kalpainowy jest bardzo wrażliwy na wahania poziomu jonów wapnia, pH i temperatury. Kalpainy wykazują zdolność degradowania białek cytoszkieletu (tropomiozyny, troponiny T, I, białka C, desminy, titiny, nebuliny, winkuliny, laminy, spektryny), włókien

mięśniowych, białek związanych z błoną komórkową, czynników wzrostu i receptorów hormonów sterydowych, wielu enzymów oraz kalpastatyny. W wyniku tak szerokiego oddziaływania kalpainy pełnią znaczącą rolę podczas fuzji mioblastów, proliferacji, wzrostu oraz migracji komórek (Goll i in., 1998; Carragher i Frame, 2002). Badania dowodzą, że kalpainowy system proteolityczny jest odpowiedzialny za proces kruszenia mięsa, na co dowodem może być m.in. przyspieszenie proteolizy *post mortem* po inkubacji kawałków mięśnia w roztworze jonów wapnia i zatrzymanie proteolizy po inkubacji z chelatorami jonów wapnia (Koochmariaie, 1992).

W mięśniach szkieletowych ssaków wyróżnia się 3 typy kalpain: tkankowo-specyficzną kalpainę p94 (nazwaną kalpainą 3) oraz kalpainy: 1 i 2, które oznaczają się również μ - i m-kalpainami w odniesieniu do koncentracji jonów wapnia niezbędnej do ich aktywacji (Lee i in., 2008). Aktywacja kalpainy 1 zachodzi przy stężeniu jonów wapnia wynoszącym 10–40 μM , natomiast kalpaina 2 wymaga do tego celu 1–2 mM Ca^{2+} .

W mięśniach *post mortem* kalpaina 1 jest autolizowana w momencie uwolnienia wapnia. Z tego względu przypuszcza się, że poubojowy rozkład proteolityczny białek cytoszkieletowych włókien mięśniowych związany jest głównie z jej aktywnością. Kalpaina 2 pozostaje nienaruszona przez kilka dni po uboju, gdyż wymaga wysokiej koncentracji jonów wapnia. Aktywność kalpain może się różnić w zależności od gatunku zwierząt, rodzaju mięśnia, czynników wpływających na mięso w pierwszych godzinach po uboju lub podczas jego przetwarzania (Nowak, 2005).

Sorimachi i in. (1995) zidentyfikowali 4 mRNA kodujące kalpainy w mięśniach piersiowych kurcząt: kalpainę 1 (μ -kalpaina), kalpainę 2 (m-kalpaina), kalpainę 3 (p94) oraz czwartą formę nazwaną μ /m-kalpaina, występującą wyłącznie w mięśniach drobiu. Ta ostatnia jest wrażliwa na pośrednią koncentrację wapnia, jaka jest potrzebna do aktywacji m- i μ -kalpain występujących u ssaków.

U ptaków kalpainy są bardziej wrażliwe na stężenie jonów wapnia niż kalpainy występujące w mięśniach ssaków, dlatego też mogą odgrywać szczególną rolę w procesie pośmiertnego dojrzewania mięsa drobiowego. Badania przeprowadzone przez Lee i in. (2008) wykazały, że 12 h *post mortem* aktywność kalpainy 1 (μ -kalpainy) w mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów jest ledwo wykrywalna, co może wyjaśniać szybkość kruszenia mięsa u ptaków. Według Iliian i in. (2001), kalpaina 1 i kalpaina 3 pełnią zasadniczą rolę w procesie kruszenia mięsa.

Sekwencje genów kalpainy 1 (*CAPN1*) i kalpainy 2 (*CAPN2*) zostały dokładnie poznane i przeanalizowane u gryzoni, bydła, drobiu i świń. U bydła wykazano liczne polimorfizmy w *loci* tych genów oraz ich związek z cechami umięśnienia tuszy i jakością mięsa. Badania Page i in. (2002) potwierdziły istotną korelację między kruchością mięsa wołowego a zidentyfikowanymi polimorfizmami w genie *CAPN1*. Dlatego też, u bydła geny kalpain oznaczono mianem markera genetycznego, pozwalającego zidentyfikować bydło mięsne, które będzie charakteryzowało się wysoką kruchością mięsa (Casas i in., 2006). Selekcja bydła, prowadzona w kierunku wysokiej aktywności kalpainy 1 w mięśniach szkieletowych, może być uznana za metodę hodowlaną produkcji bydła rzeźnego, charakteryzującego się szybkim procesem dojrzewania poubojowego i wysoką kruchością mięsa. Istnieje również szereg zaawansowanych badań nad genami kodującymi kalpainy u trzody chlewnej (Smith i in., 2001; Yang i in., 2008, 2009).

Dzięki dynamicznemu rozwojowi metod genetyki molekularnej stało się możliwe poznanie lokalizacji, struktury oraz funkcjonowania

genów odpowiedzialnych za kształtowanie cech ilościowych. Zanim jednak określony gen zostanie uznany za gen główny, funkcjonuje pod mianem genu kandydata dla danej cechy ilościowej (Terman i in., 2008).

Okumura i in. (2005) zidentyfikowali u kurcząt polimorfizmy 4 genów kodujących kalpainy (gen μ -kalpainy *CAPN1*, gen m-kalpainy *CAPN2*, gen kalpainy p94 *CAPN3* i gen μ /m-kalpainy *CAPN1.5*). Gen *CAPN1* u kurcząt jest zlokalizowany na chromosomie 3. i zawiera 21 egzonów i 20 intronów, natomiast gen *CAPN3* jest zlokalizowany u kurcząt na 5. chromosomie i zawiera 24 egzony. Kalpaina 3 jest zlokalizowana głównie w mięśniach szkieletowych, a jej aktywność wymaga bardzo małej koncentracji wapnia (Taveau i in., 2003). Gen *CAPN3* wiąże się głównie z białkiem titiną na linii N2, w regionie, gdzie proteoliza została powiązana z pośmiertnym kruszeniem mięsa.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Zhang i in. (2008) wskazują, że gen *CAPN1* może być głównym genem oddziałującym na cechy jakości mięsa kurcząt lub może być z nim powiązany. Ten sam autor wskazuje również na powiązanie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w genie kalpainy 3 (*CAPN3*) z cechami tuszek u kurcząt (Zhang i in., 2009). Dostępne wyniki badań na temat genów *CAPN1* i *CAPN3* u drobiu dotyczą rodzimych ras lub komercyjnych linii dostępnych w Chinach. Autorzy wskazują na potrzebę przeprowadzenia badań nad wpływem polimorfizmów w genach *CAPN1* i *CAPN3* w populacjach drobiu o różnym pochodzeniu. Wykrycie ewentualnych mutacji w genach kodujących kalpainy oraz ich powiązanie z profilem histochemicznym mięśni, jakością mięsa kurcząt brojlerów, a także ich potwierdzenie w populacjach charakteryzujących się różnym tempem wzrostu, mogą stanowić podstawę do dalszych prac w kierunku wytypowania markerów genetycznych. Markery te mogłyby być w przyszłości stosowane m.in. w uzyskaniu kurcząt bardziej jednorodnych pod względem jakości uzyskiwanego surowca, co jest niezmiernie ważne, głównie w przetwórstwie.

Literatura

- Carragher N.O., Frame M.C. (2002). Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int. J. Bioch. Cell Biol.*, 34 (12): 1539–1543.
- Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase C.C., Johnson D.D., Smith T.P.L. (2006). Effect of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.*, 84 (3): 520–525.
- Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Ouali A. (1998). The calpain system and skeletal muscle growth. *Can. J. Anim. Sci.*, 78 (4): 503–512.
- Gwartney B.L., Jones S.J., Calkins C.R. (1992). Response time of broiler chickens to cimaterol: meat tenderness, muscle composition, fiber size, and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.*, 70 (7): 2144–2150.
- Ilian M.A., Morton J.D., Kent M.P., Le Couteur C.E., Hickford J., Cowley R., Bickerstaffe R. (2001). Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *J. Anim. Sci.*, 79 (1): 122–132.
- Koohmaraie M. (1992). The role of Ca^{2+} dependent proteinases in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74 (3): 239–245.
- Lee H.L., Sante-Lhoutellier V., Vigouroux S., Briand Y., Briand M. (2008). Role of calpains in postmortem proteolysis in chicken muscle. *Poultry Sci.*, 87 (10): 2126–2132.
- Nowak M. (2005). Rola kalpain w procesie kruszenia mięsa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1 (42): 5–17.
- Okumura F., Shimogiri T., Shinbo Y., Yoshizawa K., Kawabe K., Mannen H., Okamoto S., Cheng H.H., Maeda Y. (2005). Linkage mapping of four chicken calpain genes. *Anim. Sci. J.*, 76 (2): 121–127.
- Page B.T., Casas E., Heaton M.P., Cullen N.G., Hyndman D.L., Morris C.A., Crawford A.M., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Keele J.W., Smith T.P.L. (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.*, 80 (12): 3077–308.
- Smith T.P., Simmen F.A., Zhao G., Vallet J.L. (2001). Rapid communication: Nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA. *J. Anim. Sci.*, 79 (2): 552–553.
- Sorimachi H., Tsukahara T., Okada-Ban M., Sugita H., Ishiura S., Suzuki K. (1995). Identification of a third ubiquitous calpain species – Chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1261 (3): 381–393.
- Suzuki K., Sorimachi H., Yoshizawa T., Kinbara K., Ishiura S. (1995). Calpain: novel family members, activation, and physiological function. *Biol. Chem.*, 376 (9): 523–529.
- Taveau M., Bourg M., Sillon G., Roudaut C., Bartoli M., Richard I. (2003). Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Moll. Cell Biol.*, 22 (24): 9127–9135.
- Terman A., Urbański P., Kmiec M. (2008). Chromosom 4 związany z QTL jakości tuszy u świń. *Med. Wet.*, 64 (3): 269–271.
- Yang X., Liu D., Yu H., Guo L., Liu H. (2008). Cloning, expression, and polymorphism of the porcine calpain 10 gene. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 40 (4): 356–363.
- Yang X., Guo L., Zhai C., Yu H., Liu H., Liu D. (2009). Expression, characterization, and variation of the porcine calpain 7 gene. *Acta Agr. Scand., Sect. A – Anim. Sci.*, 59 (4): 204–210.
- Zhang Z.R., Liu Y.P., Jiang X., Du H.R., Zhu Q. (2008). Study on association of single nucleotide polymorphism of *CAPN1* gene with muscle fibre and carcass traits in quality chicken population. *J. Anim. Breed. Genet.*, 125 (4): 258–264.
- Zhang Z.R., Liu Y.P., Yao Y.G., Jiang X.S., Du H.R., Zhu Q. (2009). Identification and association of single nucleotide polymorphisms in calpain3 (*CAPN3*) gene with carcass traits in chickens. *BMC Genetics*, 10: p. 10.

PROTEOLYTIC ENZYMES OF THE CALPAIN FAMILY AND POULTRY MEAT QUALITY

Summary

Calpains are candidate genetic markers responsible for poultry meat quality. Calpains are believed to play a special role in postmortem meat aging. Research with other species of farm animals has shown that the calpain proteolytic system is responsible for tenderization of meat. Few studies have been made to investigate the polymorphisms of calpain gene in poultry, which confirms that such research should be performed, especially on commercial fast- and slow-growing lines of broiler chickens raised in Poland. The detection of possible mutations in calpain-coding genes, their associations with meat quality and their presence in populations characterized by different growth rates, could provide a basis for continuing research to determine genetic markers that could be used to obtain more uniform chickens in terms of raw meat quality, which is of crucial importance in meat processing.



fot. B. Borys