

MARZENA NOWAK

ROLA KALPAIN W PROCESIE KRUSZENIA MIĘSA

Streszczenie

Kruchość mięsa oraz czynniki na nią wpływające od dawna są przedmiotem badań. Istnieje kilka teorii wyjaśniających proces kruszenia mięsa. Za najbardziej prawdopodobną uznana została kalpainowa teoria tenderyzacji. Kalpainsy spełniają podstawowe kryteria stawiane czynnikom wpływającym na proces kruszenia mięsa. Enzymy te są obecne w komórce mięśniowej, a w doświadczeniach przeprowadzanych *in vitro* prowadzą do tych samych produktów degradacji białek, jakie wykrywane są w mięsie po okresie dojrzewania. Mają one dostęp do miofibryli w komórce. Aktywność kalpain oraz stosunek aktywności kalpainsy do aktywności kalpastatyny są skorelowane z twardością mięsa. Im wyższa jest aktywność kalpain i im wyższy stosunek kalpaina/kalpastatyna, tym bardziej kruche mięso otrzymuje się. Warunki w jakich enzymy te wykazują aktywność są zbliżone do warunków panujących w tkance mięśniowej po śmierci zwierzęcia. Na aktywność kalpain w mięsie działają zarówno czynniki przyżyciowe, w tym genetyczne, jak i pośmiertne.

Mimo, że mechanizm działania kalpain nie jest całkowicie wyjaśniony, na podstawie wyników licznych doświadczeń można stwierdzić, że kalpainsy pełnią ważną rolę w procesie tenderyzacji mięsa.

W artykule scharakteryzowano kalpainsy i opisano niektóre z czynników wpływających na ich aktywność.

Słowa kluczowe: kalpainsy, kruszenie mięsa (tenderyzacja).

Wprowadzenie

Większość konsumentów uważa kruchość za najważniejszą cechę jakościową mięsa. Jednak wyprodukowanie mięsa kruchego, o określonym standardzie, jest bardzo trudne ze względu na niewyjaśniony dotąd mechanizm jego kruszenia [30]. Konieczne jest więc zrozumienie tego mechanizmu, aby można było sterować procesem kruszenia [29].

Istnieje duże zróżnicowanie jakości mięsa zarówno pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt, jak i w obrębie tego samego gatunku. Jakość mięsa jest zależna także od warunków środowiska i od płci zwierzęcia [33].

W celu poprawy kruchości konieczne jest przechowywanie mięsa *post mortem* przez okres od kilkunastu godzin do kilku tygodni w temperaturze 3–5°C. Taki okres nazywany jest dojrzewaniem. Podczas dojrzewania zachodzi proces tenderyzacji, który zależy od warunków chłodzenia, rodzaju mięśnia oraz gatunku zwierzęcia. Prawdopodobnie różnice te są spowodowane działalnością kalpain w mięsie. Mogą być także wynikiem stopnia zeszywnienia mięśnia po śmierci zwierzęcia, które przebiega znacznie szybciej w mięsie drobiowym niż w wołowinie [43]. Czas dojrzewania wołowiny wynosi 2–4 tygodni, wieprzowiny 6–10 dni, a drobiu 0,5–1 dnia [46, 55].

Teorie dotyczące procesu kruszenia mięsa

Obecnie istnieją dwie główne teorie dotyczące procesu tenderyzacji mięsa. Jedną z nich jest „wapniowa teoria tenderyzacji” proponowana przez Takahashiego [55]. Według tej teorii jony wapnia bezpośrednio działające na włókna mięśniowe przyczyniają się do kruszenia mięsa podczas dojrzewania poubojowego. Osłabienie linii Z następuje w wyniku odłączania się fosfolipidów pod wpływem przyłączających się do nich jonów wapnia. Rozpuszczalność fosfolipidów zmienia się pod wpływem tych jonów. Według teorii Takahashiego [55] rozpad titiny zachodzi nawet wtedy, gdy w roztworze znajdują się jednocześnie jony wapnia i inhibitory proteaz. Niezbędna ilość wapnia w komórce, konieczna do spowodowania widocznych zmian w kruchości mięsa, wynosi 0,1 mM. Zmiany te nie są zależne od pH mięśnia, ani od temperatury [53]. Jednak wielu naukowców twierdzi, że za proces kruszenia mięsa odpowiedzialny jest, zależny od stężenia jonów wapnia, system kalpainowy [7, 29, 42]. Kalpains uznano za jeden z możliwych czynników przyczyniających się do kruszenia mięsa, ponieważ: są umieszczone w obrębie komórek tkanki mięśniowej, mają dostęp do substratu, mają zdolność hydrolizowania białek degradowanych podczas dojrzewania mięsa *post mortem*. Przeprowadzono wiele badań, które dowiodły, że kalpainowy system proteolityczny jest odpowiedzialny za proces tenderyzacji. Niektóre z dowodów to: przyspieszenie proteolizy *post mortem* po inkubacji kawałków mięśnia w roztworze jonów wapnia i zatrzymanie proteolizy po inkubacji z chelatorami jonów wapnia [28], blokowanie proteolizy i tenderyzacji mięsa po wstrzyknięciu chlorku cynku, potencjalnego inhibitora kalpain [58].

Do niedawna istniała teoria, że do tenderyzacji mogą przyczyniać się również katepsyny – proteolityczne enzymy lizosomalne. Powodem odrzucenia tej teorii jest fakt, że mają one możliwość rozkładu miozyny, aktyny i α -aktyniny [59], podczas gdy w czasie normalnego dojrzewania mięsa niewielka ilość tych białek jest degradowana [42]. Ponadto, są one umieszczone w lizosomach i nie ma dowodu na to, że po śmierci zwierzęcia następuje ich uwolnienie [30]. Innym systemem funkcjonującym w komórce jest multikatalityczny kompleks proteolityczny (MCP). Jednak kompleks ten działa na białka, które nie są rozkładane podczas procesu dojrzewania. Dlatego też enzymów tego kompleksu nie uznano za przyczyniających się do tenderyzacji mięsa [30].

Charakterystyka kalpain

Kalpainy (E C 3.4.22.17) są wewnątrzkomórkowymi, aktywowanymi przez jony wapnia neutralnymi proteinazami i zaklasyfikowane zostały do grupy cysteinowych endopeptydaz. Znajdują się one we wszystkich komórkach kręgowców; w mięśniach występują w cytoplazmie [8]. Głównymi komponentami systemu kalpainowego są: μ -kalpaina, m-kalpaina, μ /m kalpaina oraz ich specyficzny inhibitor kalpastatyna. Kalpastatyna hamuje tylko aktywność kalpain, nie działa na inne proteazy cysteinowe. Może ona występować w kilku różnych izoformach, które mają jedną, trzy lub cztery domeny i różne N-terminalne sekwencje [15]. Jest to białko o masie cząsteczkowej $60 \cdot 10^3$ - $70 \cdot 10^3$ Da. Ma ona cztery miejsca inhibitorowe o powtarzającej się strukturze 130-aminokwasowej. Wiąże się ona z kalpainą w obecności jonów wapnia. Kalpastatyna jest również substratem kalpainskiej. Powstające w wyniku hydrolizy peptydy mają nadal zdolność hamowania aktywności kalpainskiej [22]. Istnieje także tzw. kalpaina 3 (p94), która przez długi czas nie mogła być analizowana ze względu na szybką autolizę w warunkach *in vitro*, a także dlatego, że jest związana z titiną, która prawdopodobnie reguluje jej aktywność [48]. Opinie dotyczące roli kalpainskiej p94 w procesie tenderyzacji nie są jednoznaczne. Parr i wsp. [40] nie zauważyli wpływu kalpainskiej p94 na kruchość mięsa. Natomiast Illian i wsp. [21] stwierdzili wyraźny związek pomiędzy zawartością kalpainskiej 3 a względną szybkością tenderyzacji. Stwierdzili oni ważną rolę μ -kalpainskiej i kalpainskiej 3 w procesie tenderyzacji mięsa.

Odkryto także inne specyficzne kalpainskie tkankowe (nCl-2, n-Cl-3, n-Cl-4...) i nietypowe, jak: kalpainskie 5, 6, 10. Prawdopodobnie istnieje jeszcze wiele innych niewyizolowanych dotychczas kalpain [15, 35, 49, 51]. Nietypowe kalpainskie odkryto głównie w takich organizmach, jak: insekty, drożdże, grzyby. Ich nietypowość polega na tym, że mają one domenę o masie około $30 \cdot 10^3$ Da, podobną bardziej do dużej podjednostki kalpain ssaków niż do proteinaz, takich jak papaina czy katepsyny, a pozostałe domeny są prawdopodobnie odpowiedzialne za specyficzne funkcje, jakie mogą spełniać [49]. Najnowszym odkryciem jest kalpaina C, która została wyodrębniona podczas badań *Drosophila melanogaster* i która prawdopodobnie jest nieaktywna katalitycznie [50].

Najbardziej znanymi i najczęściej badanymi są μ - i m-kalpaina. Nazwy μ - i m-kalpainskie pochodzą od stężenia jonów wapnia wymaganego do ich aktywacji; μ -kalpaina wymaga 3–50 μ M, a m-kalpaina 0,4–0,8 mM wapnia do osiągnięcia połowy aktywności maksymalnej. Stężenie jonów wapnia w żywym mięśniach wynosi 0,2 μ M [32] i jest to poziom dużo niższy niż ten wymagany do aktywacji μ -kalpain. Jednak po uboju stężenie wolnego wapnia w komórce zwiększa się i wynosi 100 μ M [24]. W celu zapoczątkowania procesu autolizy *in vitro* (czyli do uaktywnienia) konieczne jest stężenie jonów wapnia wynoszące 100 μ M, ale poziom ten zmniejsza obecność fosfolipidów lub membran plazmowych [6]. Hopkins i Thompson [17] wykazali, że

stężenie jonów wapnia po uboju, w momencie osiągnięcia pH 5,5, w owczych mięśniach *m. longissimus lumborum* i *m. longissimus thoracis* wynosiło 110 μM , co jest wartością wystarczającą do aktywacji μ -kalpiny.

Obie kalpiny (μ - i m-kalpaina) zostały oczyszczone i wyodrębnione z wielu źródeł, chociaż żadna nie została wykryta. Są to heterodimery składające się z dużej podjednostki ($80 \cdot 10^3$ Da, jednostka regulacyjna) i małej podjednostki ($30 \cdot 10^3$ Da). Duża podjednostka μ -kalpiny jest w 50% homologiczna z dużą podjednostką m-kalpiny, natomiast małe podjednostki są identyczne u obu kalpain [8, 27]. Podjednostka μ - i m-kalpiny o wielkości $80 \cdot 10^3$ Da może być podzielona na cztery domeny. Domena I jest krótkim fragmentem wprowadzającym i działa jako inhibitor aktywności proteolitycznej. Domena II reprezentuje odległą, podobną do papainy część typową dla proteinaz cysteinowych. Domena III nie jest homologiczna z żadnym innym białkiem. Analiza strukturalna wskazuje, że domena III fizycznie asocjuje się z domeną II. Domena IV wiąże jony wapnia i została wyodrębniona jako rozpoznająca substrat, ma ona charakterystyczny motyw strukturalny, powtórzony czterokrotnie a nazywany „EF-hands”. Pary motywów strukturalnych „EF-hands” tworzą globularne domeny, które mają wspólny hydrofobowy rdzeń, a które są połączone długim odcinkiem α -helikalnym. Mała podjednostka składa się z domen V i VI. Domena V zawiera dużą liczbę reszt glicynowych i reszt aminokwasów hydrofobowych. Domena VI jest homologiczna z domeną IV, ma cztery rejony wiążące jony Ca^{2+} . Obie podjednostki połączone są wiązaniem niekowalencyjnym [2, 3, 23].

Mechanizmy aktywacji kalpain

Aktywacja przez jony wapnia, przyłączające się do końca każdej podjednostki, powoduje hydrolizę obu części (duża podjednostka zmniejsza swoją masę do $76 \cdot 10^3$ Da, natomiast mniejsza do $18 \cdot 10^3$ Da) i w rezultacie powstaje aktywny enzym [8]. Koohmaraie [27] wykazał, że w wyniku autolizy małej podjednostki powstaje przeważnie jeden główny fragment $18 \cdot 10^3$ Da, chociaż możliwe, że powstaje seria produktów o masie cząsteczkowej od $30 \cdot 10^3$ do $18 \cdot 10^3$ Da, a takie fragmenty nie mogły być wychwycone przez żel SDS-PAGE użyty w doświadczeniu. Natomiast duża podjednostka rozpada się na kilka różnych fragmentów o masie cząsteczkowej od $61 \cdot 10^3$ do $21 \cdot 10^3$ Da. Polipeptyd o masie cząsteczkowej $40 \cdot 10^3$ Da reprezentuje już nieaktywną formę kalpiny.

Yoshizawa i wsp. [61] zaproponowali nieco inny mechanizm aktywacji. Pod wpływem jonów wapnia kalpaina rozpada się na dwie odrębne podjednostki. Jednostka $80 \cdot 10^3$ Da nie różni się właściwościami katalitycznymi od całej kalpiny, charakteryzuje się natomiast większą wrażliwością na jony wapnia. Odłączona podjednostka $80 \cdot 10^3$ Da wymaga stężenia wapnia takiego samego jak zautolizowana aktywna forma kalpiny.

Aktywność μ -kalpainsy zmniejsza się gwałtownie w ciągu pierwszych dni po uboju (po 72 godz. jej aktywność była mniejsza niż czułość zastosowanej metody analitycznej), podobnie dzieje się z aktywnością kalpastatyny, natomiast aktywność m-kalpainsy jest stabilna [27]. Spadek aktywności μ -kalpainsy koreluje z podwyższeniem stopnia kruchości [56]. Optymalne warunki aktywności kalpainsy ustalone *in vitro* to temp. 25°C i pH w zakresie od 7,2–8,2 [8]. Jednak podczas dojrzewania mięso przechowywane jest w temp. poniżej 15°C, a jego pH wynosi około 5,5. W badaniach przeprowadzonych przez Kanawę i wsp. [25] μ -kalpainsa wykazała maksimum swojej aktywności przy pH 7,58 i w temp. 25°C, była ciągle aktywna przy pH 5,5 w tej samej temperaturze, wykazując 17,7% swojej aktywności maksymalnej, ale w warunkach pH 5,78 i w temp. 5°C była całkowicie nieaktywna. Z badań Koohmariaie'go [27] wynika jednak, że stopień inaktywacji proteolitycznej μ -kalpainsy zwiększa się ze zmniejszającym się pH i ze wzrostem temperatury. Po 60 min, w temp. 25°C i przy pH 5,8 μ -kalpainsa zachowała jedynie 9,2% swojej aktywności początkowej, a po 120 min, w temp. 5°C zachowała 79,2% swojej początkowej aktywności. Badania Huff-Lonergan i wsp. [18] potwierdziły, że oczyszczone miofibryle są degradowane przez μ -kalpainsę w temp. 4°C przy pH równym 5,6 z dodatkiem 100 μ M chlorku wapnia. Wiele badań wskazuje na to, że żaden inny czynnik, jak tylko kalpainsy pełnią główną rolę w procesie kruszenia mięsa [1, 28, 31, 41].

Duża część kalpainsy jest związana z miofibrylami. Aktywność kalpainsy związaną z miofibrylami przypisuje się głównie μ -kalpainsie. Związany w ten sposób enzym ma lepszy dostęp do substratu i jest bardziej odporny na inhibicję przez kalpastatynę [1]. Jednak analiza mięśni pochodzących z owiec z fenotypem callipyge oraz ze zwierząt normalnych wykazała, że aktywność związanej z miofibrylami kalpainsy jest taka sama, podczas gdy twardość mięsa jest dwa razy większa u owiec callipyge. W związku z tym wydaje się niemożliwe, aby związana z miofibrylami kalpainsa miała duży udział w procesie tenderyzacji [5].

Funkcje kalpainsy

Funkcje kalpainsy nie zostały dotąd w pełni określone. Wiadomo, że są związane z podstawowymi frakcjami komórkowymi. Potwierdzono, że kalpainsa-10 powoduje zaburzenia w wydzielaniu i działaniu insuliny w żywym organizmie [51]. Istnieją dowody na to, że kalpainsy przyczyniają się do remodelowania cytoszkieletu aktyny, migracji komórki oraz transformacji onkologicznych [2]. Większość składników włókien mięśniowych, szczególnie białek cytoszkieletowych, uznano za potencjalny substrat biologiczny kalpainsy [46]. Teoretycznie aktywność μ -kalpainsy *in situ* powoduje proteolityczny rozpad, który z kolei osłabia strukturę włókien mięśniowych, dając w rezultacie kruche mięso po ugotowaniu. Aby rozpoczął się proces kruszenia musi nastąpić wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie, jony wapnia powodują wtedy aktywację kalpainsy, które następnie hydrolizują białka budujące strukturę włókna

mięśniowego. Nie ma bezpośredniego dowodu na to, że kalpainy są aktywne w mięśniu *post mortem*, nie ma nawet dowodu, że są aktywne w żywym mięśniu. Aktywność kalpain stwierdza się jednak na podstawie dowodów pośrednich, czyli produktów autolizy kalpain obecnych w mięśniu [8]. Badając produkty degradacji białek obecnych w mięśniu podczas dojrzewania, a także produkty jakie powstają podczas inkubacji miofibryli z kalpainami *in vitro* można określić wpływ kalpain na proces tenderyzacji.

Jedną ze zmian zachodzących podczas dojrzewania mięsa jest degradacja troponiny-T oraz pojawienie się fragmentów $27 \cdot 10^3$ lub $30 \cdot 10^3$ Da [13]. Podobne zmiany w troponinie T pojawiają się podczas inkubacji miofibryli z μ -kalpainą w temp. 4°C przy pH 5,6 [18]. Hydroliza troponiny T przez μ -kalpainę przebiega z uwolnieniem ośmiu peptydów o masie cząsteczkowej od 14 do $26 \cdot 10^3$ Da. Troponina T jest rozcinana w miejscu zawierającym jedną hydrofobową resztę aminokwasową [19].

Duże zmiany zachodzą również w titinie i nebulinie. Titina jest związana z linią „Z”, a jej degradacja powoduje rozluźnienie tej właśnie linii i utratę elastyczności mięśnia. Następuje dezintegracja pośrednich filamentów desminy. Charakterystyczne dla działania kalpain w tkance mięśniowej jest uwolnienie α -aktywniny z linii Z bez jej degradowania. Stwierdzono, że podczas dojrzewania α -konektyna jest rozszczepiana na β -konektynę i fragment o m. cz. $12 \cdot 10^5$ Da [14, 18, 55]. Steen i wsp. [52] nie stwierdzili jednak żadnej zależności pomiędzy koncentracją titiny a siłą cięcia mierzoną w różnych przedziałach czasowych *post mortem*. Nie wykazali też zależności pomiędzy koncentracją nebuliny a aktywnością m-kalpainy, kalpastatyny czy stosunkiem m-kalpainy do kalpastatyny. Nebulina natomiast zanika podczas dojrzewania mięsa *post mortem*. Filamenty nebuliny rozpadają się na pięć mniejszych fragmentów o łańcuchach $20 \cdot 10^4$, $18 \cdot 10^4$, $40 \cdot 10^3$, $33 \cdot 10^3$ i $23 \cdot 10^3$ Da. W środowisku i temp. 4°C i pH 5,6 μ -kalpaina jest w stanie zdegradować nebulinę po 15 min inkubacji i degradacja ta zachodzi szybciej niż rozpad titiny. Desmina z kolei jest degradowana podczas dojrzewania *post mortem*, a głównym produktem tej degradacji jest produkt o m. cz. ok. $38 \cdot 10^3$ Da. Ten produkt pojawia się również podczas inkubacji miofibryli z μ -kalpainą. Filamina rozpada się częściowo na produkt o m. cz. ok. $240 \cdot 10^3$ Da w próbkach mięsa dojrzewającego naturalnie oraz w próbkach oczyszczonych miofibryli z dodaną μ -kalpainą [18, 55].

Czynniki wpływające na aktywność kalpain w mięsie

Tenderyzacja mięsa *post mortem* nie zależy od degradacji pojedynczych białek, ale jest związana z wieloma zmianami biochemicznymi i strukturalnymi zachodzącymi w białkach [18]. Aktywność kalpain może się różnić w zależności od gatunku zwierząt, mięśnia, może zależeć od wielu czynników działających na mięśnie jeszcze podczas życia zwierzęcia (poprzez modyfikowanie sposobu żywienia czy też poprzez rodzaj chowu) lub czynników mających wpływ na mięso w pierwszych godzinach po uboju lub podczas jego przetwarzania. Nie bez znaczenia są również czynniki genetyczne.

Istnieją dowody na to, że kalpainy pełnią ważną rolę podczas wzrostu mięśnia po urodzeniu zwierzęcia, a także podczas niszczenia tkanki mięśniowej obserwowanego podczas zaniku mięśni [15].

Czynniki przyżyciowe

W hodowli zwierząt rzeźnych dąży się do zwiększenia mięsności oraz obniżenia stopnia otłuszczenia. Jednak bardzo często obserwuje się zwiększenie twardości mięsa ze zwierząt o podwyższonej mięsności. Przykładem może być rasa bydła podwójnie umięśniona Belgian Blue White. Zależność pomiędzy siłą cięcia a ilością fragmentu o wielkości $30 \cdot 10^3$ Da, charakterystycznego dla degradacji troponiny T, jest dużo słabsza niż u innych ras [52].

Znanym sposobem zwiększenia ilości tkanki mięsnej kosztem zmniejszenia zawartości tłuszczu, bez konieczności zwiększania dawki żywieniowej, jest podawanie zwierzętom clenbuterolu. Jest to sztuczny środek adrenergiczny podobny do adrenaliny. Podawanie go jest dobrym sposobem na uzyskanie większej ilości mięsa, jest ono jednak twarde. Podawanie clenbuterolu nie wpływa na aktywność μ -kalpainy, ale podwyższa aktywność kalpastatyny, która blokuje tenderyzację mięsa [47]. Podobny efekt uzyskuje się podając adrenalinę, naturalnie występujący w organizmie czynnik adrenergiczny powodujący podwyższenie o 97% aktywności kalpastatyny. Jednak aktywności enzymów systemu kalpainowego w czasie składowania mięsa zmieniają się. Można więc powiedzieć, że zróżnicowany poziom adrenaliny w plazmie krwi powoduje silne zaburzenia w systemie kalpainowym [44]. Ertbjerg i wsp. [10], przeprowadzając badania świń, wykazali, że wstrzykiwanie adrenaliny domięśniowo w połączeniu z wysiłkiem fizycznym zwierząt powoduje podwyższenie pH mięsa i obniżenie stopnia jego twardości.

Hodowla świń, od których uzyskuje się chude mięso, doprowadziła do powstania mutacji genu RyR1. Obecność tego genu jest związana z podatnością zwierząt na stres i obniżoną jakością mięsa. W mięsie takich zwierząt obserwuje się niższy poziom aktywności m-kalpainy w porównaniu ze zwierzętami nie dotkniętymi tą mutacją genu, co może decydować o podwyższonej twardości mięsa [45].

Ciekawym przypadkiem jest fenotyp owiec callipyge. Został on zidentyfikowany po raz pierwszy w roku 1983 w Dorset. Jeden z osobników męskich przekazywał specyficzny fenotyp niektórym potomkom. Charakteryzowały się one tym, że tylna część ciała (szczególnie mięśnie: *biceps femoris*, *semimembranosus*, *semitendinosus* i *longissimus*) była szczególnie umięśniona [11]. Mięśnie objęte fenotypem callipyge charakteryzują się dużo większym (o około 60% w momencie śmierci) poziomem kalpastatyny w porównaniu z mięśniami normalnych owiec [4, 12]. Fenotyp callipyge umożliwia produkowanie mięsa chudego, ale o mniejszej kruchości. Mrożenie powoduje zmniejszenie twardości mięsa, prawdopodobnie na skutek obniżenia aktywności kalpastatyny [9]. Mięśnie *biceps femoris* i *longissimus dorsi* z fenotypem

callipyge charakteryzują się większą twardością i masą, natomiast mięsień *infraspinatus* nie jest zaliczany do mięśni z tym fenotypem. Aktywność m-kalpainy jest wyższa w *m. biceps femoris* i *m. longissimus* owiec callipyge niż w tych samych mięśniach owiec normalnych. Natomiast m-kalpain w mięśni *infraspinatus* owiec normalnych i callipyge była tak samo aktywna [4]. Degradacja titiny, nebuliny, desminy i troponiny T przebiega znacznie wolniej podczas dojrzewania mięsa owiec callipyge [12]. Przypadek owiec callipyge świadczy o tym, że podwyższony przyrost masy mięśnia może powodować zmniejszenie stopnia degradacji białek związane ze spadkiem aktywności kalpain, który z kolei łączy się z podwyższonym poziomem kalpastatyny [15]. Istnieje wyraźna zależność pomiędzy jakością mięsa a typem mięśnia, z którego to mięso pochodzi. Różnorodność pomiędzy mięśniami jest często związana z właściwościami metabolicznymi mięśnia i jego zdolnością kurczenia się [26]. Szybciej dojrzewają mięśnie białe, szybko kurczące się, niż czerwone – wolno kurczliwe. Aktywność m-kalpainy i kalpastatyny okazały się silnie związane z typem mięśnia. Aktywność m-kalpainy jest tym niższa im większa jest szybkość skurczu mięśnia oraz tym niższa aktywność m-kalpainy im wyższa aktywność ATPazy. Podobne wyniki uzyskano w przypadku μ -kalpainy [39]. Porównując mięśnie indycze, wyższą aktywność m-kalpainy zanotowano w mięśniach udźca niż w mięśniach piersiowych [38].

Wprowadzanie witaminy E do mięśnia może zapobiegać utlenianiu kalpain i poprzez takie działanie spotęgować działanie dodanych jonów wapnia [16]. Wzbogacanie paszy witaminą D powoduje zwiększenie stężenia wapnia w *m. longissimus dorsi*, a tym samym zmniejszenie siły cięcia w przypadku mięsa wołowego. W 21. dniu po uboju siła cięcia mięśni zwierząt karmionych paszą wzbogaconą w witaminę D była mniejsza o 15%. Taka właściwość witaminy D może być wykorzystana jako czynnik powodujący zwiększenie kruchości mięsa [53].

Czynniki poubojowe

Zwiększenie stężenia wapnia w środowisku, w którym dojrzewa mięso, sprzyja zwiększeniu jego kruchości. Moczenie mięsa, pochodzącego z 8- do 11-letnich krów, w roztworze chlorku wapnia przez 24 godz. powoduje niskie wartości siły cięcia [60]. Także wstrzykiwanie chlorku wapnia razem z tokoferolem wywołuje intensywne kruszenie wołowiny.

Stymulacja elektryczna stosowana jest w celu uniknięcia tzw. skurczu chłodniczego, który jest częstym problemem pojawiającym się podczas szybkiego chłodzenia tusz po uboju [36]. Niskonapięciowa stymulacja elektryczna jest stosowana zazwyczaj od razu po oszołomieniu, natomiast wysokonapięciowa stosowana jest jakiś czas po oszołomieniu, na jednym z odcinków linii ubojowej. Za bardziej efektywną uznaje się stymulację wysokonapięciową [20].

Stymulacja elektryczna tusz wołowych w 3. min *post mortem*, niezależnie od jej rodzaju (niskie czy wysokie natężenie prądu), powoduje podwyższenie twardości mięsa. Obserwuje się przy tym gwałtowny spadek pH, co jest prawdopodobną przyczyną twardości mięsa w porównaniu z tuszami stymulowanymi w 40. min *post mortem* [20]. Badania te wskazują, że stymulacji elektrycznej nie powinno się przeprowadzać od razu po uboju. W innych badaniach także potwierdzono, że stymulacja pozwala uzyskać bardziej kruche mięso [34, 36, 37]. Zwiększony napływ jonów wapnia po stymulacji elektrycznej do cytoplazmy może powodować chwilowe uaktywnienie μ -kalpainy i dzięki temu proteoliza może zajść szybciej [57]. Morton i wsp. [37] zaobserwowali niewielki wzrost aktywności μ -kalpainy, a także kalpastatyny w wołowinie o pH 5,5 i w temp. 15°C, ale w 24. godz. aktywność μ -kalpainy, jak i kalpastatyny obniżyła się o 80%. Średnia twardość zmniejszyła się z 81 N w 12. godz. do 49 N w 336. godz. Ci sami naukowcy stwierdzili, że w stymulowanych elektrycznie tuszach owczych aktywność μ -kalpainy zmniejszała się na początku wolno (do 9. godz.), a pomiędzy 9. a 18. godz. spadała gwałtownie. Twardość mięsa owczego spadała ze 113 N w 6. godz. do 38 N w 96. godz. W innych badaniach [37] przeprowadzonych na tuszach wieprzowych wykazano, że elektryczna stymulacja wywołała efekt w połowie tak silny jak proces dojrzewania. W rezultacie uzyskano mięso bardziej kruche.

Podsumowanie

Dotychczas odkryto wiele rodzajów kalpain i prawdopodobnie będzie ich więcej. Kalpainy są obecne w różnych tkankach i spełniają różne role. Obecność kalpain w tkance mięśniowej jest stwierdzona, chociaż ich funkcje są nadal nie w pełni wyjaśnione. Kalpainy spełniają podstawowe kryteria stawiane czynnikom wpływającym na proces kruszenia mięsa. Enzymy te są obecne w komórce mięśniowej, a w doświadczeniach przeprowadzanych *in vitro* prowadzą do tych samych produktów degradacji białek, jakie wykrywane są w mięsie po okresie dojrzewania. Mają one dostęp do miofibryli w komórce [30]. Aktywność kalpain oraz stosunek aktywności kalpainy do aktywności kalpastatyny są skorelowane z twardością mięsa. Im wyższa jest aktywność kalpain oraz im wyższy stosunek kalpaina/kalpastatyna, tym bardziej kruche mięso otrzymuje się.

W większości badań aktywność kalpain była mierzona po wyizolowaniu ich z mięsa, używając jako substratu innych (niż miofibrylarne) białek. Nie mierzono więc rzeczywistej aktywności tych enzymów. Istnieją więc głównie pośrednie dowody na działanie kalpain podczas procesu kruszenia mięsa. W zależności od wielu czynników aktywność ta może być różna. Mimo, że mechanizm działania kalpain nie jest całkowicie wyjaśniony, na podstawie wyników licznych doświadczeń można stwierdzić, że kalpainy pełnią ważną rolę w procesie tenderyzacji mięsa. Dokładne poznanie mechanizmu kruszenia mięsa oraz działania kalpain umożliwiłoby świadome

sterowanie procesem tenderyzacji i uzyskiwanie mięsa kruchego o standardowej jakości.

Literatura

- [1] Boehm M.L., Kendall T.L., Thompson V.F., Goll D.E.: Changes in the calpains and calpastatin during *post mortem* storage of bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 1998, **76**, 2415-2434.
- [2] Carragher N.O., Frame M.C.: Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int. J. Bioch. Cell Biol.*, 2002, **34**, 1539-1543.
- [3] Dąbrowska R., Wrzosek A.: Molekularne podstawy kontroli skurczu mięśni przez jony wapnia. *Kosmos*, 1997, **46 (4)** 555-562.
- [4] Delgado E.F., Geesink G. H., Marchello J.A., Goll D.E., Koohmaraie M.: The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 398-412.
- [5] Delgado E.F., Geesink G.H., Marchello J.A., Goll D.E., Koohmaraie M.: Properties of miofibril-bound calpain activity in *longissimus muscle* of callipyge and normal sheep. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 2097-2107.
- [6] Dransfield E.: Modelling *post-mortem* tenderization-IV: Role of calpains and calpastatin in conditioning. *Meat Sci.*, 1993, **34**, 217-234.
- [7] Dransfield E.: Calpains from thaw rigor muscle. *Meat Sci.*, 1996, **43**, 311-320.
- [8] Dransfield E.: Meat tenderness-the μ -calpain hypothesis. 45th ICoMST, 1999, pp. 220-228.
- [9] Duckett S.K., Klein T.A., Leckie R.K., Thorngate J.H., Busboom J.R., Snowden G.D.: Effect of freezing on calpastatin activity and tenderness of callipyge lamb. *J. Anim. Sci.*, 1998, **76**, 1869-1874.
- [10] Ertbjerg P., Henckel P., Karlsson A., Larsen L. M., Møller A. J.: Combined effect of epinephrine and exercise on calpain/calpastatin and cathepsin B and L activity in porcine *longissimus muscle*. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 2428-2436.
- [11] Freking B.A., Keele J. W., Beattie C.W., Kappes S.M., Smith T.P.L., Sonstegard T.S., Nielsen M.K., Leymaster K.A.: Evaluation of the ovine callipyge locus: I. Relative chromosomal position and gene action. *J. Anim. Sci.*, 1998, **76**, 2062-2071.
- [12] Geesink G.H., Koohmaraie M.: *Postmortem* proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb *biceps femoris* during extended *postmortem* storage. *J. Anim. Sci.*, 1999 **77**, 1490-1501.
- [13] Geesink G.H., Taylor R.G., Bekhit A.E.D., Bickerstaffe R.: Evidence against the non-enzymatic calcium theory of tenderization. *Meat Sci.*, 2001, **59**, 417-422.
- [14] Goll D.E., Dayton W.R., Singh I., Robson R.M.: Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disc by using calpain. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, **13**, 8501-8510.
- [15] Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Ouali A.: The calpain system and skeletal muscle growth. *Can. J. Anim. Sci.*, 1998, **78**, 503-512.
- [16] Harris S.E., Huff-Lonergan E., Lonergan S.M., Jones W.R., Rankins D.: Antioxidant status affects color stability and tenderness of calcium chloride-injected beef. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 666-677.
- [17] Hopkins D.L., Thompson J.M.: Inhibition of protease activity 2. Degradation of myofibrillar proteins, myofibril examination of free calcium levels. *Meat Sci.*, 2001, **59**, 199-209.
- [18] Huff-Lonergan E., Mitsuhashi T., Beekman D. D., Parrish F. C., Jr., Olson D. G., Robson R. M.: Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in *post mortem* Bovine Muscle. *J. Anim. Sci.*, 1996, **74**, 993-1008.
- [19] Hughes M.C., Geary S., Dransfield E., McSweeney P.L.H., O'Neill E.E.: Characterization of peptides released from rabbit skeletal muscle tin-T by μ -calpain under conditions of low temperature and high ionic strength. *Meat Sci.*, 2001, **59**, 61-69.

- [20] Hwang I.H., Thompson J.M.: The effect of time and type of electrical stimulation on the calpain system and meat tenderness in beef *longissimus dorsi muscle*. *Meat Sci.*, 2001, **58**, 135-144.
- [21] Ilian M.A., Morton J.D., Kent M.P., Le Conteur C.E., Hickford J., Cowley R., Bickerstaffe R.: Intermuscular variation in tenderness: Association with the ubiquitous and muscle specific calpains. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 12-132.
- [22] Jakubiec-Puka A.: Rola proteolitycznego systemu kalpainowego w komórkach zwierzęcych. *Postępy Biochemii*, 1993, **39** (4) 251-258.
- [23] Jakubiec-Puka A.: Kalpains. *Kosmos*, 1997, **46** (4), 609-614.
- [24] Jeacocke R. E.: The concentrations of free magnesium and free calcium ions both increase in skeletal muscle fibres entering *rigor mortis*. *Meat Sci.*, 1993, **35**, 27-45.
- [25] Kanawa R., J. J., Takahashi K.: Inactivity of μ -calpain throughout *post mortem* aging of meat. *J. Food Sci.*, 2002, **67**, 2, 635-638.
- [26] Klont R.E., Brocks L., Eikelenboom G.: Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci.*, 1998, **49** (Suppl. 1), S219-S229.
- [27] Koochmarai M.: Effect of pH, Temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain. *J. Anim. Sci.*, 1992, **70**, 3071-3080.
- [28] Koochmarai M.: The role of Ca^{2+} dependent proteinases i *post mortem* proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 1992, **74**, 3, 239-245 (English abstract).
- [29] Koochmarai M.: Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.*, 1994, **36**, 93-104.
- [30] Koochmarai M.: Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci.*, 1996, **43**, S, S193-S201.
- [31] Kristensen L., Therkildsen M., Riis B., Sørensen M.T., Oksbjerg N., Purslow P.P., Ertbjerg P.: Dietary induced growth rate in pigs: Effects on *in vivo* and *post mortem* muscle proteolysis and meat quality. *J. Anim. Sci.*, 2002, **80**, 2862-2871.
- [32] Kurebayashi N., Harkins A.B., Baylor S. M.: Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 1993, **64**, 1934-1960.
- [33] Lawrie R.A.: *Meat Science*. Pergamon Press, Oxford 1985.
- [34] Lee S., Polidori P., Kaufman R.G., Kim B.C.: Low-voltage electrical stimulation effects on proteolysis and lamb tenderness. *J. Food Sci.*, 2000, **65** (5), 786-790.
- [35] Ma H., Fukiage Ch., Kim Y.H., Duncan M.K., Reed N. A., Shih M., Azuma M., Shearer T.R.: Characterization and expression of calpain 10. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276** (30), 28525-28531.
- [36] Maribo H., Ertbjerg P., Andersson M., Barton-Gade P., Møller A.J.: Electrical stimulation of pigs- effect on pH fall, meat quality and Cathepsin B+L activity. *Meat Sci.*, 1999, **52**, 172-187.
- [37] Morton J.D., Bickerstaffe R., Kent M.P., Dransfield E., Keeley G.M.: Calpain-calpastatin and toughness in *m. longissimus* from electrically stimulated lamb and beef carcasses. *Meat Sci.*, 1999, **52**, 71-79.
- [38] Northcutt J.K., Pringle T.D., Dickens J.A., Buhr R.J., Young L.L.: Effects of age and tissue type on the calpain proteolytic system in turkey skeletal muscle. *Poultry Sci.*, 1998, **77**, 367-372.
- [39] Ouali A.: Meat tenderization: Possible causes and mechanisms. A Review. *J. Muscle Foods*, 1990, **1** (2) 129-165.
- [40] Parr T., Sensky P.L., Scothern G.P., Bardsley R.G., Buttery P.J., Wood J.D. Warkup C.: Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine *longissimus muscle*. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 661-668.
- [41] Pringle T.D., Harrelson J.M., West R.L, Williams S.E., Johnson D.D.: Calcium-activated tenderization of strip loin, top sirloin, and top round steaks in diverse genotypes of cattle. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 3230-3237.
- [42] Purslow P.P., Ertbjerg P., Baron C.P., Christensen M., Lawson M. A.: Patterns of variation in enzyme activity and cytoskeletal proteolysis in muscle. 47th ICoMST, 2001, pp. 38-43.

- [43] Rosochacki S.J.: Proteoliza w mięśniach po uboju zwierząt. *Przeg. Hod.*, 1999, **9**, 26-29.
- [44] Sensky P.L., Parr T., Bardsley R.G., Buttery P.J.: The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine *longissimus muscle*. *J. Anim. Sci.*, 1996, **74**, 380-387.
- [45] Sensky P.L., Parr T., Lockley A.K., Bardsley R.G., Butery P.J., Wood J.D., Warkup C.: Altered calpain levels in *longissimus muscle* from normal pigs and heterozygotes with the ryanodine receptor mutation. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 2956-2964.
- [46] Sentandreu M.A., Coulis G., Ouali A.: Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.*, 2002, **13**, 398-419.
- [47] Simmons N.J., Young O.A., Dobbie P.M., Singh K., Thompson B.C., Speck P.A.: *Post-mortem* calpain-system kinetics in lamb: Effect of clenbuterol and prelaughter exercise. *Meat Sci.*, 1997, **47**, 1/2, 135-146.
- [48] Sorimachi H., Kinbara K., Kimura S., Takahashi M., Ishiura S., Sasagawa N., Sorimachi N., Shimada H., Tagawa K., Maruyama K., Suzuki K.: Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connection through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270** (52), 31158-31162.
- [49] Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K.: Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.*, 1997, **328**, 721-732.
- [50] Spadoni C., Forkas A., Sinka R., Tompa P., Friedrich P.: Molecular cloning and RNA expression of a novel *Drosophila* calpain, calpain C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **303**, 343-349.
- [51] Sreenan S.K., Zhou Y-P., Otani K., Hansen P.A., Currie K.P.M., Pan Ch-Y., Lee J-P., Ostrega D. M., Pugh W., Horikawa Y., Cox N. J., Harris C. L., Burant Ch. F., Fox A. P., Bell G. T., Polonsky K. S.: Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes*, 2001, **50**, 2013-2020.
- [52] Steen D., Claeys E., Uytterhaegen L., De Smet S., Demeyer D.: Early *post-mortem* conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-musled beef. *Meat Sci.*, 1997, **45**, 3, 307-319.
- [53] Swanek S.S., Morgan J.B., Owens F.N., Gill D. R., Strasia A., Dolezal H.G., Ray F.K.: Vitamin D₃ supplementation of beef seers increases *longissimus* tenderness. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 874-881.
- [54] Takahashi K.: Structural weakening of skeletal muscle tissue during *post-mortem* ageing of meat: Non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.*, 1996, **43**, S, S67-S80.
- [55] Takahashi K.: Mechanism of meat tenderization during *post-mortem* ageing: Calcium Theory. 45th ICoMST, 1999, pp. 230-235.
- [56] Thomson B.C., Dobbie P.M., Singh K., Speck P.A.: *Post-mortem* kinetics of meat tenderness and the components of calpain system in bull skeletal muscle. *Meat Sci.*, 1996, **44** (3) 151-157.
- [57] Veeramuthu G.I., Sams A.R.: *Post mortem* pH, myofibrillar fragmentation, and calpain activity in pectoralis from electrically stimulated and muscle tensioned broiler carcasses. *Poultry Sci.*, 1999, **78**, 272-276.
- [58] Watanabe A., Daly C.C., Devine C.E.: The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing. *Meat Sci.*, 1996, **42** (1) 67-78.
- [59] Whipple G., Koohmaraie M.: Degradation of myofibril proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. *J. Anim. Sci.*, 1991, **69**, 4449-4460.
- [60] Whipple G., Koohmaraie M.: Calcium chloride marination effects on beef steak tenderness and calpain proteolytic activity. *Meat Sci.*, 1993, **33**, 265-275.
- [61] Yoshizawa T., Sorimachi H., Tomioka S., Ishiura S., Suzuki K.: Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **208** (1) 376-383.

THE ROLE OF CALPAINS IN THE MEAT TENDERIZATION PROCESS

S u m m a r y

Meat tenderness and factors influencing it have been investigated for a long time. There are several theories explaining the process of meat tenderization. The calpain theory of tenderization has been accepted as the most feasible one. Calpains meet the basic criteria defined for factors that impact meat tenderization. These enzymes are present in a muscle cell, and in vitro experiments, when calpains are used, there are detected the same protein degradation products as in the meat after its raping. Calpains have access to myofibrils in cells. The activeness of calpains and the ratio between it and the calpastatin are correlated with the meat hardness. The higher the hardness of meat and the higher the ratio: calpain to calpastatin, the more tender meat can be obtained. Conditions under which these enzymes are active are close to conditions in the meat tissue after the death of animal. The calpain activity depends both on the survival, including genetic, and the post-mortem factors.

Although the mechanism of calpain activity has not been satisfactorily explained so far, but on the basis of results obtained, it can be concluded that they play an important role in the meat tenderization process.

In this paper, calpains are characterized and some factors influencing their activeness are described.

Key words: calpains, meat tenderization. ☒