

Factores que afectan la actividad de las proteasas dependientes del calcio y su relación con el proceso de ablandamiento de la carne

S. Uzcátegui-Bracho¹ y N. Jerez-Timaure²

Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Núcleo Agropecuario,
Apartado 15252, Maracaibo 4005-A, Estado Zulia, Venezuela
Recibido: Julio 3, 2007. Aceptado: Junio 21, 2008.

Factors affecting activity of the calcium-dependent proteases and their participation in the process of meat tenderization

ABSTRACT. The endogenous calpain system plays a major role in regulating proteolysis of muscle proteins under postmortem conditions. Substrates of calpains, such as desmin, synemin, talin and vinculin, form part of the cytoskeletal framework of the muscle cell. The calpain system is composed of several isoforms of calcium-dependent cysteine proteases and their specific competitive inhibitor, calpastatin. The two best-characterized isoforms of calpains are μ -calpain and m-calpain, which both degrade the same specific set of myofibrillar and cytoskeletal proteins as muscle is converted into meat. Alterations in pH and/or ionic strength may cause conformational changes that allow an increase in the hydrophobicity and aggregation of the enzyme. Likewise, pH/ionic strength may alter conformation of the substrate and make them less susceptible to cleavage by μ -calpain. The pH optimal of the calpains is 7.0, although, at lower pH, the enzymes show some catalytic activity. Research on this topic is abundant but results are very controversial. Temperatures of refrigeration also play a key role in the autolysis of the calpains and calpastatin. Recent experimental evidence shows that proteolysis of key cytoskeletal proteins, such as the intermediate filament protein, desmin, may be related also to drip loss or water holding capacity of the carcass.

Key words: Beef, Calpains, Tenderness, pH, Water-holding capacity.

RESUMEN. El sistema endógeno de las calpains juega un importante rol en la regulación de la proteólisis de las proteínas musculares en condiciones postmortales. Los sustratos de estas proteasas, desmina, sinemina, talina y vinculina, forman parte del cito esqueleto de las células musculares. El sistema de las calpains está compuesto por varias isoformas de proteasas cisteína, dependientes de calcio y su inhibidor competitivo específico la calpastatina. Las dos isoformas de calpains bien caracterizadas y asociadas con el desarrollo de la terneza en la carne son la μ -calpaina y la m-calpaina. Los cambios de pH y concentración iónica pueden alterar la conformación de los sustratos haciéndolos menos susceptibles a la acción de estas enzimas. La relación pH terneza de la carne ha sido ampliamente debatida y contradictoria en sus resultados. Las temperaturas de refrigeración también son determinantes en la actividad de las calpains y de la calpastatina. Existen evidencias experimentales que apoyan la idea de que la reducción de la degradación de la desmina está asociada con el incremento de pérdida de agua o capacidad de retención de agua de la canal.

Palabras clave: Calpains, Capacidad de retención de agua, Carne de res, pH, Terneza.

¹Autor para la correspondencia, e-mail: sojanuzcategui@gmail.com

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252, Estado Zulia, Maracaibo-Venezuela

²Departamento de zootecnia, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Apartado 15205, Maracaibo 4005, Estado Zulia, Maracaibo-Venezuela. jerez.nancy@gmail.com

Introducción

La calidad organoléptica de la carne es percibida principalmente por atributos sensoriales como terneza, jugosidad, sabor, y color muscular. La terneza ha sido calificada por los consumidores como el atributo organoléptico más importante de la carne fresca. Según Koohmaraie *et al.* (1992a), la falta de uniformidad, el exceso de grasa, la variabilidad de la terneza y la inconsistencia en la predicción de la misma, han sido identificados como los problemas más relevantes de la industria de la carne en países desarrollados. En Venezuela tradicionalmente no se le había prestado mayor atención a este tema, sin embargo, en los últimos años ha surgido interés por satisfacer un mercado interno que demanda carne de calidad dispuesto a pagar mejor por ella.

Se han identificado diversos sistemas enzimáticos involucrados en los cambios estructurales asociados con el ablandamiento de la carne. El sistema de las calpains representado por la -calpaina y la m-calpaina, es el mayormente asociado con este proceso (Koohmaraie, 1992b). Ambas calpains muestran actividades catalíticas diferentes; mientras que, la actividad de la -calpaina disminuye rápidamente, la m-calpaina decrece lentamente postmortem (Koohmaraie, 1988).

Durante el rigor mortis, el pH muscular y la temperatura interactúan continuamente impactando la actividad de las enzimas encargadas de la proteólisis postmortal. Esta revisión bibliográfica pretende indagar sobre los factores más influyentes en la actividad de las proteasas dependientes del Ca^{2+} , tales como el efecto del pH, la temperatura, la capacidad de retención de agua, y su relación con el proceso de ablandamiento de la carne.

Conversión de músculo a carne

En la conversión de músculo a carne ocurren cambios dramáticos en el microambiente de la célula muscular, que incluyen modificaciones estructurales de las proteínas que integran a las fibras musculares (Winger y Pope, 1981). Se conoce que todos los mediadores que participan en el mecanismo de la apoptosis están lo suficientemente integrados con el ablandamiento de la carne. Herrera-Mendez *et al.* (2006) han reconsiderado que en el proceso de ablandamiento de la carne también participan las peptidasas (caspases) que se activan durante el proceso de muerte celular. La participación de las caspases no ha sido completamente explicada, sin embargo es probable que ellas sean un elemento esencialmente

facilitador para la acción de otros sistemas proteolíticos intracelulares como por ejemplo las catepsinas, calpains y proteosomas. Al momento de la muerte del animal, el músculo es flácido y altamente extensible. Luego de pocas h postmortem se vuelve inextensible y rígido, originando el fenómeno que se conoce como rigor mortis. La rigidez observada durante esta condición es debido a la formación de puentes cruzados entre filamentos de actina y miosina los cuales, en ausencia de energía (ATP), son irreversibles (Pearson y Young, 1989). En la búsqueda por mantener la homeostasis, comienza la depleción de glucógeno, como reserva de energía en el músculo que conlleva a la acumulación de lactato, produciéndose un descenso del pH desde la neutralidad hasta valores que oscilan entre 5.4-5.8 (Maddock, *et al.*, 2005). Múltiples factores afectan este proceso entre los que destacan el manejo ante-mortem, la temperatura, concentración de Ca^{2+} , fuerza iónica, y la concentración de calpastatina.

La resolución de rigor mortis ocurre gracias a la presencia de las enzimas proteolíticas, que permiten la aparición de la blandura o terneza de la carne. Kamtra y Saffle (1959) describieron la terneza como una característica engañosa ya que no solamente son muchos los factores que contribuyen a la blandura de la carne, sino que estos están en continuo estado de cambio. Durante los últimos 10 años muchos investigadores (Koohmaraie, 1992a; Purchas y Aungsupakorn, 1993; Morton *et al.*, 1999) se han dedicado a estudiar los numerosos factores que están relacionados con la terneza, tales como edad, condición sexual, raza, acabado de grasa, tratamientos previos al sacrificio, enfriamiento y técnicas de cocción, entre otros. La relación entre los cambios ocurridos antes del rigor y la terneza también ha sido extensivamente estudiada. Según Hamm (1982) los cambios postmortem afectan considerablemente las características de calidad como terneza, color y capacidad de retención de agua.

Sistemas enzimáticos endógenos

Uno de los factores que juega un rol importante en el ablandamiento de la carne es la degradación específica de proteínas musculares provocada por sistemas enzimáticos endógenos. Cerca de las 24 h después de la faena, hay una disrupción de las proteínas ligadas al sarcolema de cada miofibrilla (Taylor *et al.*, 1995). La ruptura de las miofibrillas conduce a un incremento de la fragilidad y fragmentación de las proteínas cito-

esqueléticas, tales como titina, nebulina, desmina y troponina-T (Geesink y Koohmaraie, 1999).

Existen tres sistemas proteolíticos presentes en el músculo que han sido asociados como los posibles encargados de la proteólisis post mortem y por ende con el desarrollo de la terneza de la carne, las catepsinas lisosomales, el complejo de las proteinasas multicatalíticas (CPM) y el sistema de las proteasas dependientes del calcio o calpains, (Koohmaraie y Geesink, 2006). Las catepsinas fueron las primeras enzimas lisosomales consideradas en los estudios del mecanismo de ablandamiento de la carne. Ellas poseen mayor actividad en el pH postrigor que oscila entre 5.4-5.8. Estas enzimas se encargan de la degradación de la miosina y la actina, proteínas que no muestran una apreciable degradación durante el almacenamiento en refrigeración de la carne (Bandman y Zdanis, 1988; Prigge *et al.*, 1998; Taylor y Koohmaraie, 1998), puesto que su máxima actividad es a temperaturas cercanas a 20°C, por lo que en teoría no habrán de ser un factor de peso durante la maduración de la carne en refrigeración. Estas observaciones, indican que las catepsinas no participan en el ablandamiento postmortem.

El segundo grupo de enzimas está representado por el complejo de las proteasas multicatalíticas (CPM), que también han sido propuestas (Orlowski, 1990) como responsables del ablandamiento de la carne; sin embargo, existe poca información que implique fuertemente a las CPM como responsables de la proteólisis postmortem (Robert *et al.*, 1999).

El tercer y último grupo corresponde al sistema de las proteasas dependientes del Ca²⁺, que consiste en tres componentes: la -calpaina, la m-calpaina y la calpastatina, inhibidor competitivo de la actividad de estas enzimas (Goll *et al.*, 2003). Se han caracterizado once isoformas de las calpains, de las cuales sólo estas tres se han asociadas con el proceso de ablandamiento de la carne. Las calpains presentes en los tejidos de los vertebrados se han denominado según la cantidad de Ca²⁺ que necesitan para su máxima actividad en -calpaina (3-50 µM), la m-calpaina (40-800 µM) (Goll *et al.*, 1992) y la calpastatina que inhibe la actividad de todas las calpains sólo en presencia del Ca²⁺. Estas concentraciones de Ca²⁺ son mayores a las requeridas para la activación de estas enzimas, ya que se ha comprobado que las calpains pueden ser activadas *in vivo*, siendo las concentraciones de Ca²⁺ que las mismas requieren *in vitro* mucho más elevadas que las que se pudieran esperar se presenten en la célula en

reposo (0.05-0.5 µM) (Goll *et al.*, 1992). Un mecanismo importante para regular la actividad de las calpains que se ha estudiado en profundidad es la adición exógena de iones Ca²⁺ (Wulf *et al.*, 1996a; Koohmaraie *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2000) como método de ablandamiento postmortem. Se han realizado muchas pruebas que han demostrado exitosamente un incremento apreciable de la actividad de las calpains cuando éstas se exponen al efecto del CaCl₂, agregado intencionalmente a la carne (Wheeler, 1998; Koohmaraie, 1992). Desde hace algún tiempo se ha propuesto un modelo de cascada, en el cual primero se activa la -calpaina, que requiere bajas concentraciones de Ca²⁺, disminuyendo la necesidad de Ca²⁺ de la m-calpaina, permitiendo de esta manera la activación de esta última en el ámbito celular (Sorimachi *et al.*, 1997). En base a esta propuesta, las calpains son consideradas como proenzimas inactivas hasta el momento en que el Ca²⁺ se liga a los dominios IV y IV' de las subunidades, provocando cambios conformacionales que conducen a la autólisis de las subunidades largas y cortas; esta subunidad larga liberada está lista para ejercer su actividad proteolítica (Goll *et al.*, 1992; Kinbara *et al.*, 1998). Por otra parte, las calpains no sólo degradan importantes proteínas estructurales, sino que también pueden degradar a su inhibidor (calpastatina) (Taylor *et al.*, 1995).

Por otra parte, la calpastatina, inhibidor específico de las calpains, se une a los dominios IV y IV' de las subunidades cortas y largas evitando que el Ca²⁺ se una a estas regiones. De esta manera se reduce tanto la velocidad como la actividad proteolítica de las calpains (Geesink *et al.*, 1999).

Los resultados de varios estudios (Koohmaraie *et al.*, 1988; Koohmaraie, 1996; Koohmaraie y Geesink, 2006) sustentan que la µ-calpaina es la responsable de la proteólisis y por ende el ablandamiento de la carne. Koohmaraie *et al.* (1987) reportaron que las m-calpains expuestas a suficientes cantidades de Ca²⁺ incorporadas en forma exógena al músculo por inyección o infusión podrían resultar en autólisis y por ende en su inactivación. Por su parte, Pringle *et al.* (1997) sostienen que las m-calpains no participan en la proteólisis ya que la concentración de Ca²⁺ es insuficiente para activarlas. Aún cuando los mecanismos de ablandamiento postmortem no están totalmente esclarecidos, la idea de más consenso es que el acortamiento de la fibra (o endurecimiento) y el posterior ablandamiento postmortem están ambos regulados por la

concentración de Ca^{2+} disponible en el espacio intracelular de la fibra muscular. Recientemente, Kookmaraie y Geesink (2006), reforzando teorías propuestas años anteriores, explican que las calpains tienden a autolisarse una vez finalizada su activación, disminuyendo su actividad catalítica. Adicionalmente, Wheeler *et al.* (2000), han indicado que en los músculos postmortales de bovinos y ovinos la actividad de la -calpaina declina mientras que, la m-calpaina se mantiene notablemente estable. Esta observación fue la que condujo a Kookmaraie *et al.* (1987) a concluir que la -calpaina es la responsable del ablandamiento postmortal de la carne. Esta conclusión de Kookmaraie *et al.* (1987), fue confirmada recientemente por Geesink *et al.* (2006) quienes utilizaron ratones transgénicos, a los cuales se inhibió la expresión del gen de la μ -calpaina, para verificar su participación en la proteólisis postmortal. Los resultados de este estudio mostraron una limitada actividad de la m-calpaina en los ratones transgénicos, resultando en una reducida proteólisis postmortem, indicando que la μ -calpaina es altamente responsable de la proteólisis muscular. Sin embargo, es conveniente resaltar que en algunas especies como los bovinos, la actividad de la m-calpaina es más restringida debido a su acelerada autólisis (Kent *et al.*, 2004; Geesink *et al.*, 2006).

Además de la cantidad de Ca^{2+} , la actividad de las calpains está influenciada por factores como el ambiente intracelular, pH, fuerza iónica, concentración de la calpastatina y la temperatura (Maddock, *et al.*, 2005). Además, se conoce que la interacción de estos factores entre sí, provocan un descenso significativo de la actividad catalítica de estas enzimas (Huff-Lonergan y Lonergan, 1999; Geesink y Kookmaraie, 1999).

Influencia del pH sobre la actividad de las calpains

Durante la conversión de músculo a carne, la actividad de las calpains encargadas de la degradación de las proteínas citoesqueléticas y miofibrilares, se ve afectada por los cambios de pH, que incrementan la fuerza iónica (Winger y Pope, 1981). Estas variaciones de pH pueden causar cambios en la conformación de las calpains incrementando la hidrofobicidad y agregación de las mismas. Igualmente, pueden alterar la estructura de sus sustratos: troponina-I, troponina-T, desmina, vinculina, metavinculina, distrofina, nebulina y titina (Robson *et al.*, 1997), haciéndolos menos susceptibles a la degradación provocada por dichas enzimas (Maddock, *et al.*, 2005). En la literatura existen evidencias científicas que corro-

boran la asociación de la terneza con el pH (Harrell *et al.*, 1978; Pike *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1996; Beltrán *et al.*, 1997).

Se estima que el pH óptimo de las calpains *in vivo* oscila entre 7.2 y 8.2 (Goll *et al.*, 1992), de manera que pHs elevados podrían estar asociados con una mejora de la blandura debido a un incremento en la actividad de estas enzimas (Yu y Lee, 1986; Edmunds *et al.*, 1991; Wang y Jiang, 1991). Sin embargo, la regulación de la actividad *in vivo* de estas proteasas ha sido muy debatida (Goll *et al.*, 1992). En teoría, un descenso rápido del pH limita la proteólisis de las proteínas musculares involucradas en el ablandamiento de la carne (Warner *et al.*, 1997; Huff-Lonergan *et al.*, 1999). El pH postmortem no es el ideal para que estas enzimas expresen su mayor actividad.

Maddock *et al.* (2005), compararon la actividad de las calpains a pH 7.5 y 6.5, y observaron que tanto la - como la m-calpaina muestran mayor actividad catalítica a pH 7.5, coincidiendo con los reportes realizados por Edmundo *et al.* (1991) y Wang y Jiang (1991). Sin embargo, los mismos autores (Maddock *et al.*, 2005), no detectaron actividad de la m-calpaina a pH 6.0.

Por otro lado, varias investigaciones han informado resultados discrepantes en cuanto a la relación terneza-pH muscular (Dransfield, 1981; Shackelford *et al.*, 1994). La complejidad de esta relación ha llevado a extender el estudio del pH final alcanzado a las 24 h postmortem, a considerar además, la tasa de descenso del mismo.

Se considera como pH postmortem normal valores entre 5.6 y 5.8 (Maddock *et al.*, 2005), dependiendo del tipo de fibra muscular predominante en el músculo. Cuando el pH final es superior al normal (aproximadamente entre 6.0-6.2), se producen carnes oscuras, firmes y secas (DFD), debido al bajo contenido de glucógeno en el músculo a la hora del sacrificio de los animales. Existen evidencias que indican que valores de pH por encima de 6.2 inducen rápidamente al ablandamiento, produciendo carnes más tiernas que las de pH "normal" (Huff-Lonergan *et al.*, 2000). Esto le da ciertas ventajas de terneza a carnes con pH elevado, debido a varias razones: En primer lugar, cuando el tejido muscular presenta bajas concentraciones de glucógeno a la hora del sacrificio, la glucólisis y la producción de ATP cesan más rápidamente. En segundo lugar, producto de la rápida depleción del ATP la carne es menos susceptible a la dureza inducida por el acortamiento en el rigor mortis y por los sistemas de enfriamiento (Watanabe *et al.*, 1996). Según

Beltrán *et al.* (1996), a los 7 d postmortem la m-calpaina presenta su mayor actividad en carnes DFD con pH 6.3, resultando las mismas significativamente más tiernas. En el mismo trabajo no se detectaron modificación de la actividad de la-calpaina y de la calpastatina debida a cambios del pH. En contraste, un trabajo realizado por Wulf *et al.* (1996b), indica que bajos pHs (5.6) están asociados con baja fuerza al corte y alta terneza, debido a que estas proteasas también pueden degradar a sus sustratos a pHs ácidos. Estos investigadores sostienen que músculos de carne DFD con un pH elevado, resultan en carnes menos tiernas ya que la actividad de las calpastatina (inhibidor de las calpains) es mayor en éstos, que en músculos con pH y color normal. La actividad de la calpastatina medida en este trabajo fue de 3.51, 3.05 y 1.80 para la carne oscura, normal y pálida, respectivamente. Estos resultados indican el efecto del pH sobre la calpastatina. Sin embargo, Kendall *et al.* (1993) sólo encontraron un mínimo efecto de la pH sobre la habilidad de la calpastatina en inhibir a la m-calpina *in vitro*.

En contraste, Aalhus *et al.* (1995) reportaron que la carne pálida, suave y exudativa (PSE) es más tierna que la carne normal. Varias investigaciones han mostrado que la terneza de la carne decrece cuando el pH final incrementa de 5.4 a 6.1 (Purcha 1990; Barnier *et al.*, 1992). La controversia encontrada en estos estudios indica que la relación entre el pH último, el color de la carne y la terneza no está completamente esclarecida, sin embargo, las evidencias sugieren que en un cuerpo en crecimiento, las variaciones de terneza están relacionadas con la extensión de la proteólisis postmortem, y específicamente en las diferencias en el sistema de las calpains/calpastatina (Wulf *et al.*, 1996).

Purcha (1990) indica que valores de pH intermedios están asociados con carnes duras, posiblemente debido al acortamiento de la fibra muscular; de igual manera Yu y Lee (1986) coinciden en mostrar que pHs intermedios, limitan la degradación de la línea Z y de los filamentos gruesos y finos, ya que este pH no es el óptimo para la actividad de las enzimas catepsinas y calpains, encargadas de la proteólisis postmortal.

A diferencia de Purcha (1990) otros estudios comprobaron esta relación curvilínea entre pH temprano y la terneza (Unruh *et al.*, 1986; Yu y Lee 1986; Marsh *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1996). En estos estudios se observó que sí el pH incrementa de 5.5 a 6.0, la terneza disminuye; pero si el pH se eleva por encima de 6.0 se detecta un aumento de la terneza. La razón de esta relación curvilínea fue

bien explicada por Yu y Lee (1986), quienes sugieren que existe una disminución en la actividad proteolítica de las enzimas a pH intermedios (5.5-6.0).

Jones y Tatum (1994) reportaron una relación lineal, positiva entre el pH y la relación de fuerza al corte en canales procesadas comercialmente. En ese estudio, las carnes con valores de fuerza al corte más bajos (mayor terneza) fueron derivadas de canales con valores de pH menores a 6.0. En otro estudio, donde se usaron canales procesadas comercialmente y bajo condiciones de laboratorio, Shackelford *et al.* (1994) no detectaron relaciones significativas entre pH y terneza. En contraste, Pike *et al.* (1993) reportaron una relación cuadrática usando el pH que explicó más del 30% de la variación en fuerza al corte.

Relación pH y temperatura en el proceso de ablandamiento postmortem

En el entendido de que el pH no es totalmente responsable de la mejora de terneza, varios investigadores han estudiado el pH medido a 3 h postmortem para determinar si la variación de la terneza puede ser predecible con el pH. Los resultados han sido inconsistentes.

Varios investigadores (Uytterhaegen *et al.*, 1992; Dransfield, 1994; Hwang y Thomson, 2001) han señalado que la interacción entre glucólisis rápida y lento descenso de la temperatura reducen la actividad de la -calpaina a las 3 h postmortem. En contraste, O'Halloran *et al.* (1997) indican que a las 3 h postmortem, una glucólisis rápida induce a una mayor actividad de la calpastatina y de la -calpaina. Dransfield (1994), por su parte sugiere que la calpastatina es menos susceptible a los cambios de pH y temperatura.

La tasa de descenso del pH afecta la terneza de la carne. Cuando los músculos experimentan un lento e intermedio descenso del pH y de temperatura, previniendo el acortamiento de la fibra en frío, se producen carnes tiernas (Bruce y Ball, 1990). Esto indica que valores de pH postmortem temprano están asociados con carnes tiernas, siempre y cuando el descenso de la temperatura no sea rápido. En efecto, la actividad de las calpains se ve favorecida al incrementar el tiempo postmortem a valores elevados de pH. Por lo tanto, un incremento de la actividad de las calpains con ausencia de acortamiento de la fibra aumenta la blandura de la carne (Pike *et al.*, 1993).

Koohmaraie (1992a), realizando estudios *in vitro* para estudiar el efecto del pH y temperatura sobre la inhibición de la autólisis de la - y m-calpaina, detectó que la -calpaina se desestabiliza

en el pH final postmortem, promoviendo rápidamente su autólisis y su subsiguiente inactivación. Es decir, que a medida que disminuye el pH incrementa la tasa de autólisis de la calpaina. Además, pudo demostrar, que cuando la temperatura desciende de 25 a 5°C, disminuye la degradación de la subunidad 80Dka de la calpaina (encargada de la actividad catalítica), mientras que, el descenso de la temperatura no afectó la degradación de la subunidad 30Dka. Bajas temperaturas ayudan a disminuir la autólisis de esta enzima.

Simmons *et al.* (1996), detectaron que la actividad de las calpains permanece constante durante todo el proceso del rigor mortis, hasta que se alcanza el pH 6.2, donde la misma decrece. Estas condiciones de alta temperatura y bajo pH se desnaturalizan las proteínas contráctiles haciendo más estable el rigor mortis (Offer y Knight, 1989). Adicionalmente a estas condiciones, en altas temperaturas las calpains se autolisan (Dransfield *et al.*, 1992) disminuyendo su efectividad como enzimas encargadas de la maduración de la carne, trayendo como consecuencia un incremento de la fuerza de corte mientras se reduce el potencial de maduración.

Finalmente se puede concluir que las calpains muestran actividad catalítica en el punto final de pH postmortal, sin embargo, su actividad se ve favorecida por pHs cercanos a la neutralidad, por lo tanto, pH elevados podrían estar asociados con carnes más tiernas.

Koohmaraie (1990) encontró que la actividad de la - y m-calpaina de la carne son estables por varias semanas cuando se almacenan a -70°C, pero que la actividad de la calpastatina decrece durante el almacenamiento. De acuerdo a Koohmaraie (1990) sólo el 45% de la actividad original de la calpastatina puede ser medida después de 6 semanas de almacenamiento en refrigeración. La inestabilidad de la calpastatina durante el almacenamiento en refrigeración también ha sido observada por Whipple y Koohmaraie (1992) en muestras de músculos almacenados en refrigeración por 4 semanas a -30°C. Por su parte, Ingólfsson y Dransfield (1991) observaron un 50% de reducción de la actividad de la calpastatina en carne de carnero después de 1 semana a -20°C. Recientemente Kristensen *et al.* (2006), corroboraron los resultados reportados por Koohmaraie (1990), mostrando que la actividad de la calpastatina se mantiene constante durante las primeras semanas de almacenamiento, pero después de 143 d decrece independientemente de

la temperatura de almacenamiento (-70°C). Por otra parte, los mismos autores concluyen que tanto la calpaina como la calpastatina son estables a temperatura de refrigeración durante un periodo de 6 semanas.

Capacidad de retención de agua y terneza de la carne

La capacidad de retención de agua (CRA) ha sido definida como la habilidad del músculo de unir agua a sus proteínas bajo condiciones definidas (Offer y Knight, 1989). Inmediatamente después del sacrificio, los músculos poseen una elevada capacidad de retención de agua que disminuye hasta alcanzar un mínimo cuando se establece el rigor mortis; luego, durante el proceso enzimático de maduración, la CRA tiende a aumentar. En condiciones normales, el agua se encuentra atrapada dentro de las estructuras de la célula unidas a las proteínas, incluyendo el espacio intra y extramiofibrilar; es por ello, que los cambios en la arquitectura celular influyen sobre la habilidad de la célula muscular en retener agua (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). Durante el proceso del rigor mortis se reduce el agua atrapada dentro de la miofibrilla, ya que fluye forzosamente hacia el espacio extramiofibrilar, situación que facilita la pérdida por goteo. Es decir, el encogimiento lateral de las miofibrillas que ocurre durante el rigor que es transmitido en toda la célula, evita la degradación de proteínas como la desmina (proteína ligada a las miofibrillas). Esta limitada degradación de las proteínas citoesqueléticas puede resultar en un incremento del encogimiento de la célula muscular, observándose la pérdida por goteo (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005).

El pH del músculo es uno de los principales factores que afectan la CRA. El pH al cual la CRA es mínima (pH 5) corresponde al punto isoeléctrico de las proteínas musculares. Sin embargo, la CRA de la carne no depende únicamente del pH sino de otros factores como el acortamiento de la fibra, la velocidad de glucólisis y la cantidad de ATP degradado (Hamm, 1982).

Existen evidencias que soportan la idea de que la proteólisis de las proteínas citoesqueléticas, tales como la desmina, proteína de los filamentos intermedios, puede estar relacionada con la producción de goteo, trayendo como consecuencia menor pérdida de humedad durante la cocción de la carne (Goll *et al.*, 1992). Esta proteína es degradada a partir de los 45 min hasta 6 h postmortem (Melody *et al.*, 2004). La degradación postmortem temprana, ciertamente pudiera permitir que el agua

fuera expulsada desde el espacio intramiofibrilar, permaneciendo en la célula por un largo periodo de tiempo. En consecuencia se reduce la degradación de proteínas que están vinculadas con la membrana celular de la miofibrilla (semejante a la desmina) resultando en un incremento en el encogimiento de la célula muscular, que finalmente se traduce en pérdida por goteo. Kristensen *et al.* (2001) y Rowe *et al.* (2001) indican que la variación de la capacidad de retención de agua detectada entre distintos músculos puede ser debida a las diferencias en la degradación postmortem de las proteínas de los filamentos intermedios, similares a la desmina. Por su parte, Melody *et al.* (2004) compararon la capacidad de retención de agua y terneza de tres tipos de músculos (PM = Psoas mayor, LD = *longissimus dorsi*; y SM = semimembranoso), y encontraron que el PM presentaba una rápida degradación de la desmina. Estos autores indican que este incremento en la degradación puede ser compensado por cierto encogimiento de las células musculares debido a la caída del pH. Kristensen y Purslow (2001), indican que las células musculares en postmortem temprano pueden retener mayor cantidad de agua debido a la rápida degradación de los filamentos intermedios, ya que se forman más espacios para que el agua se deposite. Ciertamente, la desmina no es la única proteína candidata involucrada en este proceso. Otras proteínas asociadas con los filamentos intermedios y con las costámeras han sido bien implicadas. Dentro de este grupo de proteínas se incluyen a la talina y a la vinculina (Bee *et al.*, 2004). Las diferencias en la pérdida por goteo asociadas con la disminución de

la degradación de la proteólisis pueden ser detectadas entre las primeras 24 a 48 h postmortem (Melody *et al.*, 2004). Observaciones similares se han realizado en lomo de cerdo donde la reducción de la degradación de la desmina puede estar asociada con un incremento de la pérdida por goteo (Davies *et al.*, 2004). Zhang *et al.* (2006) evaluaron la relación entre la degradación de la integrina, desmina, la μ -calpaina y la capacidad de retención de agua de carne fresca de cerdos empacada al vacío. Entre los hallazgos encontrados se destacan que la integrina y desmina juegan roles diferentes en la capacidad de retención de agua en carne de cerdo. La integrina contribuye a la formación de los canales entre la membrana celular y el cuerpo de la célula, incrementando la pérdida por goteo; mientras que, la desmina intacta ayuda a la transferencia del agua desde las miofibrillas contraídas hacia el espacio extracelular. Por otra parte, detectaron que la degradación de la desmina explica el 24.1% de la variación de la pérdida por goteo del lomo el 1er d del postmortem. Los mismos autores (Zhang *et al.*, 2006) indicaron también que la autólisis de la μ -calpaina está asociada con la degradación de la desmina, y esta autólisis a las 24 h es un potente indicador que predice el grado de degradación de la desmina y pérdida por goteo postmortem. Goll *et al.* (1992) indican que a tiempos prolongados de maduración, es cuando las calpainas degradan las miofibrillas y las proteínas citoesqueléticas de la carne debido a un incremento de la CRA, trayendo como consecuencia menor pérdida de humedad durante la cocción de la carne.

Conclusiones

La degradación de las proteínas citoesqueléticas es importante en la determinación de la terneza de la carne. De todos los sistemas enzimáticos endógenos que participan en la proteólisis postmortem, las calpainas juegan un rol importante en el proceso de ablandamiento de la carne.

El pH final, la tasa de descenso del pH y la temperatura son los factores que producen el mayor impacto sobre la terneza final de la carne; pero a la vez el pH depende de factores ambientales tales como las condiciones de estrés de los animales antes y durante la faena.

Las calpainas muestran actividad catalítica en el punto final de pH postmortal, sin embargo, su

actividad se ve favorecida a pH cercanos a la neutralidad (6.1), lo que pareciera indicar una mejora en la terneza de las carnes a pH alto. A pH normal postmortem se desestabiliza la μ -calpaina promoviendo su autólisis y su subsiguiente inactivación.

La temperatura no afecta la actividad de las calpainas y de la calpastatina, permaneciendo intactas por varias semanas a temperatura de refrigeración, sin embargo luego de cuatro meses de almacenamiento a temperaturas de congelación se disminuye la actividad de la calpastatina independientemente de la temperatura.

Una reducción de la degradación de las proteínas citoesqueléticas, tales como la desmina,

proteína de los filamentos intermedios puede estar relacionada con un mayor goteo, debido a

un incremento en el encogimiento de la célula muscular.

Literatura Citada

- Aalhus, J. L., S. D. Jones, A. C. Murray, and D. R. Best. 1995. A comparison of PSE beef to PSE pork. *Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci.* 46:284.
- Bandman, E. and D. Zdanis. 1988. An immunological method to assess protein degradation in postmortem muscle. *Meat Sci.* 22:1-19.
- Barnier, V. M. H., G. H. Geesink, F. J. M. Smulders, and J. G. Van Logtestijn. 1992. Rate of glycolysis, chilling rate and beef quality: An inventory of potential consequences. *Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol.*, Clermont-Ferrand, France.
- Bee, G., S. M. Lonergan, and E. Huff-Lonergan. 2004. Early postmortem pH influences proteolysis of cytoskeletal proteins during aging in porcine *longissimus* muscle. *J. Anim. Sci.* 82(Suppl. 1):13.
- Beltrán, J. A., I. Jaime, P. Santolaria, C. Sañudo, P. Albertí, and P. Roncalés. 1997. Effect of stress-induced high postmortem pH on protease activity and tenderness of beef. *Meat Sci.* 45:201-207.
- Bruce, H. L. and R. O. Ball. 1990. Postmortem interactions of muscle temperature, pH and extension on beef quality. *J. Anim. Sci.* 68:4167-4175.
- Davis, K. J., J. G. Sebranek, E. Huff-Lonergan, and S. M. Lonergan, 2004. The effects of aging on moisture-enhanced pork loin. *Meat Sci.* 66:519-524.
- Dransfield, E. 1981. Eating quality of DFD beef. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 10:344-361.
- Dransfield, E. 1994. Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Sci.* 36:105-121.
- Dransfield, E., D. J. Etherington, and M. A. J., Taylor. 1992. Modeling post-mortem tenderization-II: enzyme changes during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. *Meat Sci.* 31, 75-84.
- Edmunds, T., P. A. Nagainis, S. K. Sathe, V. F. Thompson, and D. E. Goll. 1991. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1077:197-208.
- Geesink, G. H. and M. Koohmaraie. 1999. Effect of calpastatin degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *J. Anim. Sci.* 77:2685-2692.
- Geesink, G. H., S. Kuchay, A. H. Chishti, and M. Koohmaraie. 2006. μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.* 84:2834-2840.
- Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Q. Li, W. Wei, and J. Y. Cong, 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731-801.
- Goll, D. E., V. F. Thompson, R. G. Taylor, and J. A. Christiansen. 1992. Properties and regulation of the calpain system and its role in muscle growth. *Biochimie* 74:225.
- Hamm, R. 1982. Postmortem changes in muscle with regard to processing of hot-boned beef. *Food Technol.* 11: 105-115.
- Harrell, R. A., T. D. Bidner, and E. A. Icaza. 1978. Effect of altered muscle pH on beef tenderness. *J. Anim. Sci.* 46:1592-1596.
- Herrera-Mendez, C., S. Becila, A. Boudjellal, and A. Ouali. 2006. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci. Technol.* 17:394-405.
- Huff-Lonergan E. and S. M. Lonergan. 1999. Postmortem mechanisms of meat tenderization. The roles of the structural proteins and the calpain system. In: Xiong *et al.* (Eds). *Quality attributes of muscle foods*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. pp 229-251.
- Huff-Lonergan, E. J. and S. M. Lonergan. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* 71, 194-204.
- Huff-Lonergan, E. J., S. M. Lonergan, and L. Vaske. 2000. pH relationships to quality attributes: tenderness. *Meat Sci. Recip. Series*.
- Hwang, I. H. and J. M. Thomson. 2001. The interaction between pH and temperature decline early postmortem on the calpain system and objective tenderness in electrically stimulated beef *longissimus dorsi* muscle. *Meat Sci.* 58:167-174.
- Ingolfsson, R. and E. Dransfield. 1991. The effects of low-voltage electrical stimulation and freezing on tenderization, enzyme activities, drip losses and cooking losses of lamb. *Icelandic J. Agri. Sci.* 5:63-80.
- Jones, B. K. and J. D. Tatum. 1994. Predictors of beef tenderness among carcasses produced under commercial conditions. *J. Anim. Sci.* 72:1492-1501.
- Kamstra, L. D. and R. L. Saffle. 1959. The effects of a pre-rigor infusion of sodium hexametaphosphate on tenderness and certain chemical characteristics of meat. *Food Technol.* 11:652-654.
- Kendall, T. L., M. Koohmaraie, J. R. Arbona, S. E. Williams, and L. L. Young. 1993. Effect of pH and

- ionic strength on bovine m-calpain and calpastatin activity. *J. Anim. Sci.* 71:96.
- Kent, M. P., M. J. Spencer, and M. Koohmaraie. 2004. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice over expressing calpastatin. *J. Anim. Sci.* 82: 794-801.
- Kinbara, Y., H. Sorimachi, S. Ishiura, and K. Susuki. 1998. Skeletal muscle specific calpain p 94. *Biochem. Pharma.* 56(4):415-420.
- Koohmaraie, M. 1988. The role of endogenous proteasas in meat tenderness. *Rec. Meat Conf. Proc.* 41:89.
- Koohmaraie, M. 1990. Quantification of Ca²⁺-dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. *J. Anim. Sci.* 68:659-665.
- Koohmaraie, M. 1992a. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle γ -calpain. *J. Anim. Sci.* 70:3071-3080.
- Koohmaraie, M. 1992b. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. *Recip. Meat Conf. Proc.* 45:63-73.
- Koohmaraie, M. and G. H. Geesink. 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.* 74:34-43.
- Koohmaraie, M., M. E. Doumit, and T. L. Wheeler. 1996. Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. *J. Anim. Sci.* 74:2935-2942.
- Koohmaraie, M., S. C. Seideman, J. E. Schollmeyer, T. R. Dutson, and J. D. Crouse. 1987. Effects of postmortem storage on Ca⁺⁺ dependent proteases, their inhibitor and myofibrilfragmentation. *Meat Sci.* 19:187-196.
- Kristensen, L., M. Christensen, and P. Ertbjerg. 2006. Activities of calpastatin, -calpain and m-calpain are stable during frozen storage of meat. *Meat Sci.* 72:116-120.
- Kristensen L., M. Peter, and P. Purslow. 2001. The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. *Meat Sci.* 58:17-23.
- Lee, S., J. V. Stevenson-Barry, R. G. Kauffman, and B. C. Kim. 2000. Effect of ion fluid on beef tenderness in association with calpain activity. *Meat Sci.* 56:301-310.
- Maddock, K. R., E. Huff-Lonergan, L. J. Rowe, and S. M. Lonergan. 2005. Effect of pH and ionic strength on γ - and m-calpain inhibition by calpastatin. *J. Anim. Sci.* 83:1370-1376.
- Marsh, B. B. 1981. Properties and behavior of prerigor meat. *Recip. Meat Conf. Proc.* 34 :75-80.
- Melody, J. L., S. M. Lonergan, L. J. Rowe, T. W. Huiatt, M. S. Mayes, and E. Huff-Lonergan. 2004. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J. Anim. Sci.* 82:1195-1205.
- Morton, J., D. Bickerstaffe, M. P. Kent, E. Dransfield, and G. M. Keeley. 1999. Calpain-calpastatin and toughness in *M. longissimus* from electrically stimulated lamb and beef carcasses. *Meat Sci.* 52:71-79.
- O'Halloran, G. R., D J, Troy, D. J., Buckley, and W. J. Reville. 1997. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fese glycolysing muscle. *Meat Sci.* 47:187-210.
- Offer, G. and P. Knight. 1989. The structural basis of water-holding in meat. In: Lawrie, R. A. (Ed). *Developments in Meat Sci.* Elsevier Appli. Sci. London. 4:173-243.
- Orlowski, M. 1990. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochem.* 29:10289.
- Pearson, A. M. and R. B. Young. 1989. *Muscle and Meat Biochemistry.* Academic Press, Inc. 395 p.
- Pike, M. M., T. P. Ringkod, D. D. Beekman, Y. O. Kob, and W. T. Gerthoffer. 1993. Quadratic relationship between early-post-mortem glycolytic rate and beef tenderness. *Meat Sci.* 34:13-26.
- Prigge, J. T., D. D. Kirkpatrick-Keller, and J. Killefer. 1998. Isolation and characterization of a calpain activator in chicken skeletal muscle. *Poult. Sci.* 77:1411-1416.
- Pringle, T. D., S.E. Williams, B. S Lamb, D. D. Johnson and R. L. West. 1997. Carcass characteristics, the calpain proteinase system and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred heifers. *J. Anim. Sci.* 75:2955-2961.
- Purchas R. W. 1990. An assessment of the role of pH differences in determining the relative tenderness of beef. *Meat Sci.* 27:129-134.
- Purchas R. W. and R. Aungsupakorn. 1993. Further investigations into the relationship between ultimate pH and tenderness for beef samples from bulls and steers. *Meat Sci.* 34: 163-178.
- Robert N., M. Briand, R. Taylor, and Y. Briand. 1999. The effect of proeosome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Sci.* 51:149-153.
- Robson, R. M., E. Huff-Lonergan, F. C. Parris, C. Y. Ho, M. H. Stromer, and T. W. Huiatt. 1997. Post-mortem changes in the myofibrillar and cytoskeletal proteins in muscle. In: 50th Annu. Recip. Meat Conf. Proc. Iowa, USA pp. 43-52.
- Rowe, L. J., E. Huff-Lonergan, and S. M. Lonergan. 2001. Desmin degradation influences water-holding capacity and tenderness of fresh pork. *J. Anim. Sci.*, 79(Suppl. 1): 443. Abstract.
- Shackelford, S. D., M. Koohmaraie, and J. W. Savell. 1994. Evaluation of *longissimus dorsi* muscle pH at three hours postmortem as a predictor of beef tenderness. *Meat Sci.* 37:195-204.

- Simmons, N. J., K. Singh, P. M. Dobbie and C. E. Devine. 1996. The effect of pre-rigor holding temperature on calpain and calpastatin activity and meat tenderness. In 42nd Intl. Cong. Meat Sci. Technol. Proc. Lillehammer, Norway. pp 414-415.
- Soria L. A. y P. M. Corva. 2004. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 12(2):73-88.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, and K. Susuki. 1997. Structure and physiological function of calpains. Biochem. 328:721-732.
- Takahashi, K. 1996. Structural weakening of skeletal muscle tissue during post-mortem ageing in meat. Meat Sci. 43:567-580.
- Taylor, R. G. and M. Koohmaraie. 1998. Effects of postmortem storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and *callipyge longissimus*. J. Anim. Sci. 76:2811-2817.
- Taylor, R. G., G. H. Geesink, V. F. Thompson, M. Koohmaraie, and D. E. Goll. 1995. Is Z-disk degeneration responsible for postmortem tenderization?. J. Anim. Sci. 73 :1351-1367.
- Unruh, J. A., C. L. Kastner, D. H. Kropf, M. E. Dikeman, and M. C. Hunt. 1986. Effects of low-voltage electrical stimulation during exsanguination on meat quality and display color stability. Meat Sci. 18:281-293.
- Uytterhaegen, L., E. Claeys, and D. Demeyer. 1992. The effect of electrical stimulation on beef tenderness, protease activity and myofibrillar protein fragmentation. Biochim. 74, 275-281.
- Wang, J. H. and S. T. Jiang. 1991. Properties of calpain II from Tilapia muscle (*Tilapia nilotica* x *Tilapia aurea*). Agri. Biol. Chem. 55:339-345.
- Warner, R. D., R. G. Kauffman, and M. L. Greaser. 1997. Muscle protein changes postmortem in relation to pork quality traits. Meat. Sci. 45:339-352.
- Watanabe, A., C. C. Daly, and C. E. Devine. 1996. The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during aging. Meat Sci. 42:67-78.
- Wheeler, T. L., S. D. Shackelford, and M. Koohmaraie. 2000. Relationship of beef longissimus tenderness classes to tenderness of gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. J. Anim. Sci. 78, 2856-2861.
- Whipple, G. and M. Koohmaraie. 1992. Effects of lamb age, muscle type and 24-hour activity of endogenous proteinases on postmortem proteolysis. J. Anim. Sci. 70:798-804.
- Winger, R. J. and C. G. Pope. 1981. Osmotic properties of post-rigor beef muscle. Meat Sci. 5:355-369.
- Wulf, D. M., J. B. Morgan, J. D. Tatum, and G. C. Smith. 1996a. Effects of animal age, marbling score, calpastatin activity, subprimal cut, calcium injection, and degree of doneness on the palatability of steaks from Limousin steers. J. Anim. Sci. 74:569-576.
- Wulf, D. M., J. D. Tatum, R. D. Green, J. B. Morgan, B. L. Golden, and G. C. Smith. 1996b. Genetic influences on beef longissimus palatability in Charolais and Limousin-sired steers and heifers. J. Anim. Sci. 74:2394-2405.
- Yu L. P. and B. Lee. 1986. Effects of postmortem pH and temperature on bovine muscle structure and meat tenderness. J. Food Sci. 51:774-780.
- Zhang, W. G, S. M. Lonergan, M. A. Gardner, and E. Huff-Lonergan. 2006. Contribution of post-mortem changes of integrin, desmin and μ -calpain to variation in water holding capacity of pork. Meat Sci. 74:578-585.