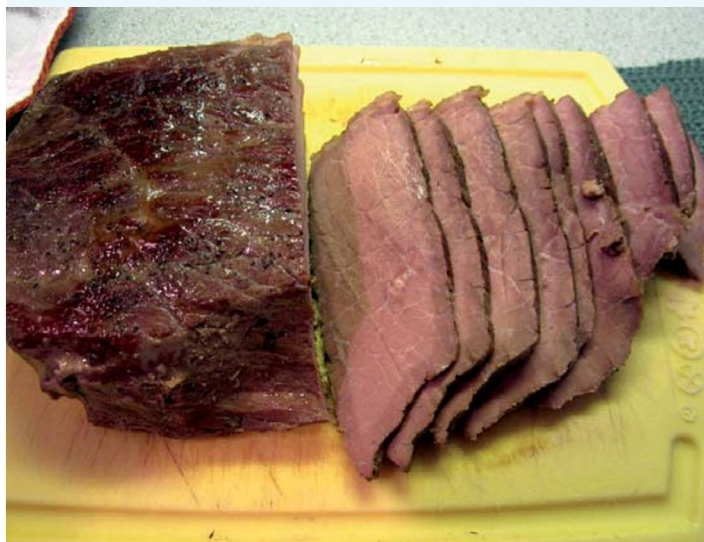


# Estimulación del sistema enzimático de las calpaínas con cloruro de calcio para el ablandamiento de la carne

Prof. Alejandro Chacón Villalobos - Universidad de Costa Rica. Costa Rica  
alejandro.chacon@ucr.ac.cr



## Introducción

A lo largo de muchos años, el estudio de los diferentes procesos relacionados con el mejoramiento de la suavidad de la carne ha sido una de las principales prioridades de los investigadores en la industria cárnica (Field *et al*, 1997). La razón de lo anterior se debe a una expectativa siempre constante entre los consumidores: la carne debe ser suave (tierna). La suavidad o ternera es reconocida irrefutablemente por una gran cantidad de investigadores como el parámetro más importante con que el consumidor juzga la calidad de la carne y por ende es de un gran peso cuando este establece la aceptación o el rechazo (Koochmaraie, 1994). Se considera que hasta un 25% de las experiencias de consumo de carne pueden ser insatisfactorias debido a una excesiva dureza (Smith 1997). La situación antes descrita, hace de resolver el problema de la inconsistencia en la suavidad una de las grandes prioridades del sector (Weaver & Lusk, 2010).

La contracción muscular postmortem se asocia profundamente con la dureza en la carne, condición que depende de los procesos desencadenados por la cantidad de glucógeno intramuscular al momento de la muerte, los metabolitos derivados del estrés sufrido por el animal durante el manejo previo, y de las interacciones fisicoquímicas del músculo, especialmente en cuanto a las proteínas y a la acidificación producto de la respiración anaeróbica se refiere (Hawkins, 1986; Chacón, 2004). El contenido

de tejido conectivo derivado de la edad y del tipo de músculo, así como la cantidad de grasa intramuscular, se pueden citar también como determinantes secundarios de la dureza (Nishimura *et al*, 1999) pero en una escala considerablemente menor, esto al tomar en cuenta que el manejo zootécnico antemortem generalmente tiene una gran injerencia en su control. Esto deja sobre el tapete la realidad de que son los procesos postmortem los más determinantes al establecer la dureza final (Taylor *et al*, 1995).

Basándose en la dureza como una función del grado de contracción muscular y secundariamente del contenido de colágeno, muchos han sido los métodos propuestos para el mejoramiento de la suavidad. La evidencia experimental reportada por varios autores (Koochmaraie, 1994; Buts *et al*, 1995; Taylor *et al*, 1995; Nowak, 2011), sugiere que la proteólisis de las proteínas miofibrilares de la carne es la principal causa del mejoramiento de la suavidad durante el almacenamiento postmortem, siendo el fundamento detrás de muchos de los métodos de suavizamiento. Entre las técnicas descritas por los diferentes autores pueden destacarse el estiramiento mecánico del músculo, el añejamiento madurativo a temperaturas controladas (Heinemann, 2003), el tratamiento con extractos enzimáticos vegetales (Quaglia *et al*, 1992) y microbianos (Takagi *et al*, 1992), y los tratamientos de presión neumática y mecánica (Solomon, 1998). No obstante su ingeniosidad, muchos de estos métodos presentan inconvenientes asociados a las posibilidades técnicas de factibilidad, espacio, tiempo, costo y equipos de muchos sistemas productivos, por lo cual no han sido aplicados con amplitud o en forma generalizada.

La estimulación eléctrica ha sido uno de los métodos viables señalados como una alternativa apropiada en los últimos años (Bostan *et al*, 2001). Aplicada al músculo inmediatamente después de la matanza, produce una baja acelerada en el pH que puede colaborar con una mejora en la suavidad; asimismo, se puede provocar la ruptura celular liberándose enzimas que, en conjunción con la contracción muscular generada, pueden provocar una disminución de la dureza de la pieza (Rodríguez *et al*, 1993). Sin embargo, según señalan algunos autores, este método puede, según las circunstancias de aplicación, presentar un incremento en las pérdidas por sinéresis durante la cocción de la pieza (Hwang *et al*, 2003; Polidori *et al*, 1996).

## Las calpaínas como clave del suavizamiento de la carne

Otra manera alternativa para estimular los procesos proteolíticos durante la maduración puede lograrse por medio de la estimulación de sistemas enzimáticos propios de la carne empleando para tal efecto sales como el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Clare *et al*, 1997). Amplia evidencia experimental indica que la ruptura de las proteínas claves responsables de la estructura muscular está relacionada a un sistema enzimático de proteasas neutras dependientes del calcio que se denominan genéricamente Calpaínas (Hopkins & Taylor, 2004; Huang *et al*, 2004). La literatura atribuye a este complejo enzimático más del 90% del suavizamiento que ocurre durante el almacenamiento madurativo de la carne (que en la industria suele ser de 2 a 7 días a una temperatura cercana a los  $7^\circ\text{C}$ ), teniendo así estas enzimas un papel crucial y preponderante en los cambios asociados con la maduración (Wheeler *et al*, 1992; Wheeler *et al*, 1993, Chacón, 2007). Aunque otros sistemas enzimáticos como las catepsinas y las proteinasas multi-catalíticas se han citado en el pasado, al parecer no son tan determinantes como las calpaínas a los valores de acidez propios de las condiciones postmortem (Hui, 2012). La posible participación activa de las caspasas en los procesos de apoptosis se especula también puede contribuir a la tenderización de la carne, aunque aún se estudian los mecanismos asociados (Nowak, 2011).

Las calpaínas, identificadas por primera vez en 1964, constituyen una amplia súper familia de proteinasas intracelulares citosólicas activadas por el ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cisteína específicas y manifiestas en muchas isoformas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos de los vertebrados y muestran una actividad regulada a valores de pH fisiológicos (Sorimachi *et al*, 1997; Suzuki, 1998). Este sistema enzimático se vincula especulativamente con funciones biológicas relacionadas con el  $\text{Ca}^{2+}$  tales como la mitosis, la diferenciación celular, transmisión de señales, regulación enzimática y procesos propios de la membrana plasmática (Goll *et al*, 1992; Suzuki, 1998; Goll *et al*, 1999).

Se registran para efectos prácticos tres calpaínas que se encuentran presentes en los animales vertebrados:  $\mu$ -calpaína,  $\mu/m$ -calpaína y m-calpaína (Sorimachi *et al*, 1997). En el músculo esquelético estas enzimas se encuentran en cantidades comparativamente similares, encontrándose acompañadas de la calpastatina, su inhibidor, y que tiene igual capacidad inhibitoria sobre las tres calpaínas (Goll *et al*, 1999)

La  $\mu$ -calpaína necesita de concentraciones micro molares de  $\text{Ca}^{2+}$  (3-50  $\mu\text{M}$ ) para alcanzar la mitad de su actividad máxima, mientras que la m-calpaína necesita de concentraciones mili molares (200-1000  $\mu\text{M}$ ). Por su parte la  $\mu/m$ -calpaína es activa a concentraciones que rondan los 3-1000  $\mu\text{M}$ , mientras la calpastatina actúa para todas las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$



## Medición de pH y temperatura en alimentos

- Punta de penetración combinada (pH y temperatura)
- Visualización simultánea de ambos valores
- Compensación automática (ATC)
- Electrodo fácilmente reemplazable por el usuario
- Solución de conservación gelificada
- Garantía del instrumento: 2 años
- Garantía del electrodo: 1 año

[www.testo.com.ar/alimentacion](http://www.testo.com.ar/alimentacion)

Av. Directorio 4901 (C1440ASB) - Bs. As. Argentina / Tel.: (011) 4683-5050 - Fax: (011) 4683-2020 / [info@testo.com.ar](mailto:info@testo.com.ar) - [www.testo.com.ar](http://www.testo.com.ar)



(Goll *et al*, 1992; Baki *et al*, 1996; Ono *et al*, 1998; Kinbara *et al*, 1998). El pH óptimo in vivo de las calpaínas generalmente ronda 7,2 y 8,2; aunque aún a valores de pH menores al óptimo se registra una actividad suficiente para generar, si se permite un período de maduración apropiado, un mejoramiento tangible en la suavidad de la carne (Goll *et al*, 1992). Mientras la  $\mu$ -calpaína parece tener el rol más activo en la proteólisis, la m-calpaína presenta un rol más pasivo dada su estabilidad, por lo que podría ser un actor menor en el proceso (Hui, 2012).

Como se mencionó anteriormente, las calpaínas suavizan las piezas de carne gracias a la ruptura parcial que provocan en el tejido muscular. Muchos estudios, entre ellos los reseñados por Goll *et al* (1992) y Taylor *et al* (1995) relacionan a las calpaínas en la degradación de la banda Z de los sarcómeros, la cual es rica en titina y nebulina, así como en la proteólisis degradativa de la tropomiosina y a las troponinas T e I. Se irrumpe así la estabilidad de los filamentos gruesos del sarcómero y de los monómeros de actina en la forma filamentosa. Las calpaínas degradan además la nebulina, la desmina, la titina y otras proteínas, las cuales mantienen la estabilidad de los filamentos gruesos y delgados, esto sin degradar a la actina y a la miosina. Todo lo anterior provoca el mejoramiento madurativo postmortem de la carne (Pérez *et al*, 2005).

La relación existente entre la función y estructura de las calpaínas, así como su mecanismo de regulación, su estructura tridimensional y su papel fisiológico, son aspectos sujetos a un estudio profundo digno en su momento de una disertación más amplia.

### **Aprovechamiento las calpaínas como un método de ablandamiento de la carne por medio de la inyección de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)**

Al considerar que la integridad y el grado de contracción de los sarcómeros, sumado a la acidificación final de la carne, son los principales determinantes de la consistencia final de la carne, y que las calpaínas como entes proteolíticos mellan estructuralmente a los sarcómeros disminuyendo dicha dureza, la conclusión lógica ha sido evaluar procedimientos que conjunten ambos hechos en busca de una mejoría en la calidad general. Trabajos pioneros, como los realizados por Wheeler *et al* (1992), Wheeler *et al* (1993) y Koohmaraie (1992), permitieron establecer la posible factibilidad del uso del CaCl<sub>2</sub> en conjunción con las calpaínas en estrategias para el mejoramiento de la suavidad cárnica, estableciendo estos investigadores los fundamentos de lo acá descrito.

Muchas han sido las pruebas que han señalado un incremento apreciable en la actividad de las calpaínas cuando estas se exponen al efecto del CaCl<sub>2</sub> agregado intencionalmente a la carne en la dosificación correcta (Clare *et al*, 1997). La marinación y la inyec-

ción mecánica son dos de las metodologías más estudiadas, reportando la bibliografía que esta última es la que ofrece los mejores resultados gracias a una distribución más uniforme de la disolución salina en la pieza, lo que estimula la acción proteolítica de las calpaínas sobre los sarcómeros. Esta metodología es teóricamente aplicable a todos los cortes de carne aprovechables en un animal, indiferentemente de la especie, edad, raza y sexo (Lourdes *et al*, 1998; Pérez *et al*, 2005). Además, al ser un proceso enzimático auto regulado, no provoca un ablandamiento excesivo de la pieza, generando un resultado final generalmente adecuado. Finalmente, el porcentaje de inyección requerido es lo suficientemente reducido para que no se registren sabores y olores indeseables en el producto. Asimismo, el costo del CaCl<sub>2</sub> apto para el uso en alimentos es generalmente bajo (Chacón, 2007).

La carne fresca puede ser en teoría inyectada en cualquier momento antes de los primeros 14 días posteriores al sacrificio, aunque para que tenga una practicidad industrial se recomienda hacerlo con celeridad una vez dada la resolución del rigor mortis para mejores resultados (Wheeler *et al*; 1993). La inyección anterior a la resolución del rigor mortis no está recomendada, pues el calcio contribuiría a dar una mayor contracción de la carne aumentando así la dureza final.

En la industria, la inyección propuesta podría realizarse mecánicamente con una bomba de inyección con cabezal de múltiples agujas (Clare *et al*, 1997). Una disolución de cloruro de calcio del 3% al 5% se inyecta en un volumen tal que el mismo corresponda al 5% del peso de las piezas, recibiendo cada una de ellas posteriormente un masaje para uniformizar la distribución (Wheeler *et al*, 1992; Wheeler *et al*, 1993). Es muy importante respetar el volumen de inyección, dado que volúmenes superiores al 5% (m/m) se asocian con sabores amargos intensos derivados del exceso de ión cloruro. La experiencia de quién redacta esta nota es que las características de operación de los equipos inyectoros, la concentración de la disolución, el volumen real de inyección y la distribución intramuscular efectiva del fluido, son todos parámetros que deben ajustarse en función de los resultados prácticos deseados, y en función de las condiciones propias de cada circunstancia operacional, por lo cual se brindan acá cuantificaciones generales sujetas como es claro a ajustes en la práctica.

La carne, una vez inyectada, se empaqueta al vacío como estrategia de retención de fluidos y de inocuidad, y se madura durante un período de siete días en refrigeración a 7°C si lo que se busca es un periodo donde trascorra la mayor parte de la actividad enzimática, aunque ya a los tres o cuatro días pueden obtenerse resultados quizás considerables como satisfactorios si se sopesa el costo/beneficio (Chacón, 2007). Durante la maduración en refrigeración, la actividad de las calpaínas y de la cal-

pastatina disminuye gradualmente llegando a un 60% para la m-calpaína y un 4% para la  $\mu$ -calpaína a los siete días del proceso (Boehm *et al*, 1998). El empaque al vacío además protege la superficie contra la desecación, reduce la oxidación y aumenta la vida útil, facilitando a la vez el almacenamiento. Una vez completado el período de maduración el tratamiento está terminado y la carne se encuentra lista para posterior procesamiento o distribución.

En ensayos piloto efectuados por el autor se lograron aumentos importantes en la suavidad para piezas duras de los cuartos traseros del animal (corte de Solomo\* en el sistema de cortes bovinos utilizado en Costa Rica). Un método como el descrito puede experimentarse para el mejoramiento de la calidad en cortes de pobre suavidad en nuestros países; inclusive en combinación con procedimientos como la cocción y el almacenamiento en cadena de frío. Por medio del proceso de cocción, eventualmente se favorecería más la suavidad de la pieza por desnaturalización del tejido conectivo remanente.

\*NR: músculo Biceps femoral (carnaza cuadrada)

### Literatura citada

- BAKI, A., TOMPA, P., ALEXA, A., MOLNÁR, O. & FRIEDRICH, P. 1996. Autolysis parallels activation of  $\mu$ -calpain. *Biochem. J.* 318: 897-901.
- BOEHM, M.L.; KENDALL, T.L.; THOMPSON, V.F.; GOLL, D.E. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *Journal of Animal Science* 76(9): 2415-2434
- BOSTAN, K. ; NAZLI, B.; ARUN, Ö. Ö. 2001. Effect of electrical stimulation on meat tenderness and microflora. *Veteriner Fakültesi Dergisi* 27 (2): 547-556.
- BUTS, B., CLAEYS, E. & DEMEYER, D. 1987. Protein fragmentation and meat tenderness. *Mededelingen Van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 52(4): 1529-1538.
- CHACÓN, A. 2004. La suavidad de la carne: implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana* 15(2):225-243.
- CHACON, A. 2007. Efecto de la inyección de CaCl<sub>2</sub> sobre la suavidad del corte de solomo (outside). *Agronomía Mesoamericana* 18(1): 37-54.
- CLARE, T.L., JACKSON, S.P., MILLER, M.F., ELLIOT, C.T. & RAMSEY, C.B. 1997. Improving tenderness of normal and callipyge lambs with calcium chloride. *Journal of Animal Science* 75: 377-385.
- FIELD, R.; McCORMICK, R.; BALASUBRAMANIA, V.; SANZO, D.; WISE, J.; HIXON, D.; RILEY, M.; RUS-SEL, W. 1997. Tenderness variation among loin steaks from A and C maturity carcasses of beifers similar in chronological age. *Journal of Animal Science* 75(3): 693-699.
- GOLL, D.E., TAYLOR, R.G., OUALI, A. & CHOU, R.R. 1999. The calpain system in muscle tissue. In *Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium Dependent Protease*. Taylor and Francis. Estados Unidos de América.
- GOLL, D.E., THOMPSON, V.F., TAYLOR, R.G. & ZELEWSKA, T. 1992. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? . *BioEssays* 14(8): 549-556.
- HAWKINS, R. 1986. Factors associated with the variation in beef tenderness. *Dissertation Abstracts International* 47(2): 448-449.
- HEINEMANN, R. J. B.; PINTO, M. F. 2003. Effect of different concentration of calcium chloride in texture and acceptability of aged beef. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23: 146-150.
- HOPKINS, D. L.; TAYLOR, R. G. 2004. Postmortem muscle proteolysis and meat tenderness. In: Pas, M. F. W.; Everts, M. E.; Haagsman, H. P. eds. *Muscle development of lives tock animals: physiology, gene tics and meat quality*. Massachusetts. CABI Publishig. 432 pp.
- HUANG, M.; ZHOU, G.; XU X.; WANG J. 2004. Mechanism of post mortem tenderization of beef. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* 20(1): 198-202.
- HUI, Y.H. 2012. *Handbook of meat and meat processing*. Second Edition. CRC Press, Florida. 1000p.
- HWANG, I. H.; DE VI NE, C. E.; HOPKINS, D. L. 2003. The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness. *Meat Science* 65 (2): 677-691.
- KINBARA, Y., SORIMACHI, H. ISHIURA, S. & SUSUKI, K. 1998. Skeletal muscle specific Calpain p94. *Bioch. Pharmacology* 56(4): 415-420.
- KOOHMARAIE, M. 1992. The role of Ca<sup>2+</sup> dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie* 74(3): 239-245.
- KOOHMARAIE, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science* 36 (1/2): 93-104.
- LOURDES, M., ESCALONA, H. & GUERRERO, I. 1998. Effect of calcium chloride marination on calpain and quality characteristics of meat from chicken, horse, cattle and rabbit. *Meat, Poultry and Game* 48(1-2): 125-134.
- NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKAHASHI, K. 1999. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: effect of marbling on beef tenderization. *Journal of Animal Science* 77: 93-104.
- NOWAK, D. 2011. Enzymes in tenderization of meat: the system of calpains and other systems a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* 61(4): 231-237.
- ONO, Y., SORIMACHI, H. & SUSUKI, K. 1998. Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245: 289-294.
- PEREZ, M. L.; GUERRERO, I.; GUTIERREZ, M. C.; BETANCOURT, J. M. 2005. Effect of calcium chloride marination and collagen content on beef, horse, rabbit and hen meat hardness. *J of Muscle Foods* 16(2): 141-154.
- POLIDORI, P., KAUFFMAN, R. & VALFRE, F. 1996. The effects of electrical stimulation on meat quality. *It. J. Food Sc.* 8(3): 183-199.
- QUAGLIA, G., LOMBARDI, M., BERTONE, A. & MENESATTI, P. 1992. Effect of enzymatic treatment on tenderness characteristics of freeze-dried meat. *Lebensmittel-Wissenschaft und Tech* 25(2): 143-149.
- RODRÍGUEZ, T., ZAGLUL, J. & HERNÁNDEZ, F. 1993. Efecto de la estimulación eléctrica en la suavidad de la carne. *Reviteca* 2(1-2): 12-17.
- SMITH, T. 1997. The beef tenderness challenge continue (en línea). Consultado 9 de febrero 2015. Disponible en <http://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/Post-Harvest%20Practices%20for%20Enhancing%20Beef%20Tenderness.pdf>
- SOLOMON, M. 1998. The hydrodyne process for tenderizing meat. In *Reciprocal Meat Conference Proceedings* 51: 171-176.
- SORIMACHI, H., ISHIURA, S. & SUSUKI, K. 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochemical Journal* 328: 721-732.
- SUZUKI, K. & SORIMACHI, H. 1998. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Letters* 433:1-4.
- TAKAGI, H., KONDOU, M., HISATSUKA, T., NAKAMORI, S., YING, C. & YAMASAKI, M. 1992. Effects of alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40(12): 2364-2368.
- TAYLOR, R., GEESINK, G.H., THOMPSON, V.F., KOOHMARAIE, M. & GOLL, D.E. 1995. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science* 73(5): 1351-1367.
- WEABER, R.L. & LUSK, J.L. 2010. The Economic Value of Improvements in Beef Tenderness by Genetic Marker Selection. *American Journal of Agricultural Economics* 92(5):1456-1471.
- WHEELER, T., KOOHMARAIE, M. & CROUSE, J. 1992. The effect of postmortem time of injection and freezing on the effectiveness of calcium chloride for improving beef tenderness. *Journal of Animal Science* (70): 3451-3457.
- WHEELER, T., KOOHMARAIE, M., LANDSDELL, J., SIRAGUSA, G. & MILLER, M. 1993. Effects of postmortem injection time, injection level and concentration of calcium chloride on beef quality traits. *Journal of Animal Science* (71): 2965-2974.