

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

LA SUAVIDAD DE LA CARNE: IMPLICACIONES FÍSICAS Y BIOQUÍMICAS ASOCIADAS AL MANEJO Y PROCESO AGROINDUSTRIAL¹

Alejandro Chacón¹

RESUMEN

La suavidad de la carne: implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial. Actualmente, el problema de la suavidad de la carne representa una gran preocupación entre los productores, dado que esta variable ha demostrado ser el principal criterio con base al cual los consumidores juzgan la calidad de la carne. El problema es especialmente importante si se considera que una de cada cuatro degustaciones de la carne resultan insatisfactorias para el consumidor. Este trabajo abordó los principales aspectos asociados con la suavidad de la carne tales como la estructura y composición de la carne, el fenómeno de la contracción muscular, los cambios bioquímicos post mortem como el rigor mortis y la maduración, y el efecto general debido a las operaciones del procesamiento industrial como la cocción y el congelamiento. Métodos generales para el mejoramiento de la suavidad son discutidos, así como la actividad bioquímica e importancia de las enzimas CALPAINAS (calcium ion dependent papain like cysteine proteases).

Palabras claves: carne, bioquímica, suavidad, calpaina, enzimas.

ABSTRACT

Meat tenderness: Physical and biochemical facts related to agricultural and industrial process. Nowadays, the problem of meat tenderness is of great concern among producers because this parameter has become the most important criteria upon which consumers judge meat quality. This problem is especially critical when it is also a proven fact that one of every four sensorial experiences of the consumer is unsatisfactory when eating meat. This paper overviews the main aspects determining meat tenderness such as structural and chemical composition of meat, muscular contraction, biochemical postmortem changes (rigor mortis and meat aging) and the general effects caused by industrial processing when cooking and freezing. General methods for improving meat tenderness and the biochemical activity of the calcium ion dependent papain like cysteine proteases (CALPAIN) are also reviewed.

Key words: meat, biochemistry, tenderness, calpain, enzymes.



Aspectos generales sobre la carne y su aceptabilidad

La importancia de la carne como fuente de alimentación para el ser humano data de tiempos muy primitivos tal y como lo demuestran numerosos documentos de muy diferentes culturas (Belitz *et al.* 1985). Con el desarrollo de la ganadería, la carne toma su papel primordial en la dieta humana, no estando exenta sin embargo de manifiestos problemas en su calidad que desde entonces constituye un reto importante para el productor. Es así como a medida que se fueron desarrollando las diferentes civilizaciones sobre la faz de la tie-

rra, el hombre fue dando una gran importancia no sólo a la fuente de la carne que consume, sino también al manejo de la misma una vez obtenida (Libby 1986). Procesos como la salazón, el ahumado y el secado ya eran comunes en los tiempos prehistóricos (Prince *et al.* 1976), y constituían fuentes de conservación básica para el ganadero primigenio. Al día de hoy, el estudio de la carne y de su calidad constituye una de las principales áreas que integran la investigación en ganadería de engorde y tecnología de los alimentos (Rodríguez 1986). La razón es simple, pues es en el manejo, sacrificio y posterior conservación y preparación de la carne,

¹ Recibido para publicación el 27 de febrero de 2004.

² Estación Experimental Alfredo Volio Mata. Facultad de Ciencias Agroalimentarias.

es como se define la calidad y la suavidad de la misma, por lo cual una adecuada sincronización de estas variables genera una mejor aceptación y por ende mayores posibilidades para el ganadero y el industrial.

En un sentido estricto y para el lenguaje popular, se define como carne a la musculatura esquelética de los animales de sangre caliente tales como el ganado ovino, vacuno, porcino o aún equino. Desde un punto de vista legal y más amplio, el concepto de carne se hace extensivo a todas aquellas partes de los animales de sangre caliente que el hombre utiliza para su alimentación (Belitz *et al.* 1985). Desde esta perspectiva, también se incluyen entonces las vísceras, la grasa, la sangre y los órganos tales como la lengua, el hígado, los riñones, los sesos, etc (Potter 1978; Belitz *et al.* 1985). La carne de las aves y los peces tienden a ser llamadas carnes blancas para diferenciarlas de la carne proveniente de animales de cuatro patas o carnes rojas (Potter 1978).

Como alimento, la carne es una fuente primaria de proteínas de alta calidad, vitaminas y de minerales como el hierro (Rodríguez 1986). La composición de la carne varía según la especie, la edad y el sexo. Estas diferencias no deben ser vistas como curiosidades derivadas del análisis, pues en gran parte determinan la aceptación y la calidad sensorial final de la carne (Cole *et al.* 1975). La composición química típica de la carne proveniente de los mamíferos se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química porcentual del músculo esquelético en los mamíferos después del *rigor mortis* pero antes de los cambios degradativos *post mortem*.

Componente	Porcentaje (%)
Agua	75,0
Proteína miofibrilar	11,5
Proteína sarcoplasmática	5,5
Tejido conectivo	2,0
Grasa	2,5
Carbohidratos	1,2
Sustancias misceláneas	2,3

Fuente: Cole & Lawrie, 1975.

La jugosidad, el sabor y la suavidad son los principales componentes sensoriales asociados con la carne (Epley 1992). Mientras que la jugosidad y el sabor ciertamente contribuyen con el agrado general, los consumidores catalogan a la suavidad como el variable más importante asociado a la aceptación final de la carne (Smith 1997). Lo anterior es de gran importancia, sobretodo si se considera que aunque la jugosidad y el sabor normalmente no varían significativamente, la dureza puede variar considerablemente entre un corte y otro (Epley 1992).

La inconsistencia en la suavidad de la carne es un gran problema que afecta a la industria (Field *et al.* 1997). Muchos consumidores coinciden en que la carne es en muchas ocasiones dura, tanto así que una de cada cuatro experiencias de consumo resulta insatisfactoria (Smith 1997). Datos como este hacen que la investigación de metodologías orientadas a solucionar este problema sea de una alta prioridad industrial hoy en día (ABBA 1998).

Factores relacionados con la suavidad de la carne

Muchos son los factores asociados a la dureza que son descritos por la bibliografía. Entre ellos se puede mencionar el tamaño del músculo, existiendo mayor suavidad a menor tamaño, la localización del músculo en el animal vivo, la función fisiológica del músculo (Bayliss 1995), la edad del animal, la especie (British Nutrition Foundation 1988), el sexo, factores genéticos (Epley 1992), procesos industriales posteriores a la matanza (Smith 1999; Bayliss 1995), y hasta el temperamento del animal (Voisinet *et al.* 1997). Contrariamente a la creencia popular, el tipo de alimentación suministrada al animal no tiene un efecto importante o al menos de relevancia práctica en la dureza (Epley 1992; Mills *et al.* 1992; Jeremiah *et al.* 1998; Sinclair *et al.* 1998), siendo únicamente de interés cuando en la dieta se incluyen arbitrariamente β antagonistas como el cimaterol y el clenbuterol que pueden favorecer el endurecimiento (Berge *et al.* 1993; Speck *et al.* 1993; Eisemann 1996; Simmons *et al.* 1997). Estas sustancias constituyen un grupo de compuestos que emulan la acción bioquímica de la adrenalina y la noradrenalina (Eisemann 1996).

Todos los factores anteriores comparten un fundamento común: la composición de la carne y el comportamiento de esta posteriormente al sacrificio. Fundamentalmente la dureza de la carne se encuentra determinada por la ultra estructura que conforman los diferentes componentes de la misma tales como las proteínas, la grasa y el tejido conectivo, así como por la cantidad y calidad de estos componentes (Willems *et al.* 1997, Takahashi 1992, Epley 1992, 1998, Texas A&M University 1999, Rodríguez 1986). De este modo la composición y organización estructural sumadas a los cambios bioquímicos postmortem son elementos importantes al describir el mecanismo que define la textura final de un corte de carne (Ouali 1990).

Componentes estructurales del músculo asociados con la textura

La grasa (Nishimura *et al.* 1999), el tejido conectivo (Bruce *et al.* 1990) y las proteínas miofibrilares

(Foegeding *et al.* 1995) han sido descritos como factores relacionados con la textura de la carne.

Grasa

Mucha de la grasa presente en el animal vivo es eliminada una vez que el mismo es sacrificado (Swatland 1999). La principal relación atribuida a la grasa con respecto a la suavidad de la carne radica en el hecho de que esta podría depositarse intramuscularmente en forma abundante en los animales bien alimentados. Como resultado se produce un debilitamiento del tejido conectivo intramuscular mejorándose en teoría la textura general (Nishimura *et al.* 1999). No obstante, este proceso denominado "marmoleo" ó "marbling" (Potter 1978), es en teoría sólo aplicable a ciertos cruces de ganado que son capaces de depositar cantidades de grasa intramuscular no menores al 8% (Nishimura *et al.* 1999). Además la evidencia científica a este respecto no es muy abundante (Swatland 1999), estando la grasa entonces teóricamente más asociada a la jugosidad que a la dureza final.

Tejido conectivo

El tejido conectivo hace una contribución apreciable a la dureza de la carne (Swatland *et al.* 1997), más de la que se puede atribuir a la grasa. Se encuentra compuesto de dos fracciones principales: el colágeno y la elastina. La elastina corresponde a la fracción del tejido conectivo con propiedades más elásticas y suele encontrarse prioritariamente en aquellos músculos que presentan mucha actividad. Esta resiste condiciones químicas muy severas como la acidez, la alcalinidad y el calor que usualmente destruyen al colágeno; esto hace afortunado el que no sea muy abundante en general, pues de ser así se tendrían cortes muy duros por los cuales se podía hacer poco en términos del mejoramiento de la suavidad (Swatland 1997).

El colágeno es el principal componente del tejido conectivo (Zaglul 1983), y puede ser un aspecto relevante al analizar la textura. Se encuentra compuesto por fibrillas conformadas por largas moléculas de tropocolágeno. Estas moléculas a su vez están formadas por tres cadenas de polipéptidos entramados de manera tal que forman una triple hélice, estructura que otorga la estabilidad a la molécula de colágeno (Belitz *et al.* 1985). El contenido, la estabilidad, y el grado de enlace de las moléculas que conforman el tropocolágeno varía con el sexo, la edad y el tipo de músculo (Swatland 1997). A medida que los animales maduran, se da un aumento en los enlaces de tipo covalente entre las fibras que conforman las moléculas de colágeno, y más

importante aún, entre las moléculas individuales de colágeno. Estos enlaces, denominados puentes cruzados, aumentan la estabilidad y provocan una disminución de la proteólisis hidrolítica y de la solubilidad del colágeno, a la vez que hacen que este tejido no reaccione favorablemente al cocinado (Zaglul 1983). Por lo tanto puede afirmarse que el colágeno afecta la textura gracias a la estabilidad de los enlaces internos de las moléculas de tropocolágeno y de las moléculas de colágeno individuales entre sí; estabilidad que aumenta con la edad, la actividad, el género y la especie del animal (Cole *et al.* 1975). La proporción relativa de los puentes cruzados intermoleculares que son solubles con aquellos que son más estables e insolubles, constituye un factor de mayor peso al evaluar la textura que el contenido total de colágeno en sí (Zaglul 1983).

Proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas.

Amplia evidencia experimental otorga un papel preponderante a las proteínas miofibrilares por encima del colágeno en cuanto a la textura se refiere, no sólo por sus características estructurales sino además por los cambios bioquímicos postmortem en que estas se ven involucradas (Ouali 1990; Suzuki *et al.* 1993; Yamane *et al.* 1994; Geesink *et al.* 1995; Taylor *et al.* 1998).

Tradicionalmente las proteínas del músculo han sido divididas en dos grupos según su solubilidad en las disoluciones salinas. Así las proteínas sarcoplasmáticas son solubles en soluciones de baja fuerza iónica (0,05 M) mientras las miofibrilares lo son en las de alta fuerza iónica (0,5 M) (Hultin *et al.* 1995).

La actina, la miosina, las troponinas y la tropomiosina son las principales proteínas miofibrilares. La actina representa el 25% del peso de las proteínas miofibrilares y suele tener una masa de 43.000 Da aproximadamente (Murray *et al.* 1990). La forma básica de la actina es la actina G que es una cadena lineal delgada. Dos cadenas de G actina se polimerizan en una doble hélice lineal que en conjunto se denomina actina F. La tropomiosina es una molécula fibrosa lineal bicatenaria que se adhiere en el surco de la hélice que forman las dos actinas G cuando estas se agrupan para formar la actina F. A la tropomiosina a la vez se unen las troponinas que son tres moléculas llamadas TnT, TnI y TnC de peso molecular similar y cercano a los 17.000 Da. La fracción TnT une a la troponinas restantes con la tropomiosina; la fracción TnI interactúa con la miosina, mientras que la TnC tiene la capacidad de ligar Ca^{2+} . Dado su bajo peso molecular, las troponinas y la tropomiosina tienen poco efecto en la dureza final de un corte de carne desde un punto de vista de

resistencia física a la mordida (Heinze *et al.* 1994). No obstante bioquímicamente son vitales en el proceso de contracción muscular, por lo cual colaboran indirectamente a la textura final, dado que a mayor contracción muscular se genera más dureza en la carne (Murray *et al.* 1990). La miosina constituye un 55% de la proteína miofibrilar y es un hexámero lineal asimétrico de unos 46.000 Da. Está constituida por dos filamentos gruesos fibrosos de cabeza globular entrelazados en una doble hélice. La parte globular de la proteína puede interactuar con el ATP mientras la parte lineal no globular se une a la actina F.

En términos generales, un músculo esquelético se encuentra conformado por células alargadas y estrechas llamadas fibras las cuales se disponen en forma paralela unas con respecto a las otras. Las fibras se encuentran encerradas en una delicada membrana plasmática integrada por lipoproteínas, mucopolisacáridos y tejido conectivo denominada sarcolema (Price *et al.* 1976). Rodeando al sarcolema y separando cada fibra de las demás, se localiza una fina capa de tejido conectivo denominada endomisio. Las fibras integran conjuntos denominados haces, los cuales se encuentran a su vez rodeados por una capa ligeramente más gruesa de tejido conectivo denominada perimisio. De manera homóloga a las fibras, los haces de fibras musculares se agrupan para formar el músculo encontrándose rodeadas de una capa gruesa de tejido conectivo llamada epimisio.

Las fibras musculares constituyen las unidades celulares básicas del músculo (Swatland 1999). Son células multinucleadas y extremadamente largas que pueden llegar a medir varios centímetros. Cada fibra está compuesta por unidades denominadas miofibrillas, las cuales finalmente se encuentran integradas por un arreglo de proteínas miofibrilares (Cole *et al.* 1975). Las miofibrillas están incluidas en el citoplasma de cada célula muscular, el cual se denomina sarcoplasma (Price *et al.* 1976). En el interior de la fibra, las miofibrillas se encuentran envueltas longitudinalmente y cada una por separado por el retículo sarcoplasmático, el cual es un complicado sistema de vesículas y túbulos que revisten por completo a cada miofibrilla (Price *et al.* 1976).

Un arreglo entrecruzado de filamentos gruesos de miosina y delgados de actina conforman las miofibrillas. Estos arreglos se encuentran agrupados en unidades básicas secuenciales denominadas sarcómeros. Los sarcómeros conforman la unidad contráctil básica del músculo (Belitz *et al.* 1985; Swatland 1999), y tiene por ello una gran importancia en los procesos que determinan la dureza final de la carne (Swatland 1999).

Los sarcómeros se encuentran separados unos de otros por una estructura denominada línea Z. Adheridos perpendicularmente a la línea Z se encuentran filamentos delgados principalmente constituidos por actina. Dado que el sarcómero está delimitado por dos líneas Z, se tienen dos grupos de filamentos de actina, también denominados bandas I, dirigidos desde los extremos hacia el centro del sarcómero. En la parte central del sarcómero, entre las bandas I opuestas, se ubican unos filamentos gruesos formados por miosina que integran la llamada banda A. Los extremos de estos filamentos gruesos se enlazan a los extremos libres de las fibras de actina de las bandas I. En la parte central de la banda A existe una región denominada zona H, la cual corresponde a la parte de la banda A que no está ligada a las bandas I cuando el sarcómero está relajado. La zona H se encuentra a su vez dividida por una banda oscura denominada línea M, la cual tiene una función de soporte (Belitz *et al.* 1985). En la Figura 1 se detalla la organización estructural del músculo y del sarcómero.

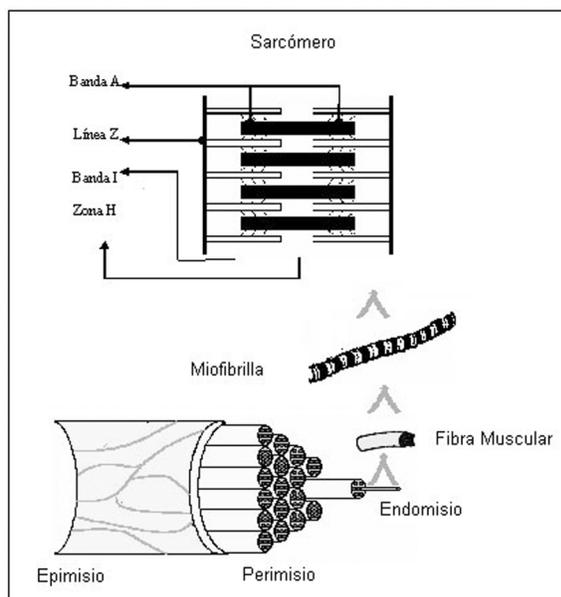


Figura 1. Organización ultraestructural del músculo.

Cambios Post-mortem en el procesamiento de la carne

Rigor mortis

El proceso de contracción muscular en el músculo viviente es en esencia un acortamiento del sarcómero

provocado por el movimiento relativo que se da entre los filamentos de actina y de miosina (Cole *et al.* 1975). Como reacción a un estímulo nervioso, se libera una señal en forma de acetilcolina que llega a la membrana del sarcómero donde se encuentra el retículo sarcoplasmático (Murray *et al.* 1990). El retículo sarcoplasmático mantiene grandes cantidades de Ca^{2+} inmovilizado gracias a una sustancia llamada calsecuestrina (Gordon *et al.* 2000). A través de canales transversales el calcio entra y se pone en contacto con los sarcómeros, aumentando la concentración de este ión hasta unos 10^{-5} mol/l. El ión se fija a la troponina TnC formándose el complejo TnC.4 Ca^{2+} (Murray *et al.* 1990). Esta unión cambia la conformación de la tropomiosina adherida a las troponinas, dándose un cambio de forma tal que hace que la tropomiosina se retire y permita a la actina y la miosina ponerse en contacto en el área de la cabeza globular de esta última. Se forma así una unión estable entre miosina y actina. Esta cabeza globular es capaz como se dijo de hidrolizar al ATP. Al efectuar esta hidrólisis parcial del ATP se forma en la cabeza un complejo llamado ADP-Pi-Miosina lo cual hace que esta cabeza cambie de forma y de posición (Gordon *et al.* 2000). Como la cabeza está muy unida a la actina, al cambiar de posición arrastra consigo a la actina (a la cual estaba unida) provocando un desplazamiento. Después de provocado el desplazamiento, la cabeza de miosina libera el ADP-Pi apenas entra en contacto con un nuevo ATP adoptando la configuración inicial y reiniciando el ciclo de modo que se va contrayendo cada vez más el músculo (Murray *et al.* 1990; Gordon *et al.* 2000). Así mientras la concentración de Ca^{2+} sea alta y exista ATP disponible el sarcómero continua contrayéndose. Este movimiento provoca en un sarcómero que los filamentos de actina ubicados en los extremos avancen uno hacia el otro, inclusive hasta el punto de traslaparse (Cole *et al.* 1975). Los filamentos gruesos se deslizan en medio de los delgados, de manera que la banda A mantiene un tamaño constante a medida que las bandas I se acercan una a la otra (Swatland 1998). Al desaparecer el estímulo el retículo sarcoplasmático retira el calcio que fue liberado al principio a través de bombas dependientes del calcio hasta que la concentración baja a menos de 10^{-7} mol/l; así el complejo TnC.4 Ca^{2+} desaparece; la tropomiosina se reacopla; termina la interacción actina-miosina y el proceso se revierte (Murray *et al.* 1990). La energía requerida para este proceso proviene de la hidrólisis del ATP (Belitz *et al.* 1985) y es muy importante notar que tanto para contraer como para relejar el músculo se requiere de ATP.

La contracción es muy importante al evaluar la dureza de la carne, dado que cuando los sarcómeros están contraídos, se presentarán más proteínas aglutinadas a lo largo de las fibras musculares (Rodríguez 1986). Así la carne con sarcómeros contraídos tiende a ser más du-

ra a medida que la contracción es más acentuada (Swatland 1999).

La organización estructural del sarcómero y los mecanismos de la contracción son muy importantes para entender la textura final, pues estos se intercalan con los procesos fisicoquímicos, enzimáticos y metabólicos propios de los cambios postmortem que transforman el músculo en carne destinada al consumo (Ouali 1992, Bruce *et al.* 1990, Taylor *et al.* 1995).

Una vez sacrificado y desangrado un animal finaliza el flujo de oxígeno al músculo, siendo la poca cantidad remanente en estos tejidos rápidamente consumido (Swatland 1999, Belitz *et al.* 1985). Bajo estas condiciones anaerobias el ciclo de Krebs se encuentra detenido. La necesidad de energía lleva a las células a consumir el ATP existente con rapidez, y a reponer el mismo usando ahora la vía glicolítica anaerobia. En este proceso por cada molécula de glucosa se generan dos moléculas de ATP y dos moléculas de piruvato (Bishop *et al.* 1999). Posteriormente, la enzima denominada lactato deshidrogenasa cataliza una reacción que integra un hidrógeno a la molécula de piruvato generando ácido láctico (Swatland 1999). La generación del ATP por esta vía continúa hasta el agotamiento del glucógeno. A medida que se alcanza este punto, se va presentando un descenso en el pH muscular a consecuencia de la acumulación de ácido láctico, llegándose hasta valores aproximados de 6,5 ó inclusive por debajo de 5,8 (Belitz *et al.* 1985).

La contracción y relajación muscular requieren del ATP como fuente energética. Antes de que una molécula de miosina pueda liberarse de la actina durante la contracción del sarcómero, es requerido el ATP. Al agotarse el ATP, la miosina se mantiene adherida a la actina aún si el músculo está tratando de relajarse (Swatland 1998). Como consecuencia al agotarse el ATP producido por la glicólisis anaerobia el músculo se endurece notablemente, estado que se denomina *rigor mortis* y que se alcanza entre las 10 y 24 horas posteriores a la muerte (Belitz *et al.* 1985). La caída del pH tiene influencia directa en la capacidad de retención del agua del músculo la cual es menor a bajos pH. Este descenso también altera las interacciones entre las proteínas miofibrilares afectando la fragmentación de las mismas y por ende la dureza final (Swatland 1999).

En base a lo antes mencionado es importante el control en el manejo del animal antes del sacrificio. Un animal que sufra de mucho maltrato antes del sacrificio es muy probable que sea presa del estrés e hiperactividad, iniciando como consecuencia la producción en vida de ácido láctico que posteriormente afectará la calidad de la carne. Así mismo si un animal no experimenta

un ayuno total controlado 24 horas antes de la matanza, es muy probable que al ser sacrificado posea mucha energía en forma de glucógeno en el músculo. Por ello este animal tendrá mucha fuente de glucógeno para transformarlo en ácido láctico durante el *rigor mortis* generando una mayor contracción y una acidez muy baja (Belitz *et al.* 1985). Ambos resultados no son deseables en la carne.

Maduración

Una vez completado el *rigor mortis*, se inician cambios en la carne que tienden a hacer que la misma se vuelva progresivamente más suave, a la vez que se mejora el sabor y el aroma (Jones *et al.* 1991; Epley 1992; Troy 1994; Xiong *et al.* 1996, Swatland 1999, Parrish 1999). Estos cambios que ocurren naturalmente en los tejidos musculares almacenados en refrigeración, ya sean empacados al vacío o suspendidos en la canal, se denominan en conjunto maduración. La mejoría en la suavidad alcanzada por medio de la maduración es generalmente común a todas las especies de ganado (Campo *et al.* 1999).

El proceso de maduración es en sí complejo, no obstante amplia evidencia experimental establece que los cambios se deben a la acción de sistemas enzimáticos endógenos los cuales se encuentran relacionados con la ruptura de las proteínas miofibrilares claves responsables de la estructura muscular (Buts *et al.* 1987; Taylor *et al.* 1995; Ouali 1992; Epley 1992; Troy 1994; Koohmaraie 1994; Parrish 1999; Swatland 1999). A diferencia de las proteínas miofibrilares, el tejido conectivo no es significativamente fragmentado y difícilmente cambia durante el período de maduración, por lo cual la mejoría en la suavidad no es atribuible a cambios importantes en el colágeno o la elastina (Stanton 1989; Takahashi 1992; Nishimura *et al.* 1998, Parrish 1999).

La entrada en acción de las enzimas proteolíticas está relacionada con el pH que se da en el músculo durante la formación del *rigor mortis*. Debido a esta variación abrupta del pH, se acelera el rompimiento de la membrana de los lisosomas, la cual es sensible a valores de pH extremos, liberándose así las proteasas causantes de la actividad autolítica (Rodríguez 1986; Purchas *et al.* 1993; Yu *et al.* 1986; Troy 1994; Beltrán *et al.* 1997).

Durante la maduración, el aumento en la suavidad se da rápidamente durante los primeros 3 ó 7 días, período después del cual esta mejoría es relativamente pequeña. Períodos de maduración más prolongados a temperatura de refrigeración pueden favorecer poco a la

suavidad, y ser causantes de sabores indeseables y crecimientos microbianos (Epley 1992; Parrish 1999).

El descenso en el pH, el *rigor mortis* y la maduración se encuentran muy estrechamente relacionados, sobretodo si se toma en cuenta que entre mayor sea la dureza que alcanza el músculo durante el rigor, es menos lo que la maduración puede hacer para revertir la misma (Swatland 1999).

Sistemas enzimáticos asociados con la proteólisis y la maduración

Los principales sistemas enzimáticos ligados con la degradación proteolítica del músculo son las colagenasas, las proteasas alcalinas, y principalmente las proteinasas neutras activadas por calcio y las catepsinas (Ashie *et al.* 1997).

Muchos autores coinciden en otorgar a las proteinasas neutras activadas por calcio ó calpaínas, un papel crucial y preponderante en los cambios asociados con la maduración, aún por sobre las catepsinas (Parr *et al.* 1999; Huang *et al.* 1998; Gil *et al.* 1998; O'Halloran *et al.* 1997; Simmons 1997; Hortos *et al.* 1994; Uytterhaegen *et al.* 1992; Uytterhaegen *et al.* 1994; Alarcón *et al.* 1995; Chow 1996; Cridge *et al.* 1994; Dransfield 1994; Koohmaraie 1994; Dransfield 1993; Wheeler 1998; Taylor *et al.* 1998; Prigge *et al.* 1998; Huang *et al.* 1998). Las catepsinas están más relacionadas con la proteólisis a temperaturas cercanas a los 20 °C, por lo cual en teoría no habrán de ser un factor de peso durante la maduración en refrigeración.

Las calpaínas constituyen una amplia súper familia de proteinasas intracelulares citosólicas dependientes del Ca²⁺, cisteína específicas y manifiestas en muchas isoformas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos y muestran una actividad regulada a valores de pH fisiológicos (Sorimachi *et al.* 1997; Suzuki *et al.* 1998; Prigge *et al.* 1998; Ono *et al.* 1998; Gilchrist 1999). Este sistema enzimático ha sido encontrado en todas las células de los vertebrados, aunque no existe evidencia de su presencia en plantas (Goll 1997). En los mamíferos se encuentran omnipresentes en todos los tejidos siendo sus características generales variables según la especie y la ubicación (Kawashima *et al.* 1998; Goll *et al.* 1999).

Identificadas por primera vez en 1964 en el cerebro de ratas, y purificadas finalmente por Ishura en 1978, las calpaínas fueron denominadas inicialmente como **CANP** por su nombre en inglés **Calcium Activated Neutral Protease** (Sorimachi *et al.* 1997; CaBP Data

Library 1999). Finalmente en 1991, siguiendo las recomendaciones de la Conferencia Internacional en Catabolismo Intracelular de Proteínas, se adopta el nombre **Calpain** el cual corresponde a la simplificación de **Calcium Ion Dependent Papain Like Cysteine Protease** (Sorimachi *et al.* 1997). A partir de calpain deriva el término castellano de calpaína, el cual es de uso común actualmente (Knecht 1999, Universidad Autónoma de Barcelona 1999).

En los mamíferos el sistema enzimático de las calpaínas está integrado por tres proteínas omnipresentes bien caracterizadas, y por varias formas complementarias que son específicas tanto de la especie como de cada tejido (Sorimachi *et al.* 1997; Goll 1999; Suzuki 1999; Sorimachi 1999). A pesar de que este sistema de enzimas ha sido bien caracterizado, la relación existente entre su función y su estructura, así como su mecanismo de regulación, su estructura tridimensional, y su papel fisiológico, son aspectos no del todo comprendidos hoy día (Goll *et al.* 1992; Baki *et al.* 1997; Goll 1997; Sorimachi *et al.* 1997; Elce *et al.* 1997; Ono *et al.* 1998; Suzuki 1999; Sorimachi 1999). Estas proteínas, que se consideran pertenecientes a un grupo evolutivo diferente al de otras proteasas como la papaína, las catepsinas y las caspasas (Sorimachi *et al.* 1997), se vinculan especulativamente con funciones biológicas relacionadas con el Ca^{2+} tales como la mitosis y la diferenciación celular, transmisión de señales, regulación enzimática y procesos propios de la membrana plasmática (Goll *et al.* 1992; Goll 1997; Suzuki *et al.* 1998). También pueden tener un papel en patologías degenerativas tales como la hipertensión, distrofia muscular, artritis reumatoide, cataratas y con la enfermedad de Alzheimer (Ono *et al.* 1997; Kinbara *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 1998).

Las cuatro calpaínas omnipresentemente manifiestas en los tejidos de los vertebrados se conocen con nombres derivados a partir de sus requerimientos de calcio: μ -calpaína, μ/m -calpaína, m-calpaína y la calpastatina. La μ/m -calpaína ha sido encontrada hasta el día de hoy sólo en aves (Sorimachi *et al.* 1997).

La μ -calpaína requiere de concentraciones micromolares de Ca^{2+} (3-50 μM) para alcanzar la mitad de su actividad máxima mientras que la m-calpaína necesita de concentraciones milimolares (200-1000 μM). La μ/m -calpaína es activa en el rango de 3-1000 μM y la calpastatina actúa como regulador o inhibidor de las tres formas antes mencionadas para todas las concentraciones de Ca^{2+} (Goll *et al.* 1992; Baki *et al.* 1996; Goll 1997; Ono *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 1998; Kinbara *et al.* 1998; Sorimachi *et al.* 1997; Goll *et al.* 1999). El pH óptimo *in vivo* de estas enzimas se estima entre 7,2 Y 8,2 (Goll *et al.* 1992). No obstante, aún a valores de pH menores al óptimo se registra una actividad de

las calpaínas que es suficiente para producir un mejoramiento apreciable en la suavidad de la carne, especialmente si se permite un período de maduración apropiado (Wheeler 2000).

En el músculo esquelético, la μ -calpaína, la μ/m -calpaína y la m-calpaína se encuentran generalmente en cantidades muy similares, existiendo suficiente calpastatina como para inhibir a todas ellas (Goll *et al.* 1992; Goll *et al.* 1999). La calpastatina tiene igual capacidad inhibitoria sobre las tres calpaínas (Sorimachi 1999; Suzuki 1999), acción que sólo puede efectuar en presencia de calcio (Kinbara *et al.* 1998).

Las calpaínas μ , μ/m y m están constituidas sin excepción por dos subunidades diferentes asociadas entre sí, de manera tal que cada calpaína es en realidad un heterodímero. Así cada calpaína está conformada por una subunidad larga de aproximadamente 80 kDa llamada μCL , μ/mCL ó mCL según el tipo de calpaína, y por una subunidad pequeña de aproximadamente 30kDa que es idéntica en los tres tipos de proteasa y que es denominada 30K (Sorimachi *et al.* 1997; Ono *et al.* 1998; Kinbara *et al.* 1998; Sorimachi 1999; Suzuki 1999).

Tal y como se puede apreciar en la Figura 2, tanto la unidad larga como la corta pueden dividirse en secciones denominadas dominios, los cuales presentan diferentes características funcionales. La unidad larga está conformada por cuatro dominios. La función de los dominios I y III de la subunidad larga aún no ha sido esclarecida

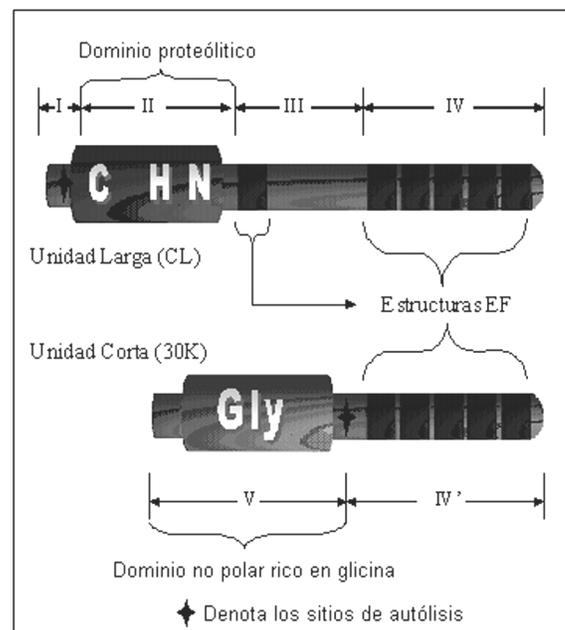


Figura 2. Estructura esquemática de las subunidades larga y corta que conforman el heterodímero en las calpaínas.

(Sorimachi *et al.* 1997; Ono *et al.* 1998), aunque se especula que el dominio I puede estar relacionado con la regulación de la activación de la enzima y el dominio III puede tener un papel en la identificación de los sustratos (Sorimachi 1999; Suzuki 1999). El dominio II corresponde a la sección proteolítica que contiene residuos catalíticos de cisteína, asparagina e histidina. Este dominio posee una secuencia de aminoácidos muy similar al de otras proteasas de cisteína como las catepsinas y la papaína, lo cual explica el origen del término "calpain" (Ono *et al.* 1998). Dado que el dominio II es propio de las subunidades largas, la actividad proteolítica de las calpaínas es ejecutada exclusivamente por estas subunidades (Sorimachi *et al.* 1997; Ono *et al.* 1998; Kinbara *et al.* 1998). El dominio IV corresponde a una sección proteica muy similar a la calmodulina, y tiene la función de ligar el Ca^{2+} utilizando para tal efecto cinco estructuras denominadas EF. Una sexta estructura EF independiente del dominio IV se ubica entre el II y III dominio (Ono *et al.* 1998).

La subunidad corta 30K está integrada por dos dominios. El dominio V corresponde a una región N-terminal integrada principalmente por residuos de glicina y poseedora de una naturaleza hidrofóbica que se presume permite interacciones con las membranas celulares. Finalmente está el dominio IV' el cual es de naturaleza muy similar al dominio IV de la subunidad larga. El dominio IV' también liga Ca^{2+} y posee igualmente cinco estructuras EF (Sorimachi *et al.* 1997, Ono *et al.* 1998, Kinbara *et al.* 1998, Sorimachi 1999, Suzuki 1999). No obstante, la estructura EF terminal no liga Ca^{2+} , sino que está más relacionada con la formación del heterodímero.

Ha sido sugerido que las unidades largas y cortas pueden asociarse, en ausencia de Ca^{2+} , para dar origen a la estructura de heterodímero gracias la interacción no polar recíproca de la quinta estructura C-terminal EF de los dominios IV y IV' respectivamente (Sorimachi *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 1998, Sou *et al.* 1999). Por medio de la formación del heterodímero, tanto la fracción larga como la corta adquieren una mayor estabilidad (Sorimachi *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 1998).

El papel de la 30K no es del todo comprendido aunque se sabe que su presencia es necesaria para que se registre la actividad proteolítica. Se especula que esta subunidad actúa como "chaperona" de la subunidad larga regulando la sensibilidad de esta por el calcio. Dado que la 30K es común a todos los tipos de calpaína, las diferencias presentes en cuanto a los requerimientos de calcio dependen de la fracción larga que es la que varía, ejerciendo la 30K su actividad reguladora según las características de cada fracción larga (Sorimachi 1999; Suzuki 1999). Así es definitiva, cada calpaína está consti-

tuida por dos unidades asociadas en una estructura de heterodímero: Una fracción larga sobre la que recae la actividad proteolítica y una fracción corta reguladora común a todas las calpaínas (Sorimachi *et al.* 1997; Ono *et al.* 1997; Hahn-Jun *et al.* 1998; Kinbara *et al.* 1998; Ono *et al.* 1998; Sou *et al.* 1999; Sorimachi 1999; Suzuki 1999).

En cuanto a la conformación de la calpastatina, es poco lo que se conoce, pues aún no se ha esclarecido del todo su estructura secundaria exacta (Sorimachi *et al.* 1998). En rasgos generales, se considera que es un polipéptido integrado por cuatro secciones ó dominios inhibidores muy similares de aproximadamente 140 aminoácidos cada uno, y de una sección N-terminal denominada dominio L de tamaño muy variable y hasta inexistente según la especie animal (Goll *et al.* 1999). Cada una de las cuatro secciones homólogas tiene actividad inhibitoria sobre las calpaínas. Se estima que la calpastatina que se encuentra en el músculo de los bovinos es una unidad de 125 kDa (Shannon *et al.* 1985, Goll *et al.* 1999).

Los mecanismos de activación y de acción de las calpaínas son en el presente del todo hipotéticos, y por lo tanto no definitivos (Goll *et al.* 1992; Elce *et al.* 1997; Suzuki *et al.* 1998; Suzuki 1999; Sorimachi 1999). Uno de los aspectos polémicos hasta la fecha es el cómo las calpaínas pueden ser activas *in vivo*, si las concentraciones de Ca^{2+} que las mismas requieren *in vitro* son mucho más elevadas que aquellas que se puede esperar se presenten en una célula (Goll *et al.* 1992; Goll 1997; Suzuki *et al.* 1998; Sorimachi *et al.* 1997). En épocas recientes se ha propuesto un modelo de cascada, en el cual la μ -calpaína, al requerir bajas concentraciones de Ca^{2+} se activa primero y baja la necesidad Ca^{2+} de la m-calpaína, permitiendo la activación de esta última en el ámbito celular (Tompa *et al.* 1996, Sorimachi *et al.* 1997). Bajo este modelo, las calpaínas se consideraban más bien como proenzimas inactivas hasta el momento en que el Ca^{2+} se ligaba a los dominios IV y IV', provocado así cambios conformacionales que conducían a la autólisis de las subunidades largas y cortas; la unidad larga así liberada estaba lista entonces para ejercer su acción proteolítica (Goll *et al.* 1992; Kinbara *et al.* 1998).

Actualmente es más aceptado el así llamado mecanismo de disociación-autólisis, el cual enriquece el mecanismo de cascada con nuevos elementos generados por la evidencia experimental. En teoría, al ligarse el Ca^{2+} a los dominios IV y IV', se provoca dentro de la calpaína un cambio conformacional conocido como translocación, el cual hace que las regiones no polares relacionadas con dichos dominios queden expuestas en la superficie de la molécula (Goll *et al.* 1992; Elce *et al.*

1997, Suzuki *et al.* 1998). Se estima que las subunidades largas ligan entre una y dos moléculas de Ca^{2+} mientras que las 30K ligan 4 moléculas (Goll *et al.* 1992; Sorimachi *et al.* 1997).

La cantidad de Ca^{2+} necesaria para la translocación es mucho más baja que la observada para la separación completa de las subunidades *in vitro*. A diferencia de las condiciones *in vitro*, en la célula viva existen fosfolípidos y otros activadores que pueden interactuar con la forma translocada de la calpaína y hacer que esta se disocie en las subunidades larga de 80 kDa y corta de 30kDa a concentración de Ca^{2+} significativamente bajas (Suzuki *et al.* 1998). Por otro lado, si existe suficiente calcio, los fosfolípidos de la membrana pueden catalizar también una reacción de autólisis entre las subunidades corta y larga, al bajar el requerimiento de calcio para esta reacción que así puede ocurrir en el ámbito fisiológico (Suzuki *et al.* 1998). Se da así una vía alternativa que puede coexistir con la simple disociación. Durante la autólisis, la masa de la subunidad larga queda reducida a 76 kDa y la de la subunidad corta a 18 kDa, lo anterior debido a la pérdida de 91 aminoácidos de la región N terminal rica en glicina de la subunidad corta y de 19 ó 27 aminoácidos de la región N terminal de la subunidad larga (Goll *et al.* 1992, Su-

zuki *et al.* 1998). Es de esperar que la μ -calpaína se active directamente por medio de la vía de disociación-autólisis, y que ésta una vez activa contribuya a activar la m-calpaína, aunque se supone que el mecanismo global para la activación de la m-calpaína puede ser más complejo aún (Suzuki *et al.* 1998).

Así tanto por disociación, como por autólisis (Elce *et al.* 1997), se pueden lograr formas activas de las calpaínas para bajos requerimientos de Ca^{2+} por interacción de la forma translocada con los fosfolípidos. El esquema del mecanismo de activación de una calpaína se detalla en la Figura 3.

La calpastatina por su parte actúa como inhibidor altamente específico de las calpaínas (Hang-Jun *et al.* 1998). Esta se liga a los dominios IV y IV' de las subunidades cortas y largas evitando así la posibilidad de que el Ca^{2+} pueda interactuar con estas regiones (Sorimachi *et al.* 1998). El efecto inhibitorio reduce tanto la velocidad como la magnitud del efecto proteolítico de las calpaínas (Geesink *et al.* 1999). El mismo puede ser parcial aún en presencia de un exceso de calpastatina (Geesink *et al.* 1998). Dado que tanto en el heterodímero como en las formas disociadas y autolizadas, los dominios IV y IV' son completamente funcionales, la

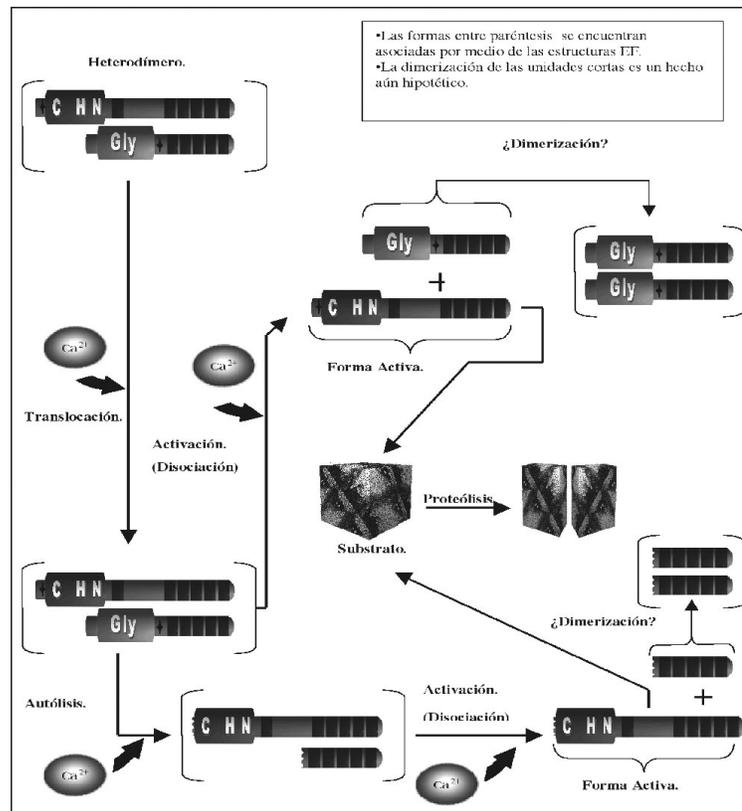


Figura 3. Diagrama del mecanismo de disociación-autólisis de las calpaínas.

calpastatina puede inhibir a cualquiera de estas formas (Goll *et al.* 1992).

La calpastatina varía en tamaño y cantidad según la especie animal, por ello la cantidad de calpaínas inhibidas por cada molécula de calpastatina es variable y generalmente fluctúa entre tres y cuatro moléculas de calpaína por cada molécula de calpastatina (Goll *et al.* 1992). En el ganado bovino, la raza cebuina se caracteriza por tener gran cantidad de calpastatina (Pringle *et al.* 1996). Para que el efecto inhibitorio pueda darse es necesaria la presencia de calcio, pero en cantidades mucho menores a las requeridas para iniciar la activación de las calpaínas (Goll *et al.* 1992, Yang *et al.* 1994, Kinbara *et al.* 1998). La presencia de β -antagonistas se supone incrementa significativamente la actividad de la calpastatina (Goll *et al.* 1999).

Tanto las calpaínas como la calpastatina, que se localizan intracelularmente en forma exclusiva, no se encuentran libres en el citoplasma de las células musculares (Goll *et al.* 1999). Estas enzimas se encuentran localizadas mayoritariamente en la línea Z de los sarcómeros, y en menor cantidad se encuentran presentes en la banda I (Dayton *et al.* 1981, Kumamoto *et al.* 1992; Spencer *et al.* 1992, Goll *et al.* 1999). Muchos estudios han evidenciado el papel de las calpaínas en la degradación de la banda Z, rica en titina y nebulina, y de otras proteínas que sirven de unión entre las miofibrillas y la membrana plasmática, aspectos que están directamente relacionados con el mejoramiento *post-mortem* de la suavidad (Goll *et al.* 1992, Taylor *et al.* 1995, Savell 1998, Goll *et al.* 1999). Las calpaínas degradan a la tropomiosina y a las troponinas T e I. Estos sustratos contribuyen con la estabilidad de los filamentos gruesos y en el mantenimiento de los monómeros de actina en la forma filamentosa. Además degradan la nebulina, la desmina y la titina, las cuales mantienen la estabilidad del enrejado que forman los filamentos gruesos y delgados; eliminan varias proteínas conocidas como C y M que mantienen las moléculas de miosina ensambladas en los filamentos gruesos; y no degradan la actina y la miosina (Goll *et al.* 1991, Goll *et al.* 1999). Así, los tres tipos de calpaínas descritos degradan estructuralmente el sarcómero por igual, pero no degradan significativamente a la actina y a la miosina en aminoácidos (Goll *et al.* 1999). La habilidad para degradar las proteínas responsables del mantenimiento de la estructura miofibrilar; la localización en el citoplasma de las células esqueléticas; el contacto directo con los sustratos; y el presentar actividad a valores de pH y de fuerza iónica propios del citoplasma; son características únicas y sólo presentes en las calpaínas que hacen de estas el principal sistema proteolítico responsable de la proteólisis *post-mortem* (Koohmaraie 1992, Goll *et al.* 1999).

En los últimos años un nuevo miembro de la familia de las calpaínas que es predominante en el músculo fue identificado y denominado p94. Dicha proteasa posee una estructura muy similar a las calpaínas anteriormente conocidas y tiene la particularidad de presentar una muy rápida autólisis y de no ser inhibida por la calpastatina (Kinbara *et al.* 1998, Sorimachi *et al.* 1997, Sorimachi 1999, Suzuki 1999). La misma se asocia con la titina y la conectina en el músculo esquelético (Suzuki 1999). Sin embargo, no está claro si esta nueva calpaína posee efectos similares sobre las miofibrillas a los que poseen las otras calpaínas, aunque se supone que este efecto es muy diferente y no contribuye significativamente al mejoramiento de la suavidad de la carne (Sorimachi 1999, Suzuki 1999). Mucho de lo concerniente a esta novel calpaína es del todo hipotético (Suzuki 1999).

Métodos para el mejoramiento de la suavidad de la carne

Inyección con cloruro de calcio

Basándose en el potencial de las calpaínas como agentes proteolíticos que mellan estructuralmente a los sarcómeros, y habiéndose establecido que el grado de contracción y la integridad de los mismos es el factor determinante en la dureza final de la carne; muchas han sido las pruebas que hasta el día de hoy han demostrado exitosamente un incremento apreciable en la actividad de las calpaínas cuando estas se exponen al efecto de CaCl_2 agregado intencionalmente a la carne (Koohmaraie 1992, Wheeler 1998). De las diferentes formas de aplicación, entre ellas la marinación, es la inyección mecánica la que ofrece los mejores resultados gracias a la distribución más uniforme de la disolución salina en la pieza (Wheeler 1998). El cloruro de calcio no puede ser suministrado directamente en la dieta del ganado, pues causaría desórdenes graves que generalmente tienen como consecuencia la muerte del animal (Wheeler 1998).

La inyección mecánica de cloruro de calcio en piezas de carne, puede ser empleada como un método para estimular la acción de las calpaínas y obtener así una mayor suavidad gracias a la acción proteolítica de dichas enzimas sobre las líneas Z de los sarcómeros (Clare *et al.* 1997, Wheeler 1998).

Los diferentes estudios hasta la fecha realizados sobre esta metodología, sugieren que la misma es teóricamente aplicable a todos los cortes indiferentemente de la especie, edad, raza y sexo del animal (Wheeler 1998, Lourdes *et al.* 1998). Lo anterior se justifica en

el hecho antes expuesto de la omnipresencia de las calpaínas en el ámbito muscular (Sorimachi *et al.* 1997; Goll 1999; Suzuki 1999; Sorimachi 1999). Además, otras ventajas del método han sido comprobadas a escala experimental. En primer lugar, sólo los cortes duros reciben el mayor efecto del tratamiento, permaneciendo los cortes suaves sin ser afectados: no se da así un suavizamiento excesivo en ningún caso (Wheeler *et al.* 1992; Wheeler *et al.* 1993; Wheeler 1998). Así mismo, el costo del CaCl_2 apto para el uso en alimentos es muy bajo (Wheeler 1998, Solís 1999). Finalmente el porcentaje de inyección es lo suficientemente reducido para que no se registren sabores y olores indeseables en el producto (Wheeler *et al.* 1993; Lourdes *et al.* 1998). No obstante, si se inyecta por encima del 5% (m/m) de inyección de una disolución al 3% (m/v) en CaCl_2 recomendado (Wheeler *et al.* 1993; Clare *et al.* 1997; Wheeler 1998), es posible que se desarrollen sabores amargos derivados del exceso de ión cloruro (Got 1996; Lourdes *et al.* 1998).

La carne puede ser teóricamente inyectada en cualquier momento antes de los primeros 14 días, aunque se recomienda hacerlo a las 24 horas postmortem una vez dada la resolución del rigor para mejores resultados (Wheeler *et al.* 1993; Wheeler 1998). La inyección anterior a la resolución del rigor no está recomendada, pues el calcio contribuiría a dar una mayor contracción de la carne aumentando así la dureza final (Thomson *et al.* 1997). Es importante que la carne no se someta al proceso de inyección si la misma ha sido curada, pues los fosfatos en las sales de cura podrían provocar el enlace de los iones de calcio obstaculizándose así el proceso (Wheeler 1998).

Según las recomendaciones de Wheeler (1998), la carne una vez inyectada se empaca al vacío y se madura durante un período de siete días en refrigeración a 7 °C. Este período es el recomendado para la acción efectiva de las enzimas, aunque el mismo puede ser incluso mayor; no es aconsejable sin embargo superar los 35 días de maduración (Wichlacz *et al.* 1995, Clare *et al.* 1997, Wheeler 1998).

Durante la maduración en refrigeración, la actividad de la calpaínas y de la calpastatina decrece gradualmente (Kim *et al.* 1997). En carne bovina, la actividad de la m-calpaína cambia lentamente en los primeros siete días de maduración llegando en este período a un 60 % de su actividad inicial; por otro lado, la actividad de γ -calpaína y de la calpastatina decrece rápidamente llegando hasta un 4% y un 20% respectivamente de su actividad inicial (Boehm *et al.* 1998). La μ -calpaína presenta así un descenso dramático durante el almacenamiento (Dransfiel *et al.* 1992; Thomson *et al.* 1996).

Aún almacenado en congelación la pérdida es muy sensible, siendo hasta del 70% de la actividad en un solo día (Dransfield 1996). Se especula que la pérdida de actividad moderada de la m-calpaína se debe a que la misma se va ligando a la fracción miofibrilar quedando gradualmente inactiva (Boehm *et al.* 1998). Por su parte la calpastatina y la μ -calpaína sufren una rápida degradación con el tiempo, la cual inclusive puede ser causada por las mismas calpaínas (Doumit *et al.* 1999).

El empaque al vacío no sólo es una condición necesaria del método, si no que además ha demostrado favorecer ampliamente el mejoramiento de la suavidad de la carne (Golovkin *et al.* 1984). Además, protege la superficie del alimento contra la contaminación y la desecación (Muller 1990; Sparakowski 1991); reduce la oxidación (Barbut *et al.* 1990, Sparakowski 1991); aumenta la vida útil facilitando a la vez el almacenamiento (Chomon 1987; Boers 1988; Muller 1990; Becherel 1991); y estabiliza el color en carnes congeladas (Shay *et al.* 1987; Farouk *et al.* 1998). A todo lo anterior se debe sumar la mayor aceptabilidad del producto final si este se encuentra empacado (Costell 1992).

Una vez completado el período de siete días en maduración el tratamiento está terminado y la carne se encuentra lista para su consumo, o bien para ser sometida otros tratamientos como la cocción o la congelación (Wheeler 1998).

Cocción

El origen de la cocción de la carne es tan antiguo como la civilización misma, y muy probablemente ocurrió en un principio al ser esta expuesta en forma accidental al fuego o al calor (Kramlich *et al.* 1984).

Muchos son los cambios que experimenta la carne como consecuencia de la cocción: se da la coagulación de las proteínas alterándose su solubilidad y el color de la pieza (Kramlich *et al.* 1984; Belitz *et al.* 1985); el contenido de agua decrece como consecuencia de la disminución de la capacidad de retención de agua de las proteínas (Cole *et al.* 1975; Price *et al.* 1976; Kramlich *et al.* 1984; Belitz *et al.* 1985); la grasa se licúa mejorando la textura (Potter 1978); muchas enzimas son inactivadas evitándose el desarrollo de sabores indeseables (Kramlich *et al.* 1984); la destrucción de una parte importante de la carga microbiana mejora la vida útil (Levie 1974; Kramlich *et al.* 1984); la aceptabilidad general se mejora al intensificarse el sabor, desarrollarse el aroma y al alterarse la textura (Levie 1974; Cole *et al.* 1975; Kramlich *et al.* 1984; Belitz *et al.* 1985); y la digestibilidad de la carne aumenta (Levie 1974; Cole *et al.* 1975).

En términos de la suavidad, dependiendo de las características de la carne y del tipo de tratamiento, la cocción puede disminuir o aumentar la dureza (Potter, 1978). Durante un proceso de cocción adecuado, la suavidad se mejora al transformarse el colágeno de su forma viscosa original en gelatina mucho más suave, y además, se produce una separación de las fibras musculares que también contribuye a disminuir la dureza (Levie 1974, Cole *et al.* 1975, Potter 1978, Kramlich *et al.* 1984, Belitz *et al.* 1985). Si el proceso no es el indicado, se puede provocar una contracción de las fibras musculares y una pérdida de humedad excesiva que provocarían un producto de mayor dureza que la carne cruda original (Price *et al.* 1976, Potter 1978). Existe evidencia experimental que registra una reducción en el efecto de endurecimiento provocado por la cocción cuando piezas de carne han sido inyectadas previamente con cloruro de calcio (Wulf *et al.* 1996, Milligan *et al.* 1997).

En términos generales, los métodos de cocción de la carne pueden ser clasificados en dos categorías: cocción por calor seco y cocción por calor húmedo (Levie 1974, Kramlich *et al.* 1984). La cocción por calor seco envuelve a los métodos donde la carne se cocina rodeada de aire caliente como en los hornos, o bien donde esta se fríe en grasa; por otro lado, los métodos de cocción húmeda comprenden aquellos donde la carne se cocina por medio de vapores ó líquidos calientes en los cuales se sumerge la pieza (Kramlich *et al.* 1984).

La cocción por medio del calor seco es únicamente recomendable para aquellos cortes relativamente suaves de carne (Kramlich *et al.* 1984). A pesar de que este método produce un máximo sabor, no suele mejorar la suavidad al provocar una solidificación de las proteínas que generan una textura de mayor dureza (Levie 1974).

El calor húmedo contribuye sustancialmente al mejoramiento de la suavidad gracias a su efecto sobre el colágeno, por lo cual es el método más indicado para cocinar piezas de carne de alta dureza (Levie 1974, Kramlich *et al.* 1984). Al cocinar con calor húmedo, es aconsejable el uso de empaques para las piezas los cuales contribuyan a disminuir la pérdida de jugos durante la cocción (Kramlich *et al.* 1984). Son estas pérdidas de jugos las que hacen más recomendable la cocción con calor seco en aquellos cortes muy suaves que no requieran mejoramiento adicional de la textura (Levie 1974). Al cocinar con calor húmedo, los mejores resultados se obtienen empleando una combinación de temperaturas inferiores a 80 °C y largos tiempos (Potter 1978, Honikel *et al.* 1988, Wheeler 1998, Solís 1999).

Las calpaínas son sensibles al calor y generalmente se degradan durante la cocción (Duckett 1999). La calpastatina por su parte es termorresistente y no es destruida, pudiendo incluso incrementarse su actividad después de un tratamiento térmico (Kim *et al.* 1997, Duckett 1999). Basándose en lo anterior, es muy probable que no exista un incremento en la suavidad después de la cocción que pueda relacionarse con la actividad de las calpaínas (Duckett 1999).

Congelación

Tradicionalmente se define a la congelación como la conservación de alimentos a una temperatura dada dentro de un intervalo de -10 °C a -30 °C, en un estado tal que la mayor parte del agua contenida en ellos se encuentra presente en forma de hielo (Jamieson *et al.* 1974).

Los primeros procedimientos de congelación puestos en práctica en los albores de la producción industrial del frío consistían únicamente en depositar la carne en cámaras a -10 °C y sin movimiento de aire; el proceso de congelación demoraba entonces hasta una semana y acarrearba serios problemas de calidad y seguridad. Estos problemas se solucionan entre 1916 y 1925 al sentar Planck las bases tecnológicas de la congelación moderna (Jasper *et al.* 1978). En la actualidad, las técnicas modernas de congelación entre los -18 °C y -30 °C permiten mantener la carne de res almacenada hasta por plazos de dos o tres años (Jasper *et al.* 1978, Potter 1978, Belitz *et al.* 1985).

Generalmente es aceptado el hecho de que cuando el proceso de congelación es efectuado de manera adecuada, los cambios adversos en la calidad no son de mucha importancia (American Meat Institute Foundation 1960, Kramlich *et al.* 1984).

Como primer aspecto importante al congelar la carne, es necesario constatar que la misma complete totalmente la resolución del *rigor mortis* antes de iniciar el proceso. Se recomienda no congelar antes de transcurridas 48 horas después de la muerte (Kramlich *et al.* 1984). De no ser así, se produce el fenómeno denominado "rigor de congelación" ó "cold shortening" que afecta la dureza y la calidad final de la carne (Price *et al.* 1976, Potter 1978, Kramlich *et al.* 1984, Belitz *et al.* 1985, Rodríguez 1986). En este fenómeno se produce una degradación extremadamente rápida del ATP al descongelar debido a la acción de la miosin-ATPasa fuertemente activada por el calcio, con la consiguiente disminución de la capacidad de retención de agua y

contracción muscular (Belitz *et al.* 1985). El producto final pierde entonces muchos fluidos y es duro a causa de la contracción. Se estima que el efecto del rigor de congelación, o encogimiento en frío como también se denomina, puede causar un aumento de cuatro a cinco veces en la dureza de la carne (Zaglul 1983).

El empaqueo es probablemente el paso más importante al preparar la carne para ser congelada (Kramlich *et al.* 1984). Durante la congelación, la evaporación de la humedad presente en la superficie de la carne puede provocar un serio deterioro del producto si el mismo no se encuentra debidamente protegido por un empaque impermeable al agua (American Meat Institute Foundation 1960). La deshidratación resultante en la superficie expuesta provoca el fenómeno conocido como “quemadura del hielo” o “freezer burn”, el cual se manifiesta en zonas de apariencia oscura y textura áspera, registrándose pérdidas de sabor y nutrientes en casos extremos (American Meat Institute Foundation 1960; Levie 1979; Kramlich *et al.* 1984; Frazier *et al.* 1985; Food Safety and Inspection Service 1999). El problema de la quemadura del hielo es no obstante un problema de calidad pero no de seguridad (Food Safety and Inspection Service 1999). Es importante que el empaque se encuentre adherido al contorno de la pieza, pues los espacios dentro del empaque igualmente dejan la superficie expuesta (Levie 1979; Kramlich *et al.* 1984). Esto hace muy recomendable el empaque al vacío (Levie 1979).

La velocidad con la cual una pieza de carne se congela puede o no estar relacionada con cambios físicos y químicos relacionados con la integridad de las fibras musculares. Cuando la congelación es rápida, los cristales de hielo formados son pequeños y se forman dentro de las fibras musculares; cuando la congelación es lenta los cristales son grandes y muchos se forman en el exterior de las fibras y en el tejido conectivo (American Meat Institute Foundation 1960; Levie 1979; Food Safety and Inspection Service 1999). No obstante, aún durante las condiciones de congelación más rápida, solamente los pocos milímetros correspondientes a las capas más exteriores de la pieza de carne se congelan muy rápidamente por lo cual la mayor parte de los cristales son extracelulares (American Meat Institute Foundation 1960; Price *et al.* 1976). Además, debido a las condiciones de almacenaje congelado propias de la industria, muchos de los cristales, aún los más pequeños, crecen lentamente durante el almacenamiento (Jasper *et al.* 1978; Levie 1979). Con base a lo anteriormente expuesto, muchas autoridades han coincidido en afirmar que existe muy poco o ningún daño mecánico en las fibras musculares aún durante la congelación lenta (American Meat Institute Foundation 1960; Levie 1979).

El congelamiento rápido, por otra parte, podría resultar conveniente desde un punto de vista de seguridad microbiológica y de costos. La congelación lenta favorece el desarrollo de microorganismos en la superficie de la carne que pueden comprometer la calidad y la seguridad del producto (American Meat Institute Foundation 1960; Kramlich *et al.* 1984; Frazier *et al.* 1985; Jeremiah 1999). La congelación rápida es de primordial importancia en carnes precocidas, dado que al haber sido sometidas las mismas a un proceso térmico presentan una carga microbiana muy baja (Jeremiah 1999). Si se llega a presentar una recontaminación, los microorganismos así inoculados tendrían muy poca competencia, además de un excelente medio de cultivo (Frazier *et al.* 1985). El proceso de congelación rápida en túnel, supone también un considerable ahorro de espacio en contra del congelado lento dentro de una cámara de congelación (Pohlman 1971).

La congelación correctamente ejecutada, no tiene efectos mayores sobre el color, sabor, olor y la jugosidad de la carne aun después de varios meses (American Meat Institute Foundation 1960; Food Safety and Inspection Service 1999). Estos efectos se reducen considerablemente si se emplea el empaqueo al vacío (Farouk *et al.* 1998). Los cristales formados tienen poco o ningún efecto sobre la suavidad de la carne, aunque la expansión del tejido conectivo registrado durante la congelación puede tener algún efecto mecánico que incrementa la suavidad (Levie 1979). No existe evidencia de que la congelación después resuelto el rigor cause un incremento de la dureza en la carne, excepto en aquellas regiones donde se registren extensivas quemaduras del hielo (Levie 1979).

La congelación del músculo bovino tiene un efecto desnaturizante en las proteínas miofibrilares (Wagner *et al.* 1985). Se dan efectos considerables en la solubilidad y en las características termofísicas de estas proteínas, las cuales son más marcadas entre mayor sea el período previo a la congelación (Farias *et al.* 1989). Muchas de estas modificaciones irreversibles se dan a consecuencia de las altas concentraciones transitorias de sales que se registran durante el proceso de congelación, especialmente cuando el mismo es excesivamente lento (Belitz *et al.* 1985; Frazier *et al.* 1985; Petrovic *et al.* 1993). La desnaturización, resultado del desdoblamiento de la cabeza de la miosina (Wagner *et al.* 1985), está relacionada con una baja en la capacidad de retención de agua del músculo (Jasper *et al.* 1978). Dada la desnaturización, durante la congelación las interacciones agua-proteína son remplazadas por interacciones proteína-proteína y se disminuye la capacidad para ligar el agua (Wagner *et al.* 1985). Las pérdidas que se generan por esta razón al descongelar pueden ser significativas si no se siguió un adecuado proceso de congelación,

no obstante, si el proceso fue exitoso estas pérdidas tienen poco efecto sobre la jugosidad (Levie 1979).

Es posible que muy poca actividad enzimática continúe durante el almacenamiento congelado, dándose cierto nivel de proteólisis y por lo tanto una leve mejora en la suavidad (Levie 1979). Durante la congelación, las calpaínas no son considerablemente destruidas y retienen su actividad después de efectuarse la descongelación; no obstante, no son activas en estado de congelación (Duckett 1999) y su acción es muy limitada en carnes que experimenten el fenómeno del rigor de congelación (Zamora *et al.* 1998). Por otro lado, la calpastatina es especialmente sensible a la congelación y sus niveles de actividad decrecen muy significativamente durante el proceso (Whipple *et al.* 1992; Kim *et al.* 1997; Duckett *et al.* 1998; Duckett 1999).

La calidad final de la carne congelada no depende solamente de como se efectúa la congelación, sino también del método empleado durante la descongelación (Jasper *et al.* 1978). La descongelación a temperatura ambiente está fuertemente contraindicada debido al alto riesgo microbiológico asociado (Food Safety And Inspection Service 1999; College of Agriculture of the Fort Valley State University 1999). El método más conveniente de descongelamiento en términos de la dureza final y de seguridad, es aquel que se lleva a cabo progresivamente en cámaras con movimiento de aire a temperaturas de refrigeración (Ambrosiadis *et al.* 1994; Sorowka 1995). A pesar de que este método produce eventualmente algunas pérdidas de fluidos, es el que genera una mayor suavidad final cuando ésta se mide por medios sensoriales e instrumentales (Ambrosiadis *et al.* 1994).

LITERATURA CITADA

- ABBA. 1998. Genetic signs of beef tenderness (en línea). Consultado 18 octubre 1998. Disponible: http://brahmans.com/Bjhomepage/Bjcov9810/bjtab9810/bjfea9810/bjfea9810_01/bjfea9810_01.html
- ALARCÓN, A.D.; DRANSFIELD, A.D. 1995. Alteration of post-mortem ageing in beef by the addition of enzyme inhibitors and activators. *Meat Science* 41(2): 163-178.
- AMBROSIADIS, I.; THEODORAKAKOS, N.; GEORGAKIS, S.; LEKKAS, S. 1994. Effects of thawing methods on quality of frozen meat and drip loss. *Fleischwirtschaft* 74(3): 320, 323-325.
- AMERICAN MEAT INSTITUTE FOUNDATION. 1960. The science of meat and meat products. San Francisco, California. Ed. W.H. Freeman and Company. 200p.
- ASHIE, I.; SIMPSON, B.K. 1997. Proteolysis in food myosystems. *Journal of food Biochemistry* 21(2): 91-123.
- BAYLISS, P. 1995. Chemistry in the kitchen: the chemistry of flesh foods II. *Nutrition and Food Science* 2: 21-26.
- BAKI, A.; TOMPA, P.; ALEXA, A.; MOLNÁR, O.; FRIEDRICH, P. 1996. Autolysis parallels activation of μ -calpain. *Biochem. J.* 318: 897-901.
- BARBUT, S.; KAKUDA, Y.; CHAN, D. 1990. Effects of carbon dioxide, freezing and vacuum packaging on the oxidative stability of mechanically deboned poultry meat. *Poultry Science* 69(10): 1813-1815.
- BECHEREL, F. 1991. Keeping quality of horse meat in commercial distribution. *Viandes et Produits. Carnes* 12(1): 21-27.
- BELITZ, H.W.; GROSCHE, W. 1985. Química de los alimentos. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 813 p.
- BELTRÁN, J.A.; JAIME, I.; SANTOLARIA, P.; SANUDO, C.; ALBERTI, P.; RONCALES, P. 1997. Effect of stress induced high post mortem pH on protease activity and tenderness of beef. *Meat Science* 45(2): 201-207.
- BERGE, P.; CULIOLI, J.; OUALI, A. 1993. Performance, muscle composition and meat texture in veal calves administered a beta agonist (clenbuterol). *Meat Science* 33(2): 191-206.
- BISHOP, S.; OLSEN, C.; BULLOCH, S. 1999. B.O.B's glycolysis, Krebs cycle and electron transport chain pages (en línea). Consultado [14 febrero 1999]. Disponible <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/2041/glycoinfo.htm>
- 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.
- BOERS, R.H. 1988. Intrinsic and extrinsic factors in relation to the microbiological quality of vacuum packaged fresh meat. *Voedingsmiddelentechnologie* 21(21): 55-57.
- BRITISH NUTRITION FOUNDATION. 1988. Facts on meat (en línea). Consultado 15 enero 1999. Disponible: <http://nutrition.org.uk/Facts/commodities/meat.html>
- BRUCE, H.L.; BALL, R. 1990. Effects of postmortem glycolysis on the quality of hot deboned bovine muscle. *Canadian Journal of Animal Science* 70(2): 431-439.
- BUTS, B.; CLAEYS, E.; DEMEYER, D. 1987. Protein fragmentation and meat tenderness. *Mededelingen Van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 52 (4): 1529-1538.

- CaBP DATA LIBRARY. 1999. Calpain (en línea). Consultado 10 marzo 1999. Disponible en: http://www.scripps.edu/~mnelson/database/general/prot_pages/calpain.html
- CAMPO, M.M.; SANUDO, C.; PANEA, B.; ALBERTI, P.; SANTOLARIA, P. 1999. Breed type and ageing time effects on sensory characteristics of beef strip loin steaks. *Meat Science* 51 (4): 383-390.
- CHOMON, P. 1987. Pre-cooked meats under modified atmosphere with radically increased shelf life. In *Proceedings of the First International Conference on Packaging Advances*. p. 187-191.
- CHOW, H.M. 1996. Structural changes of myofibrils affected by endogenous proteases during postmortem aging. *Taiwan Sugar* 43 (1): 23-26.
- 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.
- COLE, D.J.A.; LAWRIE, R.A. 1975. *Meat*. Connecticut, E.E.U.U. Ed. AVI. 596 p.
- COLLEGE OF AGRICULTURE OF THE FORT VALLEY STATE UNIVERSITY. 1999. Freezing and thawing meat products (en línea). Consultado 17 febrero 1999. Disponible en: http://www.ag.fvsu.edu/html/publications/teletips/food_preservation_and_storage/1401.htm
- COSTELL, E. 1992. Influencia del envase en la aceptabilidad de los alimentos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 32(5): 493-507.
- CRIDGE, A.G.; BICKERSTAFFE, R.; COWLEY, R.; SAVAGE, G.P. 1994. Post-mortem factors influencing the quality of beef. In *Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand* p. 93-100.
- DAYTON, W.R.; SCHOLLMMEYER, J.V. 1981. Immunocytochemical localization of calcium activated protease in skeletal muscle cell. *Experimental Cell Research* 136: 423-433.
- DOUMIT, M.; KOOHMARAIE, M. 1999. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle (en línea). Consultado 15 enero 1999. Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/>
- DRANSFIELD, E. 1994. Optimization of tenderization, aging and tenderness. *Meat Science* 36(1-2): 105-121.
- DRANSFIELD, E. 1996. Calpains from thaw rigor muscle. *Meat Science* 43(3,4): 311-320.
- DRANSFIELD, E.; ETHERINGTON, D.J.; TAYLOR, M.A. 1992. Modeling postmortem tenderization II: enzyme changes during storage of electrically stimulated and non stimulated beef. *Meat Science* 31(1): 75-84.
- DUCKETT, S.; KLEIN, T.A.; THORNGATE, J.H.; BUSBOOM, J.R.; SNOWDER, G.D. 1998. Effect of freezing on calpastatin activity and tenderness of callipyge lamb. *Journal of Animal Science* 76: 1869-1874.
- DUCKETT, S. 1999. Efectos de la cocción y la congelación sobre las calpaínas. World Wide Web, San José. Comunicación Personal.
- EISEMANN, J.H. 1996. Impact of beta-adrenergic agonist on growth and metabolism of meat animals. In *Proceedings of the Scientific Conference on Growth Promotion in Meat Production* p. 121-150.
- ELCE, J.S.; HEGADORN, C.; ARTHUR, J.S.C. 1997. Autolysis, Ca²⁺ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *Journal of Biological Chemistry* 272(17): 11268-11275.
- EPLEY, R.J. 1992. Meat tenderness (en línea). Consultado 16 diciembre 1998. Disponible en: <http://www.extension.umn.edu/Documents/D/J/DJ0856.html>
- FARIAS, G.; OUALI, A.; BONNET, M.; KOPP, J. 1989. Effects of freezing on some characteristics of muscle tissue, and consequences for maturation of meat. *Viandes et Produits Carnes* 10(4): 141-148.
- FAROUK, M.N.; SWAN, J.E. 1998. Effect of muscle condition before freezing and stimulated chemical changes during frozen storage on the pH and colour of beef. *Meat Science* 50(2): 245-256.
- FIELD, R.; McCORMICK, R.; BALASUBRAMANIA, V.; SANZO, D.; WISE, J.; HIXON, D.; RILEY, M.; RUSSEL, 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.
- FOEGEDING, E.A.; LIU, M.N. 1995. Functional differences of myofibrillar proteins from fast and slow twitch muscles. *Journal of Muscle Foods* 6(2): 109-123.
- FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. 1999. Focus on freezing (en línea). Consultado febrero 20 1999. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OA/pubs/freezing.htm>
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. 1985. *Microbiología de los alimentos*. Tercera edición. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 522 p.
- GEESINK, G.; KOOLMEES, P.A.; LAACK, H.; SMULDERS, F. 1995. Determinants of tenderization in beef longissimus dorsi and triceps brachii muscles. *Meat Science* 41(1): 7-17.

- GEESINK, G.; KOOHMARAIE, M. 1998. Effect of calpastatin on degradation of miofibrillar proteins by U-calpain under postmortem conditions (en línea). Consultado 25 enero 1999. Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/>
- GEESINK, G.; KOOHMARAIE, M. 1999. Postmortem Proteolysis and calpain calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended postmortem storage. *Journal Of Animal Science* 77: 1490-1501.
- GIL, M., HORTOS, M.; SARRAGA, C. 1998. Calpain and cathepsin activities, and protein extractability during ageing of ilongissimusi porcine muscle from normal and PSE meat. *Food Chemistry* 63(3): 385-390.
- GILCHRIST, J.S.C. 1999. Identification and purification of nuclear calcium binding proteins (en línea). Consultado 10 marzo 1999. Disponible en: <http://www.umanitoba.ca/faculties/dentistry/OralBio/gilchris.html>
- GOLL, D.E. 1997. The Ca⁺⁺ dependent protease system (en línea). Consultado [16 noviembre de 1998]. Disponible en: <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bio-c496A/gollsumm.html>
- GOLL, D.E.; DAYTON, W.R; INDERJIT, S.; ROBSON, R.M. 1991. Studies of the alpha actinin/actin interaction in the Z disk by using calpain. *Journal of Biological Chemistry* 266(13): 8501-8510.
- 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.
- 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.
- GOLOVKIN, N.A.; IVANOVA, R.; SHAROBAIKO, V.; VO-ROB'EVA, N. 1984. Changes in meat tenderness during storage. *In: Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers* 30: 4-20.
- GORDON, A.M; HOMSHER, E.; REIGNIER, M. 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews* 80 (2): 854-924.
- GOT, F.; RUSSET-AKRIM, S.; BAYLE, M.C.; CULIOLI, J. 1996. Effects of calcium lactate on tenderness and flavour of beef. *Viandes et Produits Carnes* 17(6): 328-330.
- HAHN-JUN, L.; SORIMACHI, H.; SEON-YONG, J.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biological Chemistry* 379: 175-183.
- HEINZE, P.H.; BRUGGEMANN, D. 1994. Ageing of beef: influence of two ageing methods on sensory properties and myofibrillar proteins. *Sciences des Aliments* 14(4): 387-399
- HONIKEL, K.O.; SEUSS, I. 1988. Preparation and tenderness of meat. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung Kulmbach* (100): 7926-7932.
- HORTOS, M.; GIL, M.; SARRAGA, C. 1994. Effect of calpain and cathepsin activities on myofibrils from porcine longissimus muscle during conditioning of normal and exudative meat. *Sciences des Aliments* 14(4): 503-515.
- HUANG, J.; FORSBERG, N.E. 1998. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(21): 12100-12105.
- HULTIN, H.O.; FENG, Y.; STANLEY, D.W. 1995. A re-examination of muscle protein solubility. *Journal of Muscle Foods* 6(2): 91-107.
- JAMIESON, M.; JOBBER, P. 1974. Manejo de los alimentos. Distrito Federal, México. Ed. Pax-México. 131p.
- JASPER, W.; PLACZEK, R. 1978. Conservación de la carne por el frío. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 131p.
- JEREMIAH, L.E.; BEAUCHEMIN, K.A.; JONES, S.D.M.; GIBSON, L.L.; RODE, L.M. 1998. The influence of dietary cereal grain source and feed enzymes on the cooking properties and palatability attributes of beef. *Canadian Journal of Animal Science* 78(3): 271-275
- JEREMIAH, L.E. 1999. Consideraciones microbiológicas sobre la cocción al vacío. World Wide Web, San José. Comunicación personal.
- JONES, S.; JEREMIAH, L.E.; TONG, A.; LUTZ, S.; ROBERTSON W.M. 1991. The effects of marbling level, electrical stimulation, and post mortem aging on the cooking and palatability properties of beef rib-eye steaks. *Canadian Journal of Animal Science* 71(4): 1037-1043
- KAWASHIMA, S.; AKANUMA, H.; ASAOKA, K. 1998. Comparison of calpains from rabbit, monkey, human and rat. *Current Contents* ISSN: 1431-6730
- KIM, K.H.; KIM, Y.S. 1997. The effects of sample storage and handling condition on calpain I and II and calpastatin activities in skeletal muscles. *Korean Journal of Animal Science* 39(5): 617-624.
- KINBARA, Y.; SORIMACHI, H.; ISHIURA, S.; SUSUKI, K. 1998. Skeletal muscle specific Calpain p94. *Biochemical Pharmacology* 56(4): 415-420.
- KNECHT, E. 1997. Proteólisis (en línea). Consultado 16 diciembre 1998. Disponible en: http://www.ochoa.fib.es/memoria/res_lab_bio_cel.htm

- KOOHMARAIE, M. 1992. The role of Ca^{2+} 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.
- KRAMLICH, W.E.; PEARSON, A.M.; TAUBER, F.W. 1984. Processed meats. New York, New York. Ed. Avi. 348 p.
- KUMAMOTO, T.; KLEESE, W.C.; CONG, J.; GOLL, D.E.; PIERCE, P.R.; ALLEN, R.E. 1992. Localization of the Ca^{2+} dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Acta Neuropathologia* 32(5): 493-507.
- LEVIE, A. 1974. Meat handbook. Connecticut, E.E.U.U. Ed. Avi. 300 p.
- LIBBY, J. 1986. Higiene de la carne. Distrito Federal, México. Ed. CECSA. 659 p.
- 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.
- MILLIGAN, S.D.; MILLER, M.F.; OATS, C.N.; RAMSEY, C.B. 1997. Calcium chlorine injection and degree of doneness effects on the sensory characteristics of beef inside round roasts (en línea). Consultado 17 diciembre 1999. Disponible en: <http://www.asas.org/jas/abs/1997/mar668abs.html>
- MILLS, F.W.; COMERFORD, J.W.; HOLLENDER, R.; HARPSTER, H.W.; HOUSE, B.; HENNING, W.R. 1992. Meat composition and palatability of Holstein and beef steers as influenced by forage type and protein source. *Journal of Animal Science* 70(8): 2446-2451.
- MUELLER, W. 1990. Improvement of the tenderness of roosting meat by mechanical treatment. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung Kulmbach* (107): 24-28.
- MUELLER, S. 1990. Packaging and meat quality. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 23(1): 22-25.
- MURRAY, R.; GRANNER, D.; MAYES, P.; RODWELL, V. 1990. *Bioquímica de Harper*. 22° edición. México D.F., México. Ed. Manual Moderno. 740 p.
- 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.
- O'HALLORAN, G.R.; TROY, D.J.; BUCKLEY, D.J.; REVILLE, W.J. 1997. The role of endogenous proteases in the tenderization of fast glycolysing muscle. *Meat Science* 47(3/4): 187-210.
- ONO, Y.; SHIMADA, H.; SORIMACHI, H.; RICHARD, I.; SAIDO, T.C.; BECKMANN, J.S.; ISHICURA, S.; SUSUKI, K. 1997. Functional defects of a muscle specific Calpain, p94, caused by mutations associated with Limb-Girdle muscular dystrophy type 2A. *Journal of Biological Chemistry* 273(27): 17073-17078.
- ONO, Y.; SORIMACHI, H.; SUSUKI, K. 1998. Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245: 289-294.
- OUALI, A. 1990. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. *Journal of Muscle Foods* 1(2): 129-165.
- OUALI, A. 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* 74(3): 251-265.
- PARR, T.; SENSKY, P.L.; SCOTHERN, G.P.; BARDSLEY, R.G.; BUTTERY, P.J.; WOOD, J.D.; WARKUP, C. 1997. Relationship between skeletal muscle specific calpain and tenderness of conditioned porcine longissimus muscle (en línea). Consultado 19 diciembre 1999. Disponible en: <http://www.asas.org/jas/abs/1999/mar661.html>
- PARRISH, F.C. 1999. Aging of beef (en línea). Consultado 21 enero 1999. Disponible en: <http://www.beef.org/8010/beef/librpub/pcrifact/aging.htm>
- PETROVIC, L.; GRUJIC, R.; PETROVIC, M. 1993. Definition of the optimal freezing rate II: investigation of the physicochemical properties of beef M. longissimus dorsi frozen at different freezing rates. *Meat Science* 33(3): 319-331.
- POHLMAN, W. 1971. *Manual de técnica frigorífica*. Barcelona, España. Ed. Ediciones Omega. 171 p.
- POTTER, N. 1978. *La ciencia de los alimentos*. Distrito Federal, México. Ed. EDUTEX. 749 p.
- PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S. 1976. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Acribia. Zaragoza. 450 p.
- PRIGGE, J.T.; KIRKPATRICK-KELLER, D.C.; KILLEFER, J. 1998. Isolation and characterization of a calpain activator in chicken skeletal muscle. *Poultry Science* 77: 1411-1416
- PRINGLE, T.; WILLIAMS, S.; JOHNSON, D.; WEST, L. 1996. The role of the calpain proteinase system in aged tenderness of angus and brahman crossbred steers (en línea). Consultado 8 setiembre 1998. Disponible http://www.ads.uga.edu/annrpt/1996/96_039.htm
- PURCHAS, R.W.; AUNGSUPAKORN, R. 1993. Further investigations into the relationship between ultimate pH

- and tenderness for beef samples from bulls and steers. *Meat Science* 34(2): 163-178.
- RODRÍGUEZ, T. 1986. Efecto de la estimulación eléctrica en la suavidad de la carne bovina. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Carrera Interdisciplinaria en Tecnología de Alimentos. San José.
- SAVELL, J. 1998. Meat tenderization (en línea). Consultado [15 enero 1999]. Disponible en: <http://savel-j.tamu.edu/tender.html>
- SHANNON, J.D.; GOLL, D.E. 1985. Properties of a protein that is purified from bovine skeletal muscle that inhibits the Ca²⁺ dependent proteinase. In *Intracellular Protein Catabolism*. Alan R. Liss. New York.
- SHAY, B.; EGAN A.F. 1987. The packaging of chilled red meats. *Food Technology in Australia* 39(6): 283-285.
- SIMMONS, N.J.; YOUNG, O.A.; DOBBIE, P.M.; SINGH, K.; THOMPSON, B.C.; SPECK, P.A. 1997. Post-mortem calpain system kinetics in lamb: effects of clenbuterol and preslaughter exercise. *Meat Science* 47(1/2): 135-146.
- SINCLAIR, K.D.; CUTHBERTSON, A.; RUTTER, A.; FRANKLIN, M.F. 1998. The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the organoleptic properties and texture of bull beef from suckled calves. *Animal Science* 66(2): 329-340.
- SMITH, T. 1997. The beef tenderness challenge continues (en línea). Consultado 26 enero 1999. Disponible en: http://www.angus.org/journal/97_03mar/tender.htm
- SOLÍS, E. 1999. Suavizamiento por inyección de cloruro de calcio y discusión de métodos de análisis implementados en el laboratorio de control de calidad de Coopemontecillos RL. Alajuela, Costa Rica. Comunicación Personal.
- SORIMACHI, H.; ISHIURA, S.; SUSUKI, K. 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochemical Journal* 328: 721-732
- SORIMACHI, H. 1999. Discusión sobre generalidades de las calpaínas. World Wide Web, San José. Comunicación Personal.
- SOU, S.; KOIKE, H.; SORIMACHI, H.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. 1999. Association and dissociation of the calcium-binding domains of calpain by Ca²⁺. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257(1): 63-66.
- SPARAKOWSKI, W. 1991. A new process is successful: packaging of perishable products. *Fleischerei* 42(12): 975-976.
- SPECK, P.A.; COLLINGWOOD, K.M.; BARDSLEY, R.G.; TUCKER, G.A.; GILMOUR, R.S.; BUTTERY, P.J. 1993. Transient changes in growth and in calpain and calpastatin expression in ovine skeletal muscle after short-term dietary inclusion of cimaterol. *Biochimie* 75(10): 917-923.
- SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. 1992. Calpain concentration is elevated although net calcium dependent proteolysis is suppressed in dystrophin deficient muscle. *Experimental Cell Research* 203: 493-507.
- STANTON, C. 1989. Proteolysis induced changes in meat collagen during conditioning. *Dissertation Abstracts International* 49(12): 5084-5085.
- SUROWKA, K. 1995. Microwave thawing of meat compared with conventional methods. *Chłodnictwo* 30(11): 25-28.
- SUZUKI, A.; WATANABE, M.; IKEUCHI, Y.; SAITO, M.; TAKAHASHI, K. 1993. Effects of high-pressure treatment on the ultra structure and thermal behavior of beef intramuscular collagen. *Meat Science* 35(1): 17-25.
- SUZUKI, K.; SORIMACHI, H. 1998. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Letters* 433:1-4
- SUZUKI, K. 1999. Discusión sobre generalidades de las calpaínas. World Wide Web, San José. Comunicación Personal.
- SWATLAND, H.J. 1999. Growth & structure of meat animals (en línea). Consultado 10 enero 1999. Disponible. <http://www.aps.uoguelph.ca/~swatland/gasman.html>
- SWATLAND, H.J. 1998. Contraction, rigor and conditioning (en línea). Consultado 10 enero 1999. Disponible en: <http://www.aps.ouguelph.ca/swatland/html/ch5.1.html>
- SWATLAND, H.J.; FINDLAY, C.J. 1997. On-line prediction of beef toughness, correlating sensory evaluation with fluorescence of connective tissue and dynamic analysis of overall toughness. *Food Quality and Preference* 8(3): 233-239.
- TAKAHASHI, K. 1992. Non enzymatic weakening of myofibrillar structures during conditioning of meat: calcium ions at 0.1 mM and their effect on meat tenderization. *Biochimie* 74(3): 247-250.
- 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.
- TAYLOR, R.; KOOHMARAIE. 1998. Effects of postmortem storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus. *Journal of Animal Science* 76: 2811-2817.

- TEXAS A&M UNIVERSITY. 1999. Meat tenderness (en línea). Consultado 11 enero 1999. Disponible <http://www.meat.tamu.edu/tender.html>
- THOMSON, B.C.; DOBBIE, P.M.; SINGH, K.; SPECK, P.A. 1996. Postmortem kinetics of meat tenderness and the components of the calpain system in bull skeletal muscles. *Meat Science* 44(3): 151-157.
- THOMSON, B.C.; DOBBIE, P.M. 1997. The effect of calcium chloride treatment on shear force and weight loss in gluteus medius and longissimus muscles from pasture fed bulls. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 40(4): 507-512.
- TOMPA, P.; BAKI, A.; SCHAD, E.; FRIEDRICH, P. 1996. The calpain cascade: μ -calpain activates m-calpain. *Journal of Biological Chemistry* 271(52): 33161-33164.
- TROY, D. 1994. Tenderizing beef (en línea). Consultado 19 enero 1999. Disponible en: <http://exp.interspeed.net/flai/ffe11994.htm>
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA. 1999. El papel de la ceramida y las caspasas en la muerte neuronal apoptótica que ocurre en los procesos de hipoglucemia e hipoxia en el sistema nervioso central (en línea). Consultado 19 febrero 1999. Disponible en: <http://cc.uab.es/~ikbq1/isquemia.html>
- UYTTERHAEGEN, L.; CLAEYS, E.; DEMEYER, D. 1992. The effects of electrical stimulation on beef tenderness, protease activity and myofibrillar protein fragmentation. *Biochimie* 74(3): 275-2281.
- UYTTERHAEGEN, L.; CLAEYS, E.; DEMEYER, D. 1994. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *Journal of Animal Science* 72(5): 1209-1223.
- VOISINET, B.D.; GRANDIN, T.; O'CONNOR, S.F.; TATUM, J.D.; DEESING, M.J. Bos indicus-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. *Meat Science* 46(4): 367-377.
- WAGNER, J.R.; AÑÓN, M.C. 1985. Effect of freezing rate on the denaturalization of myofibrillar proteins. *Journal of Food Technology* 20: 735-744.
- 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.
- WHEELER, T. 1998. Suavizamiento de la carne por inyección de cloruro de calcio. World Wide Web, San José. Comunicación Personal.
- WHEELER, T. 2000. El pH y su relación con la actividad de las calpaínas. World Wide Web, San José. Comunicación Personal.
- WICHLACZ, H.; GRZESKOWIAK, E.; BORZUTA, K. 1995. Effect of postmortem injection of calcium chloride and sodium ascorbate on some quality traits of cow meat. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego* (32-33): 79-87.
- WILLEMS, M.; PURSLOW, P. 1997. Mechanical and structural characteristics of single muscle fibres and fibre groups from raw and cooked pork longissimus muscle. *Meat Science* 46(3): 285-301.
- WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M. 1992. Freezing and calcium chloride marination effects on beef tenderness and calpastatin activity. *Journal of Animal Science* 70(10): 3081-3085.
- WULF, D.M.; MORGAN, J.B.; TATUM, J.D.; SMITH, G.C. 1996. Effects of animal age, marbling score, calpastatin activity, subprimal cut, calcium injection, and degree of doneness on the palatability of steaks from Limousin steers. *Journal of Animal Science* 74(3): 569-576.
- XIONG, Y.; MOODY, W.; BLANCHARD, S.; LIU, G.; BURRIS, W. 1996. Postmortem proteolytic and organoleptic changes in hot boned muscle from grass and grain fed and zeranol implanted cattle. *Food Research International* 29(1): 27-34.
- YAMANOUE, M.; AKAMATSU, Y.; OKAYAMA, T.; NISHIKAWA, I. 1994. Comparison of myofibrillar structure weakening with tenderness of chicken, rabbit and porcine skeletal muscles during post mortem aging. *Animal Science and Technology* 65(4): 320-329.
- YANG, H.Q.; MA, H.; TAKANO, M.; HATANAKA, M.; MAKI, M. 1994. Analysis of calcium dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of μ -calpain large subunit. *Journal of Biological Chemistry* 269(29): 18977-18984.
- YU, L.; LEE, Y. 1986. Effects of postmortem pH and temperature on bovine muscle structure and meat tenderness. *Journal of Food Science* 51(3): 774-780.
- ZAGLUL, J.A. 1983. Efecto del colágeno en la blandura de la carne. *In: Primer Simposio Centroamericano y del Caribe Sobre Procesamiento de Carnes* p. 399-412.
- ZAMORA, F.; CHAIB, F.; DRANSFIELD, E. 1998. Calpains and calpastatin from cold shortened bovine *M. longissimus lumborum*. *Meat Science* 49(1): 127-133.