

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE CATEPSINAS B, B+L Y H EN CARNE DE CERDO EN DIFERENTES GENÉTICAS.

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y
CALIDAD ALIMENTARIA
2014-2015**

Autor

David Manuel López Fernández

Tutor

Fidel Toldrá Vilardell

Cotutoras

**M^a Concepción Aristoy Albert
Leticia Mora Soler**

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE CATEPSINAS B, B+L Y H EN CARNE DE CERDO EN DIFERENTES GENÉTICAS.

David Manuel López, M-Concepción Aristoy¹, Leticia Mora¹ y Fidel Toldrá ¹

RESUMEN

Tras el sacrificio del animal, el músculo esquelético se convierte en carne por medio de la maduración ocurriendo una serie de reacciones bioquímicas esenciales para el desarrollo de la calidad, siendo la proteólisis uno de los grupos más importantes dentro de las reacciones bioquímicas en la carne. Este es un proceso complejo en el que participan, entre otras, las catepsinas B, L y H dentro del grupo de las endopeptidasas. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la influencia de la genética sobre la actividad de las catepsinas B, B+L y H en el músculo *Longissimus dorsi* de cerdos de un mismo lote, así como la influencia del momento de sacrificio en la actividad enzimática de animales pertenecientes a una misma genética. Para ello, se han estudiado cuatro genotipos diferentes, de los cuales, tres son genotipos industriales (IG) y uno de raza ibérica. La influencia de la genética en la actividad enzimática ha sido demostrada para los genotipos estudiados. Se observó mayor actividad de las catepsinas B+L en los cerdos IG mientras que la actividad de la catepsina H se mostró mayor en los cerdos ibéricos. Además, el momento de sacrificio influyó, observándose una mayor actividad enzimática en los cerdos sacrificados en el segundo lote respecto a los sacrificados en el primer lote. Finalmente, también se pretendió demostrar, mediante una cinética de reacción, la adecuación del método utilizado basado en la determinación de la fluorescencia.

PALABRAS CLAVE: catepsina, endopeptidasa, proteólisis, músculo de cerdo, cerdo Ibérico, genotipo, actividad enzimática, calidad de la carne, carne curada, fluorimetría.

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)
Avda. Agustín Escardino, 7. 46980, Paterna (Valencia). Telf. 963900022 Ext. 2111

RESUM

Després del sacrifici del animal, el múscul esquelètic es converteix en carn mitjançant la maduració ocorrent una sèrie de reaccions bioquímiques essencials per al desenvolupament de la qualitat, sent la proteòlisi un dels grups més importants dins de les reaccions bioquímiques en la carn. Aquest és un procés complex en el que participen, entre d'altres, les catepsines B, L i H dins del grup de les endopeptidases. L'objectiu del present treball ha sigut estudiar la influència de la genètica sobre l'activitat de les catepsines B, B+L i H en el múscul *Longissimus dorsi* dels porcs dins d'un mateix lot, així com la influència del moment de sacrifici en l'activitat enzimàtica dels animals pertanyents a una mateixa genètica. Per això s'han estudiat quatre genotips diferents, dels quals, tres són genotips industrials (IG) i un de raça ibèrica. La influència de la genètica en l'activitat enzimàtica ha sigut demostrada per als genotips estudiats. Es va observar major activitat de les catepsines B+L en porcs IG mentre que l'activitat de la catepsina H es va mostrar major en els porcs ibèrics. A més, el moment de sacrifici va influir, observant-se una major activitat enzimàtica en els porcs sacrificats al segon lot respecte dels sacrificats en el primer lot. Finalment, també es va pretendre demostrar, mitjançant una cinètica de reacció, l'adequació del mètode utilitzat basat en la determinació de la fluorescència.

ABSTRACT

After slaughtering, the skeletal muscle becomes meat through the ripening, occurring a number of biochemical reactions which are essential for the development of the meat quality, being proteolysis one of the most important group into the biochemical reactions of the meat. This is a complex process that involves, among others, the cathepsins B, B+L and H inside the group of the endopeptidases. The purpose of this study was to study the influence of genetics on the cathepsins B, B+L and H activity in the *Longissimus dorsi* muscle in pigs from the same batch, as well as the influence of the slaughtering time in the enzymatic activity of pigs with the same genotype. In order to do this, four different genotypes were studied. Three of them were industrial genotypes (IG) and the other was an Iberian breed. The influence of the genetics in the enzyme activity was demonstrated in the genotypes studied. A higher activity of the cathepsin B+L was observed in IG pigs while the activity of the cathepsin H was higher in Iberian pigs. On the other hand, the time of sacrifice influences in the enzyme activity. The pigs slaughtered in the second batch had higher enzyme activity than those sacrificed in the first batch. Finally, it was also sought to demonstrate the adequacy of the method used based on fluorescence calculation by means of a reaction kinetics study.

INTRODUCCIÓN.

La carne es uno de los alimentos más consumidos en el mundo. Durante el año 2014 se han producido alrededor de 312 millones de toneladas de las cuales, 115 millones corresponden a carne de cerdo, siendo esta, por tanto, la más consumida a nivel mundial (FAO, 2014).

En cuanto al mercado español, la carne y los productos cárnicos constituyen unos de los alimentos fundamentales dentro del patrón alimentario de la población, llegando a superar el 22% del gasto en la cesta de la compra (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, MAGRAMA, 2014).

La carne y los productos cárnicos aportan valiosos nutrientes beneficiosos para la salud, conteniendo importantes niveles de proteínas, vitaminas, minerales y micronutrientes, esenciales para el crecimiento y el desarrollo.

Tras el sacrificio del animal, el músculo esquelético se convierte en carne por medio de la maduración, durante la cual, ocurren una serie de cambios bioquímicos esenciales para el desarrollo de la calidad debido a que gran variedad de enzimas permanecen activas en el músculo *post-mortem* e intervienen en múltiples vías metabólicas. Los más importantes están relacionados con el metabolismo de los hidratos de carbono (enzimas glucolíticas) en el proceso de la glucólisis, con la degradación de las proteínas (endopeptidasas y exopeptidasas) en el proceso de proteólisis, con la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos (lipasas y fosfolipasas, respectivamente) en el proceso de lipólisis y finalmente con la transformación de los nucleótidos (Toldrá, 2006a). Además también tienen lugar reacciones de tipo químico como son las reacciones de Maillard, las degradaciones de Strecker o las oxidaciones. Todas las reacciones ocurren de forma simultánea con mayor o menor intensidad en función de las características y el momento del proceso y todas ellas van a influir en el desarrollo del aroma y del sabor final del producto.

La proteólisis constituye uno de los grupos más importantes de reacciones bioquímicas en la carne. Éste es un proceso complejo en el que participan dos grandes grupos de enzimas; las proteasas de tipo endopeptidasas (μ -calpaina (I), m-calpaina (II), catepsinas B, D, H y L, proteosoma y caspasas) y las exopeptidasas (Tri-peptidilpeptidasas I y II, dipeptidilpeptidasas I, II, III y IV, carboxipeptidasas y alanil-, arginil-, metionil-, leucil-, y piroglutamil- aminopeptidasas) (Toldrá y Flores, 1998, Sentandreu et al., 2002). Las endopeptidasas son las enzimas responsables de la degradación de las proteínas miofibrilares principalmente y en menor grado de las sarcoplásmicas, generando fragmentos proteicos y peptídicos que van a servir de sustrato a las exopeptidasas (Toldrá y Flores, 1998; Toldrá, 2006b), las cuales hidrolizan las cadenas peptídicas a partir de sus extremos terminales. Las peptidasas son las responsables de la generación de di y tripeptidos, mientras que las aminopeptidasas y carboxipeptidasas liberan aminoácidos libres (Figura 1). Estos compuestos son la base para el transcurso de nuevas reacciones químicas (reacción de Maillard y/o degradación de Strecker), importantes en el desarrollo del sabor y aroma.

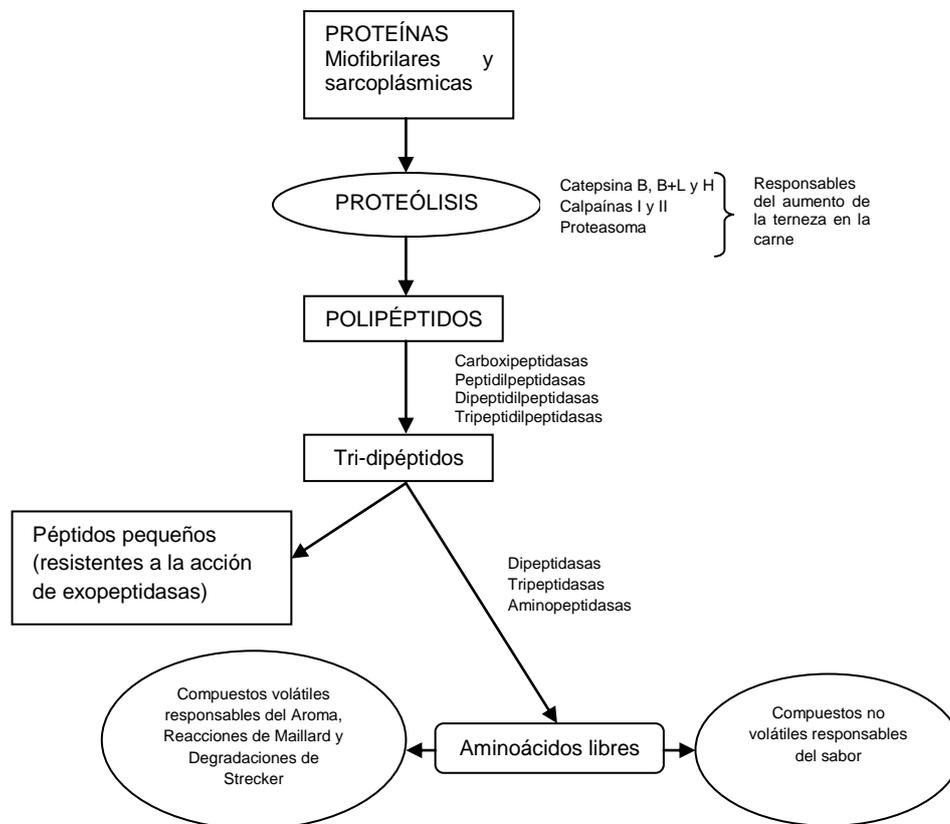


FIGURA 1. Esquema de la cadena proteolítica implicada en la degradación de las proteínas musculares.

El ablandamiento o ternura de la carne durante la maduración es debida principalmente a la degradación de las proteínas que constituyen la estructura muscular. Esta ruptura proteica se origina por acción sinérgica de las peptidasas endógenas. Sin embargo, la actividad de estas enzimas puede variar dependiendo de la genética (Hernández et al. 2004), el ejercicio (López Bote et al., 2008), la edad de los animales, el tipo de músculo, las condiciones de procesamiento de la carne (Toldrá, 1998) y la presencia de sal (Armenteros et al., 2009). Como se ha dicho anteriormente, dentro del grupo de las endopeptidasas se encuentran las catepsinas, las cuales se ubican en los lisosomas y se activan al descender el pH durante el periodo *post-mortem*. A estas catepsinas se les ha relacionado con la degradación autolítica de la estructura miofibrilar debido a que son capaces de hidrolizar la miosina, actina, nebulina, titina, tropomiosina, troponina T y el colágeno.

Las catepsinas son proteinasas ácidas lisosomales de pequeño tamaño molecular (entre 20-40 kDa), de manera que, una vez liberadas, penetran fácilmente en la estructura miofibrilar, siendo especialmente activas a pH ácido. De hecho, sus óptimos de pH están alrededor del pH de la carne (pH 6.0). De todas ellas, las más estudiadas son las catepsinas B (EC 3.4.22.1), H (EC 3.4.22.16), L (EC 3.4.22.15) y D (EC 3.4.23.5). El pH óptimo para catepsinas B y L es 6 mientras que el de la catepsina H es 6.8 a 30-40 °C

(Rico et al., 1991a y 1991b; Matsuishi et al., 2003; Godiksen et al., 2009). Todas ellas pertenecen a la clase de las cisteín proteinasas a excepción de la catepsina D que es una aspartil proteínasa. Las cisteín proteinasas requieren de un medio reductor para expresar su actividad de manera óptima (Toldrá, 2002).

A la catepsina B, además de poseer actividad endopeptidasa, también se le atribuye una cierta actividad exopeptidasa. Asimismo, es capaz de hidrolizar miosina, actina, tropomiosina, troponina T y colágeno. La catepsina H, aparte de su débil actividad endopeptidasa posee una importante actividad aminopeptidasa, por lo que también se la conoce como “arginil aminopeptidasa lisosomal”. La catepsina L degrada una amplia variedad de proteínas miofibrilares como la titina, nebulina, α -actinina, desmina y elastina (Barret et al., 1998). En el caso de las carnes curadas, las catepsinas, a diferencia de las calpaínas, son bastante estables a lo largo del proceso de curado (6 meses aproximadamente), incluso muestran actividad, del orden del 5 a 10%, después de 15 meses de curado (Rico et al., 1991; Sárraga et al., 1993; Toldrá y Flores, 1998). Sin embargo, agentes de curado como la sal inhiben fuertemente su actividad y por tanto, controlan la proteólisis. En éste aspecto, sólo el 40-50% de la actividad enzimática original de la catepsina H se mantiene en presencia de un 4-5% de sal, típica de productos cárnicos curados, mientras que las catepsinas B y L se ven menos afectadas, manteniéndose una actividad enzimática del orden del 65-75% con respecto a la actividad original. Estudios *in vitro* revelan que las catepsinas B y L podrían jugar un importante papel a lo largo de todo el curado de las carnes mientras que la catepsina H sólo participa en el medio y el final del proceso (Rico et al., 1991b). Por otro lado, hay que tener en cuenta que un exceso en la actividad catepsina en productos como el jamón curado, cuando las piezas poseen en su interior una concentración salina baja y además se someten a temperaturas moderadamente altas, puede dar lugar a un ablandamiento de la pieza y/o incluso a la formación de cristales de tirosina (Martín et al., 1998; García-Garrido, et al., 2000; Toldrá, 2006b).

Por tanto, dado que la actividad enzimática de las catepsinas proporciona ternura a la carne y también genera fragmentos proteicos y peptídicos que, en última instancia, por acción de las exopeptidasas originarán aminoácidos libres responsables del sabor y aroma en carnes curadas (Toldrá y Flores, 1998; Toldrá 2006b), es importante considerar el efecto de la actividad enzimática de las catepsinas como factor de calidad en carne de cerdo.

El principal objetivo de este trabajo ha sido estudiar, en el músculo fresco de *Longissimus dorsi*, la influencia de la genética del cerdo y del momento de sacrificio sobre la actividad enzimática de las catepsinas B, B+L y H en cerdos de cuatro genotipos diferentes, de los cuales, tres son genotipos industriales (IG), y uno de raza ibérica.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Muestras.

Las muestras analizadas fueron lomos (*Longissimus dorsi*) de cerdos de genotipo industrial (IG) y cerdos de raza ibérica. Se analizaron un total de 113 cerdos de los cuales 80 fueron IG con 3 genéticas diferentes (genética T, D y L) y 33 eran de raza ibérica (I). Los animales fueron sacrificados en 2 lotes diferentes con una separación de un mes entre ellos. Todos los cerdos tenían la misma edad (6 meses) en el momento de sacrificio. De los cerdos sacrificados en el primer lote (primera semana de marzo), 13 eran del genotipo T, 12 del genotipo D, 12 del genotipo L y 15 pertenecían a la raza ibérica. De los sacrificados en el segundo lote (primera semana de abril), 19 eran del genotipo T, 13 del genotipo D, 11 del genotipo L y 18 eran ibéricos.

La base de los cerdos IG fue Landrace x Large White con 3 machos finalizadores diferentes. La identificación precisa de los genotipos no fue revelado por el secreto empresarial.

Las canales fueron seleccionadas a la salida del túnel de congelación. A las 2 horas post-mortem se cortó el músculo *Longissimus dorsi* y se congeló a -18 °C hasta su llegada al IATA donde las muestras fueron mantenidas a -80 °C. A cada muestra se le asignó un código diferente el cual fue utilizado para realizar los análisis.

Preparación del extracto enzimático para catepsinas.

El extracto enzimático para el ensayo de catepsinas se preparó tal y como describen Toldrá y Etherington (1988). Se utilizaron 2.5 g de músculo triturado exento de grasa y tejido conectivo visible. Posteriormente, se homogenizaron 1:10 (p/v) a 4 °C con 25 ml de tampón citrato sódico 50 mM, pH 5.0, conteniendo EDTA 1 mM y Tritón X-100 al 0.2% (v/v), usando un Polytron® PT-MR 2100 (Kinematica AG, Luzernerstrasse, Suiza) (3 x 10 s) a 26.000 r.p.m. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos a 4 °C, en una centrifuga refrigerada Sorvall® Evolution RC (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, TX, E.E.U.U). El sobrenadante se recogió y se filtró a través de lana de vidrio con el fin de retener la grasa y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Este sobrenadante constituye el extracto enzimático.

Medida de la actividad enzimática para catepsinas.

PREPARACIÓN DE LOS TAMPONES DE REACCIÓN.

Las actividades enzimáticas se midieron empleando sustratos fluorescentes específicos para cada tipo de enzima. El ensayo fluorimétrico para medir la actividad catepsina se realizó siguiendo el método descrito por Rico et al. (1991 b). Las catepsinas B y B+L se ensayaron en tampón fosfato 40 mM, pH 6.0, conteniendo EDTA 0.4 mM y cisteína 10 mM. A éste tampón se le añadió el sustrato fluorescente, siendo para la catepsina B el N-CBZ-l-arginil-l-arginina 7-amido-4-metil-coumarin (Z-Arg-Arg-AMC) 0.05 mM, mientras que para la catepsina B+L se utilizó como sustrato N-CBZ-l-fenilalanil-l-arginina

7-amido-4-metil-coumarin (Z-Phe-Arg-AMC) 0.05 mM. La actividad de la catepsina H se ensayó en el mismo tampón (tampón fosfato 40 mM, EDTA 0.4 mM y cisteína 10 mM) pero a pH 6.8 y usando l-arginina 7-amido-4-metil-coumarin (Arg-AMC) 0.05 mM como sustrato. Se minimizó en lo posible el contacto de la cisteína con el oxígeno con el fin de evitar su oxidación la cual, disminuiría el ambiente reductor necesario para la correcta actuación de las catepsinas (Toldrá, 2002). El agua bidestilada empleada en todos los análisis fue de calidad Milli®-Q (Millipore, Milli®-Q Plus, Billerica MA, E.E.U.U.).

MÉTODO DE MEDIDA.

La medida de la actividad enzimática se realizó mediante un lector de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corporation Labsystems, Helsinki, Finlandia). Así pues, a 250 µL de cada uno de los tampones de reacción anteriormente citados incluyendo el sustrato se adicionó 50 µL del extracto enzimático. La mezcla de reacción (300µL) se depositó en una placa de fluorescencia de 96 pocillos y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La lectura de fluorescencia se realizó a tiempo 0 y a los 15 minutos, empleando longitudes de onda de excitación y emisión de 355 nm y 460 nm, respectivamente. En cada placa de fluorescencia se analizaron las 3 catepsinas (B, B+L y H) en 2 muestras de carne diferente. Las muestras se depositaron en los pocillos con una pipeta multivía obteniéndose así 16 valores de fluorescencia en cada catepsina B, B+L y H. Los análisis se hicieron por duplicado ya que se determinó el valor de la fluorescencia (UF) de las catepsinas a tiempo 0 y también a tiempo 15 minutos. En la Figura 2 vemos un ejemplo del conjunto de datos obtenidos con el equipo Fluoroskan tras analizar la UF de las catepsinas B, B+L y H en 2 muestras de carne de cerdos diferentes para tiempo 0 minutos y 15 minutos. Las cifras corresponden al valor de la fluorescencia (UF) obtenido en cada pocillo de la placa analizada.

		Catepsina B				Catepsina B+L				Catepsina H			
		Measurement count: 1 Ex: 355 Em: 460 Scaling Factor : 0.59/0.662											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
muestra X	A	91,45	93,34	91,47	91,38	156,5	153,2	151,2	154,3	128,2	123,5	124,9	126,9
	B	89,71	89,54	89,21	89,64	154,3	149,9	154,6	151,2	126,7	126,9	123,0	127,4
	C	88,74	90,52	90,75	91,98	140,9	138,1	143,4	148,8	127,1	126,3	123,4	129,5
	D	87,95	89,12	90,89	95,04	159,7	152,5	148,0	156,2	127,4	125,1	127,7	123,5
muestra Y	E	77,65	78,43	85,01	81,02	104,0	109,4	108,1	112,3	110,3	106,4	109,2	105,4
	F	77,95	77,48	79,95	79,69	103,5	112,1	109,2	109,0	110,0	106,5	106,1	105,0
	G	76,77	80,44	77,19	77,76	97,38	98,63	98,57	92,02	107,2	108,1	106,4	104,9
	H	76,76	74,90	77,23	76,10	104,5	102,2	104,1	97,66	102,9	104,5	102,8	102,7
		Measurement count: 2 Ex: 355 Em: 460 Scaling Factor : 0.59/0.662											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
muestra X	A	282,5	262,5	267,1	270,3	809,7	801,1	816,3	815,5	418,2	441,4	439,5	458,1
	B	267,9	249,1	253,8	259,0	769,9	773,8	743,7	775,2	433,0	429,7	356,5	426,6
	C	261,2	254,9	250,3	260,6	749,9	713,3	753,3	750,7	408,8	412,6	374,7	416,5
	D	262,3	256,0	254,8	279,0	823,5	767,2	742,3	796,6	416,6	431,8	430,6	462,3
muestra Y	E	201,6	200,0	194,4	202,7	570,9	555,1	563,3	597,0	370,2	364,5	336,2	376,4
	F	194,5	188,3	185,1	204,4	581,9	618,9	628,4	624,3	391,6	373,3	391,9	451,9
	G	187,1	190,9	188,9	184,0	571,6	588,9	572,8	537,5	377,8	339,8	375,1	398,1
	H	197,3	200,0	192,5	189,2	617,3	615,3	614,7	648,9	400,5	412,5	404,3	437,7

FIGURA 2. Ejemplo de un informe de datos proporcionado por el equipo Fluoroskan tras analizar la fluorescencia de las catepsinas B, B+L, H para 2 muestras de músculo *Longissimus dorsi* de 2 cerdos diferentes en tiempo 0 y tiempo 15 minutos.

Para realizar los cálculos, se restó el valor de fluorescencia obtenido a tiempo final (15 minutos) menos el valor de fluorescencia a tiempo 0 en cada uno de los pocillos, obteniéndose así los valores de UF neta. Posteriormente, para cada muestra se calculó la media de los valores de UF neta obtenidos en cada una de las catepsinas, siendo este valor medio de fluorescencia el que se empleó para la determinación de la actividad enzimática (U/g).

CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Se determinó una recta patrón para cada una de las catepsinas analizadas. Para la obtención de la recta patrón se hicieron diferentes diluciones con concentraciones conocidas de 7-amino-4-metilcumarin (AMC). Para hacer las diluciones de AMC se utilizó el tampón de reacción correspondiente a cada una de las catepsinas analizadas. El pH del tampón de reacción se ajustó de modo que las diluciones de AMC tuvieran el pH óptimo para cada enzima estudiada. Se obtuvo así diferentes rectas patrón de fluorescencia de AMC correspondientes a los diferentes pH óptimos de actuación de las enzimas. El pH utilizado en la elaboración de las curvas patrón de las catepsinas B y B+L fue 6, mientras que el pH para las curvas patrón de catepsina H fue 6.8. Las diluciones realizadas fueron 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 micromolar de 7-amino-4-metilcumarin en las cuales se determinó respectivamente su valor de fluorescencia (UF). Se tomaron 4 medidas de la UF en cada dilución de AMC. Para la representación gráfica se adoptó el valor medio de estas 4 mediciones de cada dilución. En las rectas patrón se representó el valor de fluorescencia (UF) para las diferentes concentraciones de AMC analizadas. Con todos los puntos representados en la gráfica, se hizo una regresión lineal obteniendo así el valor de la pendiente que posteriormente se utiliza para el cálculo de la actividad enzimática.

FÓRMULA PARA EL CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Una unidad de actividad enzimática proteolítica (U) se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 nanomol de sustrato por minuto a 37 °C. En el presente estudio, los resultados se expresaron como unidades (U) por gramo de músculo. La fórmula empleada para realizar los cálculos fue la siguiente:

$$\frac{U}{g} = \frac{UF}{15\text{min}} \times \frac{1}{m} \times \frac{0.3 \text{ ml en el pocillo} \times 10^{-3}}{0.05 \text{ ml extracto enzimático en el pocillo}} \times \frac{V_{\text{ext}} (\text{ml})}{2.5 \text{ g de carne}} \times 1000 \quad (1)$$

donde $\frac{U}{g}$ = actividad enzimática proteolítica (U) por gramo de muestra; UF= media de las unidades de fluorescencia neta; m= pendiente de la curva de

calibrado expresada en $\left(\frac{\text{UF}}{\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}}\right)$; V_{ext} = volumen en ml de tampón de extracción usados para obtener el extracto enzimático (en nuestro caso son 25 ml).

Cinética de reacción.

Para determinar la cinética de reacción se obtuvo el valor de la fluorescencia a diferentes tiempos de incubación. El procedimiento adoptado fue la determinación de la fluorescencia de las catepsinas B, B+L y H cada 5 minutos durante 30 minutos a 37°C y a una longitud de excitación y emisión de 355 y 460 nm respectivamente. Los tiempos utilizados para tomar las medidas de la fluorescencia fueron 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Los datos se obtuvieron para 2 muestras de *Longissimus dorsi* de dos animales de la misma genética que habían mostrado anteriormente diferentes rangos de valor de fluorescencia.

Cálculo estadístico.

El efecto de las diferentes genéticas y tiempos de sacrificio en la actividad enzimática se hizo con un análisis de varianza (ANOVA). En éste análisis se comparó la actividad enzimática de las diferentes genéticas entre sí dentro de un mismo momento de sacrificio y por otro lado, se compararon las actividades enzimáticas observadas en los distintos momentos de sacrificio para cada una de las genéticas por separado. El software estadístico utilizado fue el XLSTAT 2012 (Addinsoft, Barcelona, España). Se usó el test de Fisher (LSD) para evaluar las diferencias entre los diferentes grupos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Calibración del método.

Una unidad de actividad enzimática proteolítica (U) se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 nanomol de sustrato por minuto a 37 °C. En el presente estudio, los resultados han sido expresados como unidades (U) por gramo de músculo.

Mediante el análisis de la fluorescencia podemos determinar la cantidad de 7-amino-4-metilcumarin (AMC) liberados por minuto, calculándose así la cantidad de catepsina que actúa, ya que la relación entre catepsina B, B+L y H que reacciona con el sustrato y la cantidad de AMC liberado es de 1:1. Por tanto, la concentración de enzima que reacciona con el sustrato es directamente proporcional a la cantidad de 7-amino-4-metilcumarin liberado.

En las muestras de carne, la cantidad de AMC liberado por cada enzima durante el tiempo de incubación, se calculan por interpolación de los valores de fluorescencia proporcionados por el fluorímetro en una recta patrón que

correlaciona distintos valores de fluorescencia (UF) con sus correspondientes concentraciones de AMC. Por tanto, es necesario realizar unas rectas patrón a partir de concentraciones de AMC conocidas y sus respectivas fluorescencias (UF). En este estudio se hicieron 2 curvas patrón. Una para catepsinas B y B+L ya que comparten tampón de reacción y pH óptimo de actividad enzimática, siendo este igual a 6, mientras que la otra curva fue para la catepsina H cuyo pH óptimo es igual a 6.8 (Figuras 3 y 4).

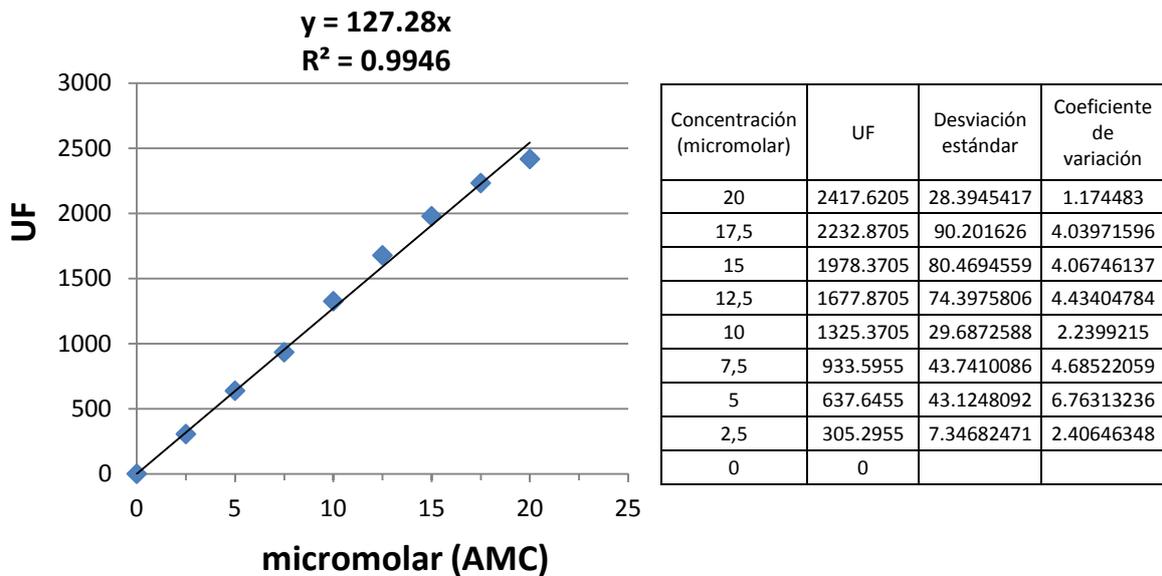


FIGURA 3. Recta patrón para pH 6 correspondiente a las catepsinas B y B+L junto con las medias, desviación estándar y coeficiente de variación de la UF neta obtenida en cada una de las diluciones de AMC.

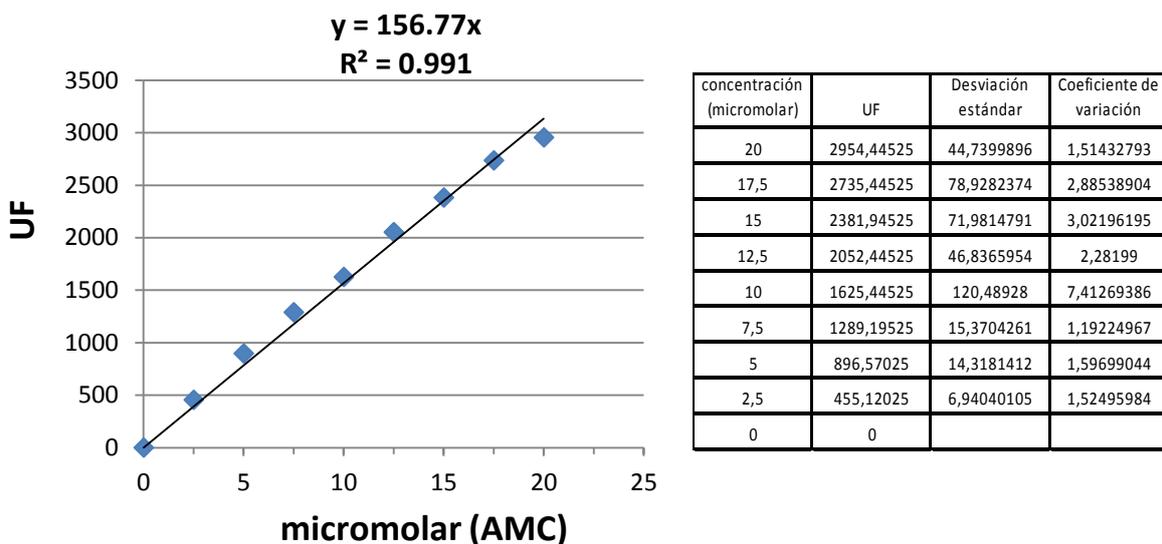


FIGURA 4. Recta patrón para pH 6,8 correspondiente a la catepsina H junto con las medias, desviación estándar y coeficiente de variación de los valores de fluorescencia (UF) obtenidos en cada una de las diluciones de AMC.

Con los datos de UF obtenidos se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV), dando éste un resultado por debajo del 10% para todos los valores de fluorescencia, siendo así aceptable la reproducibilidad de los resultados. Con los valores obtenidos se hizo una regresión lineal determinándose un valor de $R^2=0.9946$ para la recta de catepsina B y B+L y $R^2=0.991$ para la de la catepsina H, con lo que la recta se ajustó bien a los puntos obtenidos. Por tanto, para el cálculo de la actividad enzimática, se utilizaron los valores de las pendientes de catepsina B y B+L ($m=127.28$) y catepsina H ($m=156.77$). Es muy importante que el pH esté bien ajustado durante el análisis ya que las catepsinas, B, B+L y H, a pH neutro o básico ven modificada en gran medida su actividad enzimática.

Cinética de reacción

Los valores de UF neta obtenidos en los análisis de catepsinas B, B+L y H se calculan mediante la diferencia entre el valor de la fluorescencia a tiempo 0 y el valor de la fluorescencia a tiempo 15 minutos. Sin embargo, debido a que se observaron valores de UF muy heterogéneos entre animales de una misma genética, se realizó una cinética de reacción para determinar si la actividad de las catepsinas pudiera sufrir una variación antes de que se terminaran los 15 minutos del periodo de incubación, como consecuencia de un posible agotamiento del sustrato, agotamiento de la enzima, etc. Si el momento de máxima fluorescencia se encontrara dentro del periodo de incubación, el valor de UF neta obtenido sería entonces inferior al esperado. Por el contrario, si la fluorescencia sufriera un aumento brusco durante todo el periodo de incubación, se obtendrían valores por encima de lo esperado, lo que podría explicar la heterogeneidad observada entre animales del mismo genotipo. Por tanto, en este estudio se pretende determinar si las catepsinas sufren un cambio de actividad durante el tiempo de incubación, así como también determinar si existe el riesgo de quedarnos sin sustrato en caso de no hacer el análisis inmediatamente después de poner en contacto la enzima con el sustrato de reacción.

Para realizar la cinética de reacción se determinó en el fluorímetro la fluorescencia (UF) en intervalos de 5 minutos durante media hora. Las muestras elegidas para hacer el ensayo fueron las correspondientes al músculo *Longissimus dorsi* de dos animales con la misma genética (en éste caso fue la genética L), los cuales, dieron resultados diferentes de fluorescencia neta ($UF_{15 \text{ min}} - UF_0$) en anteriores experimentos. A éstas muestras las llamamos A y B. Los ensayos realizados con estas dos muestras de *Longissimus dorsi* tenían como objeto determinar si las diferencias en los valores de sus UF observadas en experimentos anteriores, fueron originadas por anomalías durante el proceso de determinación fluorimétrica o por otros factores ajenos al sistema de medición. En las figuras 5 y 6 se muestran las gráficas que resultaron al hacer las cinéticas de reacción.

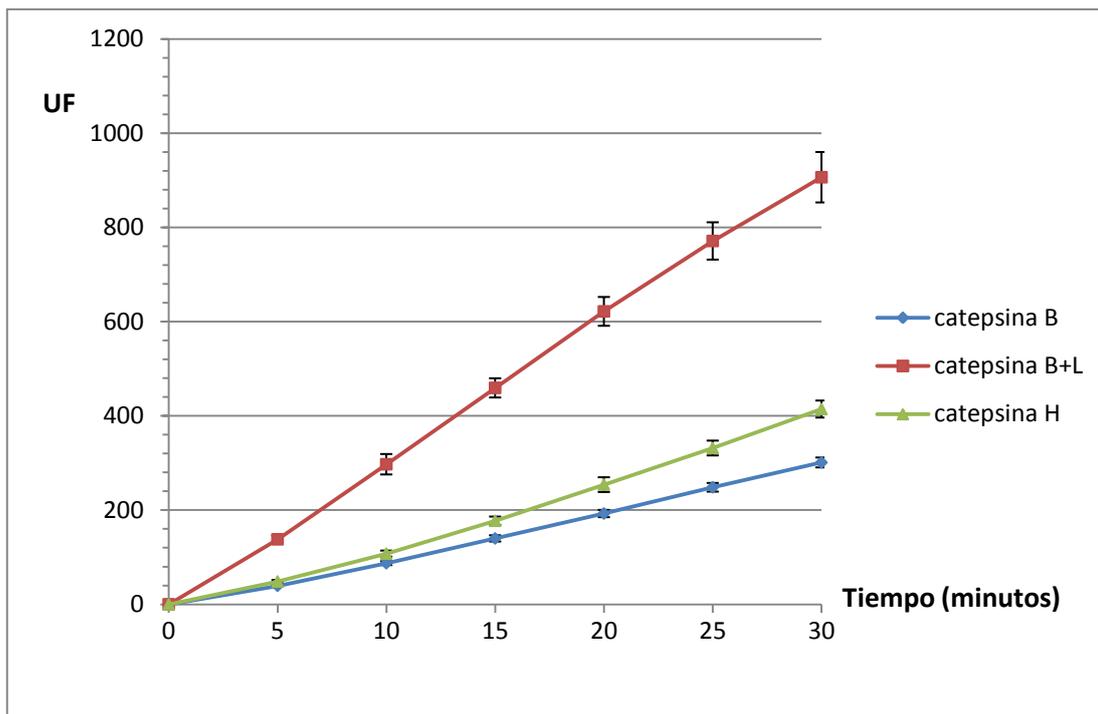


FIGURA 5. Curvas de fluorescencia neta de catepsinas B, B+L y H en diferentes tiempos a 37°C para la muestra A.

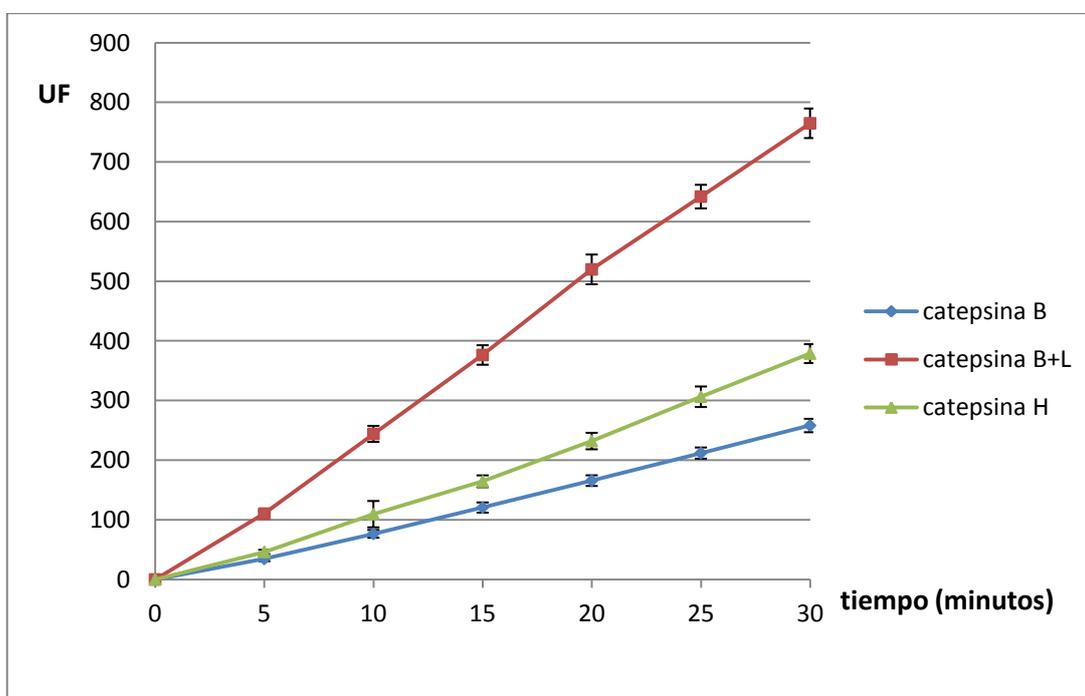


FIGURA 6. Curvas de fluorescencia de catepsinas B, B+L y H en diferentes tiempos a 37°C para la muestra B.

En éstas gráficas vemos que la fluorescencia y por tanto, la actividad enzimática, se manifestaron en aumento constante y uniforme durante los 30 minutos ensayados. Por esta razón, se puede decir que hay enzima y sustrato en exceso dentro de la muestra para poder realizar sin problemas el periodo de incubación de 15 minutos. Así pues, el hecho de que las pendientes de las curvas se mantuvieran prácticamente invariables hasta valores muy posteriores a los 15 minutos, indica también que no había riesgo de quedarnos sin enzimas ni sustrato en caso de retrasar el inicio del análisis después de haber añadido el extracto enzimático sobre el sustrato.

De este modo, concluimos que la variabilidad de los valores de UF obtenidos dentro de una misma genética, no fue producida por el método utilizado en la medición de fluorescencia, ya que habían enzimas y sustrato suficiente como para que la reacción no parara durante el periodo de incubación, manifestándose así una actividad enzimática y velocidad de reacción constante durante todo el ensayo. Es por esto, que el diferente grado de actividad enzimática observado entre muestras procedentes de cerdos de la misma genética se debió a factores ajenos al sistema de medición de fluorescencia, como podría ser por ejemplo el ejercicio (López-Bote et al., 2008), el sexo (Armero et al., 1999), errores durante el análisis, etc. Por otro lado, también se concluye que entre el momento de aplicación del enzima al sustrato y el análisis fluorimétrico hay margen de tiempo suficiente como para poder realizar la operación correctamente.

Actividades enzimáticas de las distintas genéticas.

La intensidad de la actividad enzimática de las catepsinas es un dato muy importante para determinar la calidad de las carnes, ya que provoca la tenderización de ésta y además, genera fragmentos proteicos y peptídicos que servirán de sustrato a las exopeptidasas (Toldrá y Flores, 1998; Toldrá 2006b). Tras determinar el valor de las actividades enzimáticas, se procedió a realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos. Se hizo una comparación de la actividad de las catepsinas en el músculo *Longissimus dorsi* entre las genéticas del lote 1 (Tabla 1), y del lote 2 (Tabla 2), revelándose importantes diferencias en la actividad proteolítica causadas por factores genéticos.

TABLA 1. Comparación de la actividad de las catepsinas entre las genéticas del lote 1. Las letras a, b y c indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

	Cerdos del Lote 1 (sacrificio primera semana de marzo)							
	Cerdos de genotipo industrial (IG)						Cerdos ibéricos	
	Genética T		Genética D		Genética L		Genética I	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Catepsina B	4.78	1.18	4.01	0.87	4.29	0.89	4.08	1.27
Catepsina B+L	10.96a	3.46	10.33a	2.03	10.76a	2.67	7.54b	2.34
Catepsina H	5.10b	1.04	4.32bc	0.45	4.16c	0.88	6.65a	1.23

TABLA 2. Comparación de la actividad de las catepsinas entre las genéticas del lote 2. Las letras a y b indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

	Cerdos del Lote 2 (sacrificio primera semana de abril)							
	Cerdos de genotipo industrial (IG)						Cerdos ibéricos	
	Genética T		Genética D		Genética L		Genética I	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Catepsina B	4.52	0.84	4.12	0.66	3.95	1.08	4.13	1.56
Catepsina B+L	13.69a	2.17	13.65a	2.86	11.66ab	3.27	9.73b	2.86
Catepsina H	6.28b	1.28	5.80b	1.68	6.26b	1.30	7.65a	1.37

Para la actividad enzimática de catepsina B no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las distintas genéticas tanto para el lote 1 como para el lote 2. Siendo la media de la actividad de la catepsina B igual a 4.29 U/g en el lote 1, mientras que en el lote 2 fue 4.18 U/g. Sin embargo, la catepsina B+L sí que presentó diferencias significativas en ambos lotes. En el lote 1, la actividad de la catepsina B+L se manifestó significativamente inferior en cerdos ibéricos que en cerdos IG ($p < 0.05$), obteniéndose un valor de 7.54 U/g frente al valor medio de actividad 10.68 U/g de los cerdos IG. En catepsina H, el mayor valor de actividad del lote 1 se observó en el genotipo ibérico alcanzándose el valor de 6.65 U/g, existiendo una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los IG. No obstante, dentro de éste grupo de las catepsinas H en los cerdos IG del primer lote, la genética D no presentó diferencias significativas con la genética T ($p > 0.05$), obteniéndose una actividad enzimática media de 4,71 U/g. Al mismo tiempo, tampoco se observó una diferencia significativa de la actividad de las catepsinas entre la genética D y la L ($p > 0.05$) con un valor medio de 4.24 U/g. Sin embargo, el grupo formado por las genéticas T y D sí que presentó una diferencia significativa en actividad enzimática ($p < 0,05$) respecto al grupo formado por las genéticas D y L.

Para los cerdos del lote 2, al igual que ocurre en el lote 1, la actividad enzimática de la catepsina H en los ibéricos fue la más alta con un valor de 7.65 U/g, existiendo una diferencia significativa con respecto a los cerdos IG cuya actividad fue 6.11 U/g. Dado que los cerdos ibéricos tienen más grasa intramuscular que los cerdos de genotipo industrial (Cava, et al., 2004), los valores de actividad más altos para catepsina H en ibéricos con respecto a los IG muestran discordancia con algunos autores (Armero et al., 1999; Rosell y Toldrá, 1998) para quienes los cerdos magros presentan valores de actividad de catepsina H más altos que genotipos de conformación más pobre. En cuanto a la catepsina B+L de los cerdos del lote 2, no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre la actividad enzimática de la genética L y la I obteniéndose un valor de 10,69 U/g. Tampoco existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las actividades enzimáticas de las genéticas T, D, y L dándose un valor medio de 13 U/g. Sin embargo, sí que existe diferencia

significativa ($p < 0.05$) entre la actividad enzimática del grupo formado por las genéticas T, D y L y la del grupo formado por las genéticas L e I.

Por tanto, concluimos que la genética influye en la actividad enzimática de una carne existiendo diferencias significativas en la actividad de las catepsinas B+L y H del músculo *Longissimus dorsi* dentro de un mismo lote de sacrificio, observándose que la catepsinas B+L tiende a ser mayor en los cerdos IG que en los ibéricos, mientras que la actividad de la catepsina H se presentó siempre mayor en los cerdos de raza ibérica. Según Rico et al. (1991b), las catepsinas B y L podrían desempeñar un importante papel a lo largo de todo el proceso de curado mientras que la catepsina H sólo participa en el medio y en el final del curado. Para estos autores, la concentración de sal ejerce un poder inhibitor mucho mayor en la actividad de la catepsina H que en la de las catepsinas B y L, lo que podría influir en la terneza y propiedades organolépticas de los lomos destinados a ser curados con sal. Por tanto, para un mismo tipo de procesado, los lomos de los cerdos ibéricos (genética I), podrían presentar diferencias de calidad en el producto final respecto a los de los lomos de los cerdos con genéticas T, D y L.

Por otro lado, la actividad de la catepsina B no presentó diferencias significativas en ninguna de las genéticas estudiadas, por lo que se deduce que el factor genético no ejerce ninguna influencia en la actividad enzimática de esta enzima en los genotipos analizados en el presente estudio.

También se realizó una comparación de las actividades de las diferentes catepsinas entre los dos lotes de sacrificio para cada genética por separado. En este aspecto, encontramos que, para una misma genética, se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) de la actividad enzimática entre los distintos lotes (Tablas 3, 4, 5 y 6).

TABLA 3. Comparación de la actividad de las catepsinas de los cerdos con genotipo T entre los dos lotes de sacrificio. Las letras a y b indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

	Genética T			
	Lote 1		Lote 2	
	Media	SD	Media	SD
Catepsina B	4.78	1.18	4.52	0.84
Catepsina B+L	10.96b	3.46	13.69a	2.17
Catepsina H	5.10b	1.04	6.28a	1.28

TABLA 4. Comparación de la actividad de las catepsinas de los cerdos con genotipo D entre los dos lotes de sacrificio. Las letras a y b indican diferencia significativa ($P<0.05$).

	Genética D			
	Lote 1		Lote 2	
	Media	SD	Media	SD
Catepsina B	4,01	0.87	4.12	0.66
Catepsina B+L	10,33b	2.03	13.65a	2.86
Catepsina H	4,32b	0.45	5.80a	1.68

TABLA 5. Comparación de la actividad de las catepsinas de los cerdos con genotipo L entre los dos lotes de sacrificio. Las letras a y b indican diferencia significativa ($P<0.05$).

	Genética L			
	Lote 1		Lote 2	
	Media	SD	Media	SD
Catepsina B	4.29	0.89	3.95	1.08
Catepsina B+L	10.76	2.67	11.66	3.27
Catepsina H	4.16b	0.88	6.26a	1.30

TABLA 6. Comparación de la actividad de las catepsinas de los cerdos con genotipo I entre los dos lotes de sacrificio. Las letras a y b indican diferencia significativa ($P<0.05$).

	Genética I			
	Lote 1		Lote 2	
	Media	SD	Media	SD
Catepsina B	4.08	1.27	4.13	1.56
Catepsina B+L	7.54b	2.34	9.73a	2.86
Catepsina H	6.65b	1.23	7.65a	1.37

En cuanto a la actividad de la catepsina B, no existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre los 2 lotes, en ninguna de las cuatro genéticas estudiadas, obteniéndose unos valores medios de actividad enzimática del orden de 4,65 U/g, 4.06 U/g, 4.12 U/g y 4.10 U/g en las genéticas T, D, L e I respectivamente.

Para la catepsina B+L existen diferencias significativas de actividad enzimática ($p<0.05$) entre los 2 lotes en las genéticas T, D e I, siendo las más altas las correspondientes al lote 2 con valores de 13.69, 13.65 y 9.73 U/g respectivamente. En la actividad enzimática de la genética L no se observó diferencia significativa entre lotes ($p>0.05$) obteniéndose un valor de actividad de catepsina B+L de 11.21 U/g.

Por último, en la actividad enzimática de la catepsina H se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los 2 lotes en todas las genéticas, siendo las del lote 2 las que alcanzan un valor más alto (6.28, 5.80, 6.26 y 7.65 U/g para las genéticas T, D, L e I respectivamente).

Por tanto, el momento de sacrificio influyó en la actividad proteolítica dentro de una misma genética para las catepsinas H, siendo el lote 2 el que presentó mayor actividad. Las actividades de las catepsinas B+L en las genéticas T, D e I también se vieron influenciadas por el momento de sacrificio, obteniéndose valores más altos en las del lote 2, mientras que en la genética L no se observó ningún tipo de influencia por el momento de sacrificio. En cuanto a la actividad de la catepsina B, hay que destacar que no se vio influenciada por el momento de sacrificio en ninguna de las 4 genéticas. Por tanto, se observó que la actividad enzimática de las catepsinas era más alta en los cerdos sacrificados en el lote 2 que los del lote 1, lo que podría repercutir en diferencias organolépticas de la carne tanto cruda como curada. Las diferencias de las actividades de las catepsinas observadas entre los diferentes lotes dentro de una misma genética, podría deberse a que el mes transcurrido desde el sacrificio del lote 1 al sacrificio del lote 2 (mes de abril), suele presentar condiciones climatológicas muy cambiantes, lo cual podría influir en la biología del animal, modificando así la actividad de las catepsinas. Sin embargo, harían falta más estudios para confirmar ésta hipótesis.

CONCLUSIONES.

El estudio de la cinética de reacción nos muestra que el tiempo empleado para la incubación de las muestras durante los análisis de fluorescencia (15 minutos a 37 °C) es correcto, ya que la reacción enzimática se mantuvo constante durante todo el intervalo de tiempo en el que las muestras fueron analizadas. Por tanto, el diferente grado de actividad enzimática observado en cerdos de la misma genética, se debe a factores ajenos al sistema de medición de fluorescencia.

Además, al mantenerse la reacción enzimática constante varios minutos después de haber finalizado el periodo de incubación, indica que entre el momento de aplicación del enzima al sustrato y el análisis fluorimétrico, hay margen de tiempo suficiente como para poder realizar la operación sin riesgo de agotarse el enzima o el sustrato durante el análisis.

El estudio de la actividad de las catepsinas B+L y H del músculo *Longissimus dorsi* entre las diferentes genéticas dentro de un mismo lote de sacrificio, confirma estudios previos que afirman que la genética influye en la actividad enzimática. En este sentido, las catepsinas B+L tiende a ser mayor en los cerdos IG que en los ibéricos, mientras que la actividad de la catepsina H se presenta mayor en los cerdos de raza ibérica. Por tanto, los lomos de los cerdos ibéricos (genética I) destinados a curado, podrían presentar diferencias de calidad respecto a los lomos procedentes de los cerdos IG en los genotipos estudiados.

Por último, se observó una actividad enzimática más alta en los cerdos sacrificados en el lote 2 que en los del lote 1, mostrando así que el momento de sacrificio es otro factor influyente en la actividad enzimática de animales con la misma genética, lo que podría repercutir en diferencias organolépticas de la carne tanto cruda como curada.

AGRADECIMIENTOS.

Se agradece la colaboración de la empresa cárnica Incarlopsa. Asimismo el autor desea expresar su agradecimiento a los miembros del Grupo de Bioquímica, Tecnología e Innovación de la Carne y Productos Cárnicos del departamento de Ciencia de Alimentos del IATA por su inestimable ayuda.

REFERENCIAS.

- Armenteros, M.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. 2009. Effect of Sodium, Potassium and Magnesium Chloride Salts on Porcine Muscle Proteases. *European Food Research and Technology*, 229: 93-98.
- Armero, E.; Barbosa, J.A.; Toldrá, F.; Balsega M.; Pla, M. 1999. Effects of the Terminal Sire Type and Sex on Pork Muscle Cathepsins (B, B+L and H), Cysteine Proteinase Inhibitors and Lipolytic Enzyme Activities. *Meat Science*, 51, 185-189.
- Barret, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F. 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. London: Academic Press.
- Cava, R.; Ferrer, J.M.; Estévez M.; Morcuende, D; Toldrá, F. 2004. Composition and Proteolytic and Lipolytic Enzyme Activities in Muscle *Longissimus dorsi* from Iberian Pigs and Industrial Genotype Pigs. *Food Chemistry*, 88, 25-33.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations. Producción y Sanidad Animal [en línea]. Departamento de Agricultura y Protección al Consumidor. Dirección URL: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>. [Consulta: 15 Dic. 2014]
- García-Garrido, J.A.; Quiles-Zafra, R.; Tapiador, J.; Luque de Castro, M.D. 2000. Activity of Cathepsin B, D, H and L in Spanish Dry-Cured Ham of Normal and Defective Texture. *Meat Science*, 56, 1-6.
- Godiksen, H.; Morzel, M.; Hyldig, G.; Jessen, F. 2009. Contribution of Cathepsins B, L and D to Muscle Protein Profiles Correlated with Texture in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 113(4), 889-896.
- Hernández, P.; Zomen, L.; Ariño, B.; Blasco, A. 2004. Antioxidant, Lipolytic and Proteolytic Enzyme Activities in Pork Meat from Different Genotypes. *Meat Science*, 66: 525-529.
- López Bote, C.J.; Toldrá, F.; Daza, A.; Ferrer, J.M.; Menoyo, D.; Sillio, L.; Rodríguez, M.C. 2008. Effect of Exercise on Skeletal Muscle Proteolytic Enzyme Activity and Meat Quality Characteristics in Iberian Pigs, *Meat Science*, 79: 71-76.
- Martín, L.; Córdoba, J.J.; Antequera, T.; Timón, M.L.; Ventanas, J. 1998. Effect of Salt and Temperature on Proteolysis During Ripening of Iberian Ham. *Meat Science*, 49, (2), 145-153.
- Matsuishi, M.; Saito, G.; Okitani, A.; Kato, H. 2003. Purification and Some Properties of Cathepsin H from Rabbit Skeletal Muscle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(4), 474-485.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España. [En línea]. Datos de consumo alimentario en España 2013. Dirección URL: http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/PRESENTACION_DATOS_CONSUMO_2013_tcm7-321988.pdf. [Consulta: 15 Dic. 2014].

- Rico, E.; Toldrá, F.; Flores, J. 1991a. Assay of Cathepsin-D Activity in Fresh Pork Muscle and Dry-Cured Ham. *Meat Science*, 29(4), 287-293.
- Rico, E.; Toldrá, F.; Flores, J. 1991 b. Effect of Dry-Curing Process Parameters on Pork Muscle Cathepsin B, H and L Activity. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 193, 541-544
- Santandreu, M. A.; Coulis, G.; Ouali, A. 2002. Role of Muscle Endopeptidase and their Inhibitors in Meat Tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 398-419.
- Toldrá, F. 2006a. Meat: Chemistry and Biochemistry. In: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Ed Y. H., Hui. pp 28-1 - 28-18. CRC Press, BocaRaton, FL, USA.
- Toldrá F. 2006b. Dry-cured Ham. In: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Ed. Y. H., Hui. pp 164-1- 164-11. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Toldrá, F. 2006c. The Role of Muscle Enzymes in Dry-Cured Meat Products with Different Drying Conditions. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 164-168.
- Toldrá, F. 2002. Dry-Cured Meat Products. Trumbull, CT 06611 USA; Food & Nutrition Press INC.
- Toldrá F. 1998. Proteolysis and Lipolysis in Flavour Development of Dry-Cured Meat. *Meat Science*, 49, 101-110
- Toldrá F. y Flores, M. 1998. The Role of Muscle Proteases and Lipases in Flavor Development During the Processing of Dry-Cured Ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 331-354..
- Toldrá, F. y Etherington, D.J. 1988. Examination of Cathepsins B, D, H and L Activities in Dry-cured Hams. *Meat Science*, 23, 1-7.