

ESTUDIO DE LA MADURACIÓN DE CARNE DE CORDERO EMPLEANDO ELECTROFORESIS SDS-PAGE

STUDY OF LAMB MEAT AGEING USING ELECTROPHORESIS SDS-PAGE

ESTUDO DO MATURAÇÃO CORDEIROS USANDO ELETROFORESE SDS-PAGE

Gina A. Torres L.¹, Iván C Sánchez B.², Luz P. Restrepo S.¹, William Albarracín H.^{3*}

Recibido: 11/06/2011 – Aceptado: 13/08/2012

RESUMEN

La maduración de la carne es causada por reacciones metabólicas que producen cambios en su calidad, mejorando las características organolépticas como la ternura, la jugosidad y el color. El presente estudio tuvo como objetivo encontrar los cambios producidos en las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares durante la instauración del *rigor mortis* y la maduración en carne de cordero semiestabulado (AS) y cordero alimentado por pastoreo (AP). Para tal fin se tomaron muestras del músculo *Longissimus dorsi* de corderos de raza Dorper x criollo $\frac{3}{4}$ de diez semanas de edad. Las proteínas sarcoplasmáticas se extrajeron con agua y solución salina diluida, y las proteínas miofibrilares con solución salina concen-

trada. La cuantificación se hizo por el método de Bradford y la separación por electroforesis SDS-PAGE.

En las proteínas sarcoplasmáticas se observó la aparición de una banda de 146 kDa a los cinco y trece días para los corderos AS y AP, respectivamente. En las proteínas miofibrilares se encontró evidencia del *rigor mortis* a las 16 h y una intensificación drástica de una banda de 28 kDa a las 16 h en el cordero AS. Esta banda también se observó en el cordero AP a las 14 h. En todo el proceso se pudo ver la degradación gradual de la DESMINA, ACTINA Y TROPONINA T.

Palabras clave: carne, maduración, electroforesis, corderos.

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, carrera 30 N.º 45-03, Bogotá, Colombia.

² Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores "Virginia Gutiérrez de Pineda". Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA)-Colciencias. Universidad Nacional de Colombia, carrera 30 N.º 45-03, Bogotá, Colombia.

³ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA)-Colciencias. Universidad Nacional de Colombia, carrera 30 N.º 45-03, Bogotá, Colombia.

* walbarracinh@unal.edu.co

ABSTRACT

The ageing of meat is caused by metabolic reactions than result in changes in its quality, improving its organoleptics characteristics such as the tenderness, the juiciness and the color. This study had the aim to find changes in sarcoplasmic and myofibrillar proteins during the establishment of *rigor mortis* and the ageing in lamb meat: semi feedlot (SF) and lamb feeding for pasture (FP). For this purpose, were sampled *Longissimus dorsi* muscle of lambs bred Dorper x Criollo $\frac{3}{4}$ and 10 weeks old. Sarcoplasmic proteins were extracted with water or saline solution diluted and the myofibrillar protein with saline solution concentrate. The Quantification was done by the Bradford method and the separation by SDS-PAGE electrophoresis. In the sarcoplasmic proteins observed the appearance of a band of 146 kDa in the samples of five and thirteen days for lamb SB and AP, respectively. In the myofibrillar proteins found evidence of the establishment of *rigor mortis* at 16 hours and a drastic intensification of a band of 27 kDa to 16 hours in the lamb SB. This band was also observed in the lamb FP at 14 hours. In the whole process could see the gradual degradation of Desmin, Actin and Troponin T.

Key words: Meat, ageing, electrophoresis, lamb.

RESUMO

A maturação da carne é causada por reações metabólicas que resultam em alterações na qualidade, melhorando as características organolépticas, tais como a suculência, ternura e cor. Este estudo

teve como objetivo encontrar alterações nas proteínas miofibrilares sarcoplasmático e durante o início do rigor mortis e maturação na carne: cordeiro Semie-tabulado (AS) e pastagem-fed cordeiro (AP). Para o efeito, amostras do músculo *Longissimus dorsi* de cordeiros Dorper x criollo $\frac{3}{4}$ de 10 semanas de idade. As proteínas sarcoplasmático foram extraídas com água ou soro fisiológico e diluído com concentrado de proteína miofibrilar salina. Quantificação foi feita pelo método de Bradford e separação por electroforese SDS-PAGE. Nas proteínas sarcoplasmático observado o aparecimento de uma banda de 146 kDa cinco e 13 dias de cordeiro AS e AP, respectivamente. As proteínas miofibrilares encontraram evidências de rigor mortis em 16 horas e uma intensificação drástica de uma banda de 28 kDa a 16 horas no cordeiro AS. Esta banda também foi observada na AP cordeiro em 14 horas. Durante todo o processo podia ver a degradação gradual da Desmina, Actina e Troponina T.

Palavras-chave: carne, maturação, electroforese, cordeiro.

INTRODUCCIÓN

La maduración de la carne produce cambios fisicoquímicos y sensoriales donde se ven modificadas la terneza, la jugosidad, el color y el olor, principalmente, las cuales se encuentran influenciadas por la especie, la raza, la edad, el sexo (1), el manejo de los animales, la alimentación (2), el tipo de músculo y el sentido de corte.

La terneza es uno de los atributos de la carne más importantes y se ha encontrado

que la dureza sensorial es, en la mayoría de casos, la causa de inaceptabilidad de la carne por los consumidores (3).

Después de la muerte del animal, falla el sistema circulatorio y respiratorio, lo que causa que no haya más aporte de O_2 y nutrientes a las células, las cuales continúan demandando energía, iniciando los procesos metabólicos de glucogenólisis y glicólisis anaerobia; este último produce ácido láctico, responsable del descenso del pH. Una vez acabadas las reservas de glucógeno la glucogenólisis y la glicólisis anaerobia terminan, dando como resultado que no se produzca más ATP, y es el punto conocido como *rigor mortis* (4). En este último hay una unión irreversible entre las moléculas de actina y miosina, que forman el complejo actomiosina, responsable del encogimiento del músculo y de la rigidez cadavérica. El *rigor mortis* puede coincidir con el pH mínimo alcanzado en el músculo, que en los ovinos se encuentra entre las 12 h a 24 h *post mortem* (4).

El pH durante el comienzo del rigor influencia directamente la terneza de la carne, la capacidad de retención de agua y el color de la carne a través de sus efectos sobre la proteólisis, la desnaturalización de proteínas y el encogimiento de las miofibrillas (5, 6, 7, 8).

En la etapa *post mortem* hay un mejoramiento en la tenderización de la carne, que resulta del rompimiento de las estructuras miofibrilares por peptidasas endógenas (9). Existen varias teorías acerca del ablandamiento y la tenderización de la carne, relacionadas con sistemas enzimáticos: catepsinas (10), calpaínas (11), proteosomas (12) y caspasas (13); estos

dos últimos sistemas están incluidos en una teoría más reciente de tenderización de la carne, según la apoptosis o muerte celular programada. De estos sistemas se ha demostrado que el sistema de calpaínas μ -calpaína, m-calpaína y calpaína 3 o p 94 contribuye ampliamente a la tenderización (14). De las catepsinas, por otra parte, se han encontrado evidencias que no tienen relación con la tenderización (15); sin embargo, la actividad de las catepsinas B y L se han relacionado con la tenderización de carne de res (16).

Por otra parte, el proteosoma es un complejo multicatalítico de proteasas involucrado en procesos celulares básicos como apoptosis. La acción combinada de calpaínas y los cambios fisicoquímicos en el músculo desestabilizan las estructuras miofibrilares, conduciendo a una lenta desnaturalización de las proteínas, las cuales llegan a ser accesibles al proteosoma, siendo así hidrolizadas.

Por último, el sistema de las caspasas, que son proteasas, es el sistema enzimático que está estrechamente relacionado con la teoría de la tenderización de la carne por apoptosis. La apoptosis es un mecanismo de los seres vivos que elimina el exceso de células dañadas potencialmente dañinas para el organismo. El proceso tiene una fase de iniciación, que implica caspasas iniciadoras (caspasas 8, 9 y 10) y dependiendo de la naturaleza del estímulo y el tipo de célula, sigue un paso de ejecución vía caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7). La regulación del proceso de apoptosis depende de la naturaleza del estímulo inicial. Uno de los tres caminos de desarrollo de muerte celular es el estrés, en el que se induce la síntesis de proteínas protectoras llama-

das proteínas de choque térmico (HSP), entre las que se encuentra la Hsp 27 (27 kDa). Se podría esperar que las proteínas de estrés desempeñaran, al mismo tiempo de la apoptosis, un papel antiapoptótico interviniendo la acción de las caspasas. La apoptosis entra como una de las teorías de tenderización de la carne, porque tras el sacrificio las células quedan en una situación de estrés al cesar el aporte de oxígeno y nutrientes a las células, situación en la que no tendrían más opción que la muerte celular programada (13).

En cualquier sistema se ha visto que los sustratos para estas enzimas son proteínas miofibrilares: las μ -calpaínas degradan nebulina, titina, troponina-T y desmina (17); las catepsinas degradan troponina T, I y C, nebulina, titina y tropomiosina, así como la actina y la miosina. Se ha encontrado que el proteosoma 20S es capaz de degradar proteínas miofibrilares estructurales, con especificidad sobre la actina, la miosina y la desmina.

El objetivo de este trabajo consistió en evidenciar el cambio electroforético del músculo durante su conversión a carne durante la maduración en muestras de corderos alimentados en sistema de cría de pastoreo y semiestabulado y con ayuno.

METODOLOGÍA

Preparación de las muestras

Las muestras se tomaron del músculo *Longissimus dorsi* de corderos de 10 ± 2 semanas de edad, machos enteros, de una raza colombiana Dorper X criollo $\frac{3}{4}$ de un sistema de producción estandarizado

y con registros diarios por parte de los productores en cuanto a alimentación y rotación en las praderas y establos; los animales fueron seleccionados al azar según un diseño experimental por bloques con número limitado de muestras. El transporte hacia la planta de sacrificio fue homogéneo en el mismo vehículo, por el mismo conductor y la misma distancia recorrida, evitando situaciones estresantes adicionales por este factor. Las muestras provinieron de dos grupos de individuos: uno alimentado por pastoreo (AP) y otro semiestabulado (AS). Las muestras se tomaron durante las primeras 24 h después del sacrificio, cada 2 h, para tener una distribución homogénea y sesgos de los resultados. A partir del día cero se tomaron muestras a los 0, 7, 10, 13 y 15 días para el animal AP y de 0, 4, 5 y 7 días para el animal AS, teniendo en cuenta los días límites de aceptación sensorial recogidos por estudios previos para animales AP y AS. Las condiciones de la cámara de maduración correspondieron a una temperatura de 2 °C en la cámara frigorífica para asegurar 4 °C en el centro térmico de las muestra. Las muestras se encontraban empacadas al vacío y alejadas de la luz natural, para prevenir su deshidratación y reacciones de oxidación.

Medidas de pH

Se midió el pH de las muestras de los dos individuos durante las 24 h *post mortem* con un pH metro de punción marca Hanna sobre el *Longissimus dorsi*.

Extracción de proteínas

La extracción de las proteínas solubles en agua (PA), solubles en solución de

baja fuerza iónica (PBFI) y solubles en solución alta fuerza iónica (PAFI) se hizo de manera general como lo describen Martínez y colaboradores (18). La relación entre la cantidad de carne y el volumen de la solución extractante fue de 0,4 g de carne/ml de solución extractante: la extracción se inició pesando cerca de 1 g de carne, que se cortó en trozos pequeños, se pasó a un tubo Falcon y se le adicionaron 2,5 ml de agua destilada. Los contenidos se agitaron durante 10 min en un *shaker* con hielo y seguidamente se centrifugaron a 4 °C a 6000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y se le adicionó un volumen igual de glicerol frío, mezcla que fue homogenizada. Siguiendo el mismo procedimiento de extracción de PA, se extrajeron las PBFI y las PAFI. Para la extracción de las PBFI se tomó el pellet que quedó después de la extracción con agua y para la extracción de las PAFI se tomó el pellet después de la extracción con la solución de baja fuerza iónica. Solución de baja fuerza iónica (SBFI): 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 15 mM MgCl₂, 5 mM ditiotritol, y 3,4 mM NaH₂PO₄ y 1,6 mM Na₂HPO₄ a pH 6,5. Solución de alta fuerza iónica (SAFI): 20 mM NaCl, 5 mM EDTA, 15 mM MgCl₂, 5 mM ditiotritol y 100 mM Na₄P₂O₇ a pH 8,5. Todos los extractos se almacenaron a -20 °C.

Cuantificación de proteínas

El contenido de proteína en cada extracto se cuantificó por el método de Bradford modificado (19). Para cada serie de medidas se hizo una curva de calibración, para las cuales se utilizó como patrón de proteína una solución de caseína de

1,00 mg de proteína/ml. Con una previa puesta a punto del método, se tomó un volumen de cada extracto, se le adicionó NaCl al 1 % para completar 1 ml y 1 ml del reactivo de Bradford. Se dejó desarrollar el color por 10 min y se leyó la relación de absorbancias a 450/590 nm. Cada extracto se analizó por triplicado.

Electroforesis SDS-PAGE

Para la electroforesis SDS-PAGE los extractos se diluyeron con una modificación al Buffer de Laemmli (20), en la que se cambió la concentración de glicerol 22,2 % (v/v) de glicerol, 4,4 % (v/v) de β-mercaptoetanol, 1,7 % (p/v) de SDS y 0,055 M de buffer Tris-HCl pH 6,8. Para poner a punto estas variables se estudian concentraciones desde 0,5 a 5,5 mg/ml y se corren en geles del 12 %. A cada extracto se le adicionó azul de bromofenol y sacarosa.

La electroforesis se hizo de acuerdo a Laemmli (20), en un equipo miniprotean BIO-RAD. El gel de concentración contenía 5 % de acrilamida, 0,064 M de Tris-HCl pH 6,8, 0,10 % (p/v) de SDS y 0,30 % (v/v) de TEMED. Los geles de separación contenían 12 % y 15 % de acrilamida, 0,37 M de Tris pH 8,8, 0,10 % SDS (p/v) y 0,15 % (v/v) de TEMED. En cada tanque del gel se sembró 10 μl de cada extracto y se corrió a un voltaje constante de 150 V (18).

Se utilizó una mezcla de patrones de peso molecular Sigma-Aldrich® Wide Range de 6,5 a 200 kDa (St. Louis, MO, USA) que contenía miosina de corazón de porcino (200 kDa), β-galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), fosforilasa-b de músculo de conejo (97 kDa), BSA (66

kDa), glutámico deshidrogenada de hígado de bovino (55 kDa), ovoalbúmina de huevo de pollo (45 kDa), gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenada de músculo de conejo (36 kDa) y anhídrido carbónico de eritrocitos de bovino (29 kDa). La tinción se realizó con una solución al 1 % de azul de Coomassie R 250, 10 % de ácido acético y 40 % de metanol por 12 h. El análisis de los geles se hizo por medida de la movilidad electroforética y se observó el cambio en intensidad de las bandas.

Análisis estadístico

Los datos de cuantificación de proteína se analizaron empleando un análisis de varianza ANOVA y las medias se compararon mediante una prueba de rango múltiple a un nivel de confianza del 0,05 empleando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medidas de pH

El comportamiento de los valores de pH se muestra en la Figura 1. En esta se observa que el pH a las cero horas fue similar para los dos animales, mientras que a las 24 h *post mortem* el pH es diferente para los dos animales: en el animal AP es 6,05 y en el animal AS es 5,65; esto

muestra que las diferencias entre los dos animales no afecta el pH inicial pero sí el pH último. La variación muestra que el animal AP tiene un descenso de pH menor al animal semiestabulado y, en este último, la velocidad de descenso del pH es mayor. Lo anterior se explica gracias a que el cordero AP no está acostumbrado a la presencia de humanos, teniendo un episodio de estrés alto al momento del sacrificio, lo que ocasiona que agote las reservas de glucógeno antes de la muerte y que no se tenga sustrato para la glicólisis anaerobia que produce el ácido láctico responsable del descenso del pH. Al episodio de estrés se suma el ayuno que tiene este cordero. Para este animal el pH mínimo es de 6,01 y se registra a las 20 h, que podría corresponder a la instauración de *rigor mortis*, que por el pH sería un *rigor mortis* alcalino. Los datos también muestran que las muestras del animal semiestabulado tuvieron un pH mínimo de 5,71 a las 16 h, que podría corresponder al tiempo de instauración del *rigor mortis*.

Al comparar los datos obtenidos con los encontrados por Bond y Warner (21) para una raza resultado de un cruce entre *Border Leicester* y *Poll Dorset* con 18 horas de ayuno, se observa que hay similitud respecto al pH inicial y diferencia en el pH último, que reportan igual a 5,61.

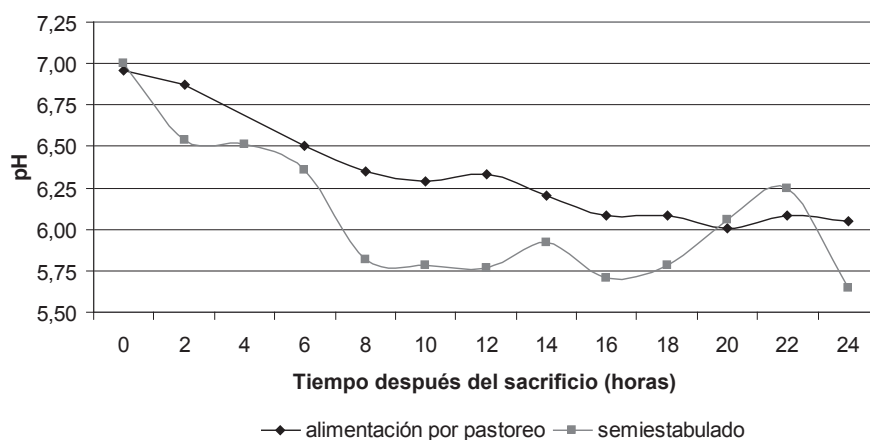


Figura 1. Comparación entre los valores de pH de las muestras de *Longissimus dorsi* desde el sacrificio hasta las 24 h *post mortem* de los animales: alimentados por pastoreo y semiestabulado.

Cuantificación de proteínas

Puesta a punto del método de cuantificación

Para la puesta a punto del método de Bradford modificado, primero se determinó el intervalo en el que la relación de absorbancias a 450/590 nm varía linealmente con la concentración de proteína. Este intervalo fue de 0,0000 a 0,0400 mg de proteína/ml. Cada curva se ajustó a una tendencia lineal con al menos 7 puntos, se determinó el error estadístico del método utilizando la herramienta *análisis de datos* de Excel, método en el que se asume que todos los errores están en las ordenadas. Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ).

El LD se expresa por recta como $a + 3S$

El LQ por recta se expresa como $a + 10S$

Donde a es el intercepto de la recta y S es el error estadístico del modelo.

Una vez calculados los LD y los LQ, se expresaron en concentración de proteína. En la Tabla 1 se presentan los resultados de LD y LQ promedio junto con su desviación.

Tabla 1. Resultados de límite de cuantificación y límite de cuantificación promedio

Parámetro	Promedio	Desviación
LD (mg de proteína/ml)	0,0023	
LQ (mg de proteína/ml)	0,0079	

Resultados de la cuantificación de proteína

Los resultados de la cuantificación expresados como mg de proteína/g de carne de las PA para AP y AS se muestran en la Tabla 2. En general, se observa

que hay mayor extracción de proteína en el animal AP respecto al animal AS. En el AP los resultados muestran que hay una tendencia creciente durante 24 h *post mortem*. Se encuentra que la mayor extracción de proteínas se da a las 20 h este valor tiene diferencia significativa con el valor a 0 h y a los 15 días.

Para el AS se observa una tendencia creciente hasta los 7 días; se observa que una de las menores cantidades de proteína extraída se da a las 16 h, tiempo que coincide con el pH mínimo de 5,71 lo que explica la menor cantidad de proteína debido a que en este pH se desnaturalizan muchas proteínas sarcoplasmáticas, que podrían precipitar y de esta forma no quedar en la fracción soluble.

En los extractos PBFI se observó igualmente que hay mayor extracción de proteína para el animal AP en comparación con el animal AS, y a la vez que la cantidad de PBFI es menor a la PA. Para el animal AP se observa una tendencia creciente hasta las 12 h, extracción mínima de las 14 h a las 22 h, que incluye la extracción a las 20 h, un incremento a las 24 h y de nuevo una tendencia decreciente en la maduración. Para el animal AS se observó un comportamiento similar, pero con un descenso de las 10 h a las 16 h. El hecho de que la cantidad de PBFI sea menor a la cantidad de PA se explica debido a que la mayoría de proteínas sarcoplasmáticas son solubles en los dos extractantes, por lo cual la mayor cantidad de proteínas sarcoplasmáticas son extraídas en la primera extracción con agua y las remanentes con la extracción con SBFI. Para el AS la disminución a

las 16 h vuelve a coincidir con el pH mínimo para esta muestra.

En los extractos de PAFI se observó que para el AP hubo un comportamiento sin variaciones drásticas de proteína/g de carne. Sin embargo, se puede observar que se extrae la menor cantidad de proteína durante las primeras 24 h *post mortem* a las 20 h y que hay, exceptuando el valor a los trece días, valores relativamente altos en las medidas posteriores a las 20 h *post mortem*; estos valores altos respecto a los iniciales y a los de 20 h se debe a que a medida en que avanza la maduración hay un rompimiento en las fibras musculares, en proteínas como la vinculina, que unen las miofibrillas al sarcoplasma. Este rompimiento hace que estas proteínas se degraden y permite extraer las proteínas miofibrilares con mayor facilidad. Para AS la mayor cantidad de proteína extraída fue de 44,2 mg de proteína/g de carne a las 16 h. Es posible que en esta fracción las proteínas que habían precipitado en las otras dos extracciones se hayan solubilizado y se hayan extraído con la SAFI.

Respecto al contenido total de proteína, este no se determinó en las muestras trabajadas. Sin embargo, se puede saber el porcentaje de proteína que fue extraído sumando los porcentajes de proteína de cada extracto. En promedio esta suma es del 8 %. Este valor es bajo respecto al contenido total de proteína reportado para la carne de cordero como del 18 % (42). Una de las razones por las cuales el valor es más bajo al contenido total de proteína es que la extracción que se hizo fue de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares, pero no de las proteínas

Tabla 2. Comparación entre los promedios de la concentración de los extractos de proteínas del animal alimentado por pastoreo (AP) y semiestabulado (AS)

Tiempo <i>post mortem</i>	Solubles en agua (SA)		Solubles en baja fuerza iónica (PBFI)		Solubles en alta fuerza iónica (PAFI)	
	AP	AS	AP	AS	AP	AS
0 horas	27,6 ± 1,5 c	24,3 ± 0,5 e	10,9 ± 0,9 d	2,1 ± 0,7 b	37,0 ± 0,9 c	34,6 ± 0,9 bc
2 horas	43,8 ± 3,0 b	32,4 ± 1,4 d	13,0 ± 0,9 c	5,1 ± 1,3 ab	41,3 ± 0,1 b	25,4 ± 0,7 de
4 horas	30,9 ± 0,9 c	28,1 ± 1,5 e	10,2 ± 0,3 d	4,7 ± 0,6 ab	30,4 ± 4,8 d	33,7 ± 1,9 c
6 horas	37,8 ± 3,8 bc	30,9 ± 1,6 de	14,1 ± 0,7 c	3,4 ± 0,6 b	29,8 ± 4,6 d	28,4 ± 1,1 d
8 horas	38,6 ± 3,6 bc	19,1 ± 2,2 f	16,5 ± 0,4 b	9,0 ± 0,3 a	37,9 ± 0,9 c	25,9 ± 1,4 e
10 horas	32,8 ± 3,4 c	28,6 ± 2,9 e	19,2 ± 1,3 a	7,2 ± 0,9 a	43,7 ± 1,3 ab	19,1 ± 1,7 f
12 horas	39,0 ± 2,1 bc	42,6 ± 2,1 ab	17,6 ± 2,1 ab	4,8 ± 0,6 ab	33,8 ± 1,6 cd	36,9 ± 0,4 b
14 horas	42,7 ± 0,4 bc	43,7 ± 1,0 ab	10,6 ± 0,4 d	5,5 ± 0,9 a	36,7 ± 2,0 c	27,4 ± 0,4 de
16 horas	40,7 ± 1,8 bc	24,4 ± 1,4 e	7,8 ± 1,5 e	3,1 ± 2,0 b	41,5 ± 1,4 bc	44,2 ± 1,2 a
18 horas	41,4 ± 2,1 bc	36,1 ± 0,6 c	8,2 ± 0,5 e	8,8 ± 1,1 a	41,8 ± 2,0 bc	27,8 ± 0,9 de
20 horas	55,5 ± 1,8 a	36,0 ± 2,1 c	10,8 ± 0,8 d	5,2 ± 1,8 ab	24,2 ± 1,8 e	35,8 ± 2,7 bc
22 horas	46,8 ± 2,7 ab	20,4 ± 0,3 f	16,3 ± 0,4 b	7,4 ± 1,7 a	45,3 ± 2,4 ab	21,9 ± 1,4 d
24 horas	45,1 ± 1,9 ab	40,2 ± 4,6 b	17,7 ± 0,3 b	8,7 ± 1,6 a	47,7 ± 4,3 a	22,5 ± 3,2 de
4 días	/	47,4 ± 1,0 a	/	4,0 ± 1,1 b	/	24,8 ± 1,4 de
5 días	/	28,0 ± 2,3 e	/	7,1 ± 1,95 ab	/	24,5 ± 3,9 de
7 días	50,7 ± 0,9 a	46,2 ± 3,7 ab	9,9 ± 0,8 de	3,4 ± 1,6 b	39,7 ± 5,8 bc	43,1 ± 1,5 a
10 días	47,5 ± 1,3 b	/	9,4 ± 0,9 de	/	39,2 ± 1,2 bc	/
13 días	48,3 ± 1,1 ab	/	11,3 ± 1,7 d	/	22,8 ± 1,8 e	/
15 días	35,8 ± 0,8 c	/	8,9 ± 0,8 e	/	41,3 ± 4,2 bc	/

* Media ± desviación estándar (mg de proteína/g de carne). En una misma columna letras diferentes son diferencias significativas AP = animal alimentado por pastoreo, AS = animal semiestabulado.

del tejido conectivo, que incluyen proteínas insolubles, colágeno, elastina y reticulina.

Electroforesis SDS-PAGE

En la puesta a punto de la separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE se encontró que una concentración de extractos de 5,5 mg/ml (PA y PAFI en AP y AS), 1,5 g/ml (PBFI en AP) y 0,4 mg/ml (PBFI en AS) presentó una mejor separación en los geles del 12 % de acrilamida (PA y PBFI) y del 15 % de acrilamida (PAFI).

Las figuras 2 y 3 muestran la electroforesis en un gel del 12 % de acrilamida de los extractos de PA y PBFI, respectivamente, para el animal AP. Al comparar las dos figuras, los perfiles de los dos extractos son muy similares, excepto por la disminución en la intensidad de las bandas de los extractos de PBFI. Para la identificación de las bandas de proteína se tomaron los pesos moleculares y se compararon con los reportados en otras investigaciones (22, 23, 24). Los pesos moleculares coinciden para la fosforilasa (PH) y creatinina quinasa (CK), junto con sus perfiles, con los reportados por Joo y colaboradores (22); de igual forma la hexoquinasa y la μ -calpaínas coinciden con lo reportado en (23) y (24). Para la identificación también se tuvo en cuenta que las proteínas sarcoplasmáticas son solubles en agua y en soluciones de baja fuerza iónica, y que estas corresponden a proteasas, enzimas de la glicólisis y del ciclo de Krebs, incluyendo la creatinina, la quinasa y la mioglobina (25).

Un análisis más detallado de los geles de los extractos de PA muestran para el

AP una disminución en la intensidad de la fosforilasa (PH) entre las 16 h y 22 h, pérdida de una banda de 85 kDa a las 14 h, intensificación de bandas de 81 y 78 kDa y aparición de una banda a 152 kDa a los 10 días. Por otra parte, las muestras de PBFI mostraron intensificación de la banda de 79 kDa a las 24 h, disminución de la banda de 70 kDa y de la fosfoglucomutasa a las 20 h; también se observó disminución a las 12 h de la fosfoglicerato quinasa y disminución de la hexoquinasa durante las primeras 14 h.

En los geles de las PA la pérdida de la banda de una proteína de 85 kDa a las 14 h probablemente corresponde a la μ -calpaína, que sufre autoproteólisis y se evidencia en la posterior intensificación de bandas de 81 y 78 kDa a los 10 días; esta autólisis de la μ -calpaína puede ser tomada como ensayo de activación pero no de actividad de esta enzima (26). La aparición de la banda de 152 kDa a los 10 días podría corresponder a la sarcolumenina (160 kDa), que hace parte del retículo sarcoplasmático. El hecho de que no aparezca en tiempos menores está relacionado con que esta proteína se hace más extraíble por la desorganización del sistema membranoso del retículo sarcoplasmático (26).

Los geles de los extractos PA y PBFI para el AS presentan un perfil electrofórico muy similar a las del animal AP (figuras 2 y 3). En estos perfiles se pueden resaltar las siguientes observaciones: en los extractos solubles en agua, la desaparición de la banda de μ -calpaína entre las 12 h y 22 h; a las 16 h se observó un incremento en la intensidad de las bandas y la aparición de una banda de 172 kDa, y adicionalmente se inten-

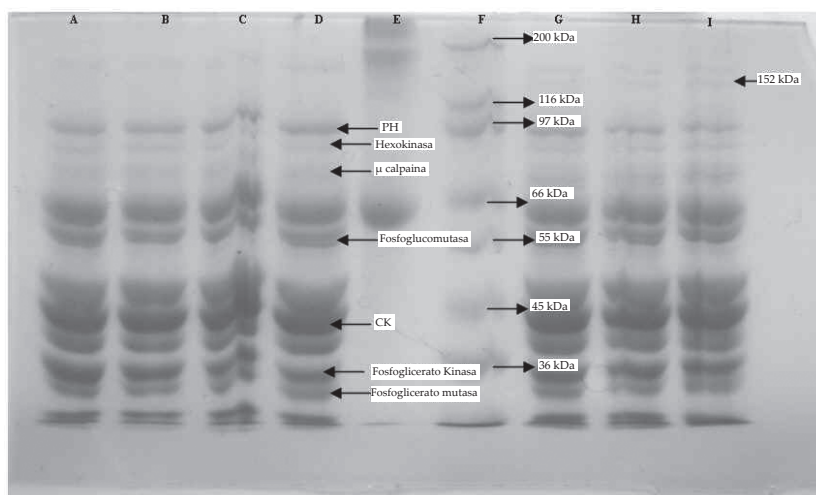


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE en gel del 12 % de acrilamida de extractos de agua (SA) del músculo *Longissimus dorsi* del animal alimentado por pastoreo (AP). Las líneas A, B, C, D, G, H, I corresponden a las muestras de 2, 12, 24 h y 7, 10, 13 y 15 días, respectivamente, mientras las E y F corresponden a patrones de albúmina sérica de bovino (BSA) y a los patrones moleculares Sigma Marker®.

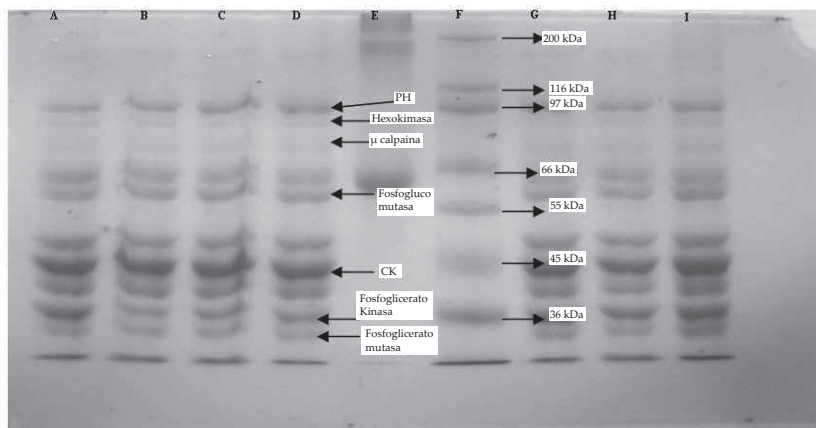


Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE en gel del 12 % de acrilamida de extractos de baja fuerza iónica (PBFI) del músculo *Longissimus dorsi* del animal alimentado por pastoreo (AP). Las líneas A, B, C, D, G, H, I corresponden a las muestras de 2, 12, 24 h y 7, 10, 13 y 15 días, respectivamente, mientras las E y F corresponden a patrones de albúmina sérica de bovino (BSA) y a los patrones moleculares Sigma Marker®.

sificaron las bandas correspondientes a la fosforilasa (PH) y a la fosfoglucomutasa, entre otras bandas. Se observó también la disminución en la intensidad de las bandas de 79 y 75 kDa y de la fosfoglicerato mutasa. A los cinco días apareció una banda de 139 kDa y se intensificaron las bandas de 79 y 75 kDa. En los extractos solubles en baja fuerza iónica se observó principalmente la aparición de una banda de 206 kDa e intensificación de la μ -calpaína y hexoquinasa a las 16 h. Después de las 24 h *post mortem* no se observó cambio significativo en las bandas.

En los extractos de PA la banda que apareció de 139 kDa de nuevo puede corresponder a la sarcalumenina o a alguna otra proteína que puede estar contenida dentro de estructuras celulares, que no se desintegran tempranamente en el *post mortem*. Sobre esta banda también se puede decir que, aunque su peso molecular corresponde al peso molecular de la calpastatina (27), esta banda no puede corresponder a esta proteína porque se encuentra presente durante todo el proceso de maduración y en vez de intensificarse se degrada, ya que la calpastatina sufre una lisis por acción de la μ -calpaína (4), por lo cual no puede aparecer o intensificarse a los cinco días. La intensificación de las bandas de 79 y 75 kDa puede corresponder a la autoproteólisis de la μ -calpaína.

Los cambios más importantes durante todo el proceso de *rigor mortis* y de maduración se registran en los extractos de proteína soluble en solución de alta fuerza iónica (PAFI) en los dos individuos. Los cambios que sufren las proteínas durante el proceso de instauración

del *rigor mortis* y la maduración para el animal AP se presentan en la Figura 4. Para la identificación de las proteínas se compararon los pesos moleculares y los perfiles electroforéticos reportados por otros autores (21, 22, 28-32). Se compararon los pesos moleculares reportados por Hwnag (28), la desmina y la vinculina reportadas por Bond (21), la miosina de cadena pesada (MHC) reportadas por Bond y por Ojeda (22, 31), α actinina y la actina reportadas por Bond y por Ojeda (22, 31), la tropoina T (TnT), la tropomiosina (Tm), Tn I, proteínas de 30 kD reportadas por Ojeda (21, 22, 28-32). Adicionalmente, se compararon estos reportes con la intensidad esperada, con base en la composición porcentual reportada por Kauffman (24).

En la Figura 4 se puede observar que la miosina, la α -actinina y la actina se degradaron a las 16 h. Igualmente en este tiempo se observa que las bandas de 87 a 51 kDa y la desmina se empiezan a degradar; esta última disminuye más a partir de los 7 días, siendo imperceptible a los 15 días. La troponina T, por su parte, se empieza a degradar a las 20 h y desaparece a los 7 días. La tropomiosina tiene una disminución a las 16 h y disminuye drásticamente en los extractos correspondientes a una maduración de 10 días. A las 14 h aparece una banda de 27 kDa, se intensifica la banda de miosina de cadena liviana (MLC) y aparece la troponina I. A los 10 días *post mortem* se observó la aparición de tres bandas entre los 33 y 30 kDa.

Si bien se ha reportado que proteínas como la actina y la miosina no sufren cambios significativos en tiempos tempranos *post mortem* (33, 34, 35), recién

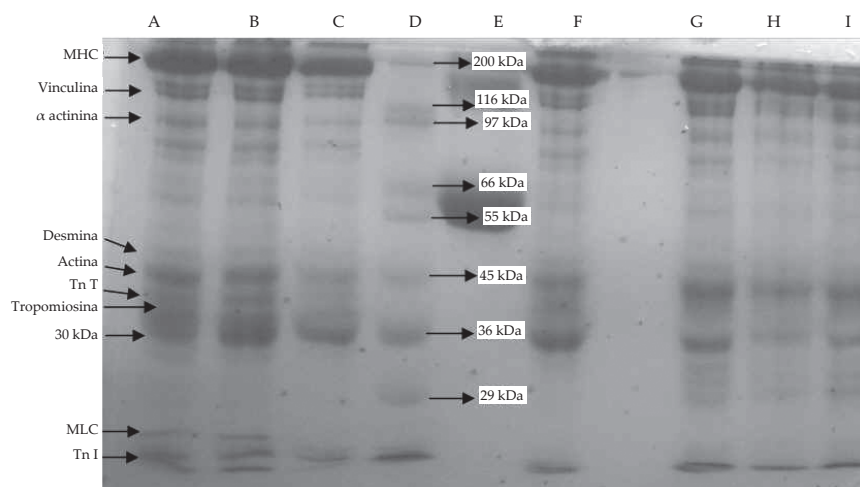


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE en gel del 15 % de acrilamida de extractos de alta fuerza iónica (PAFI) del músculo *Longissimus dorsi* del animal alimentado por pastoreo (AP). Las líneas A, B, C, F, G, H, I corresponden a las muestras de 2, 12, 24 h y 7, 10, 13 y 15 días, respectivamente, mientras las E y D corresponden a patrones de albúmina sérica de bovino (BSA) y a los patrones moleculares Sigma Marker®.

tes estudios (26, 36, 37) han mostrado la degradación de estas proteínas, particularmente de la actina, y aunque no se haya encontrado relación entre la tenderización y la degradación de esta, no hay que desconocer que por ser una de las proteínas miofibrilares más importantes, pequeños cambios sí pueden influenciar la tenderización de la carne.

La degradación de la desmina es paralela a la tenderización de la carne (29), por lo que se puede esperar que a los 7 días de maduración, la carne del AP tenga un alto grado de tenderización. Esta degradación observada coincide con lo reportado por Ilian y colaboradores (38). La degradación de la troponina T es de los cambios más reportados durante el *post mortem* (29); esta proteína también

es un sustrato para las calpaínas, que son las responsables de su degradación. La degradación de la troponina T también se ha relacionado con la tenderización. La banda de 27 kDa, que no se conserva en los demás extractos, se ha reportado como una proteína de estrés térmico (28, 39). Morzel (40) encontró una relación muy importante entre la HSP 27 (proteína de estrés térmico) y la tenderización de la carne, lo que hace de esta proteína una posible candidata para ser un marcador de tenderización. Esta proteína está normalmente en las células, pero aumenta su concentración en situaciones estresantes. Asimismo, es conocido que esta proteína está asociada al proceso de contracción, facilitado la polimerización de la G-actina a F-actina (41). El hecho de

que esta proteína haya salido en un solo extracto podría estar relacionado con el *rigor mortis*. Si esta se encontraba en los sarcómeros en el momento de darse el *rigor mortis*, pudo quedar atrapada por el encogimiento de los sarcómeros, apareciendo en las fracciones de proteínas miofibrilares. Es posible que esta proteína pueda verse en las separaciones de proteínas sarcoplasmáticas de pesos moleculares inferiores a 33 kDa.

A las mismas 14 h se intensificó la banda de miosina de cadena liviana (MLC) y aparecieron tres bandas entre los 33 y 30 kDa a los 10 días, posiblemente debido a la actividad proteolítica de catepsinas B y L que hidrolizan tropomiosina T, I, C, nebulina, titina, tropomiosina, miosina y actina. Aunque en principio no se podría responsabilizar a las catepsinas por esta aparición, ya que no tienen contacto con las proteínas miofibrilares por situarse en los lisosomas, se ha encontrado evidencia de que después de varios días *post mortem* las membranas lisosomales se rompen, “liberando” así las catepsinas (15).

Se pudo observar que los cambios se empiezan a dar a las 16 h, lo que puede indicar que el *rigor mortis* pudo haberse instaurado en un tiempo menor, ya que los cambios observados son propios del proceso de maduración posterior al *rigor mortis*. Lo anterior tendría sentido si se tiene en cuenta el tiempo de ayuno de 18 h que sufrió el animal AP y el evento estresante previo al sacrificio.

Debido a que la degradación de la troponina T se relaciona con la terneza

de la carne, se puede inferir que a los 10 días la carne del AP puede haber sufrido ablandamiento debido a la marcada proteólisis que sufre esta proteína en este tiempo. Se puede responsabilizar a las catepsinas por la degradación a los 10 días, debido a que no hubo cambios significativos a los 7 y a los 10 días que indicarían mayor actividad de las μ -calpaínas.

El cambio que sufrieron las proteínas durante el proceso de instauración del *rigor mortis* y la maduración para el animal AS se presenta en la Figura 5. A las 16 h se observó la disminución momentánea de la desmina y la actina, aparición de una banda de 27 kDa y una disminución en las demás bandas. Se observa también que empieza la degradación de la miosina y la α -actinina a las 24 h. Adicionalmente, se observó que la troponina T desapareció a las 24 h, que hubo una intensificación de dos bandas de 29 y 28 kDa a las 22 h y que a los 5 y 7 días disminuyó la intensidad de la actina y la miosina.

La disminución de la intensidad de las bandas a las 16 h coincide con el pH mínimo alcanzado en este individuo, lo que puede relacionarse de nuevo con la aparición del *rigor mortis*. La aparición de la banda de 27 kDa puede ser atribuida igualmente a la HSP 27. Por todo lo anterior, se evidencia la instauración del *rigor mortis* a las 16 h con una degradación temprana de la troponina T, la miosina y la actina. Esta degradación pudo ser ayudada por los pH más bajos observados para esta carne, que influye la activación de algunas proteasas.

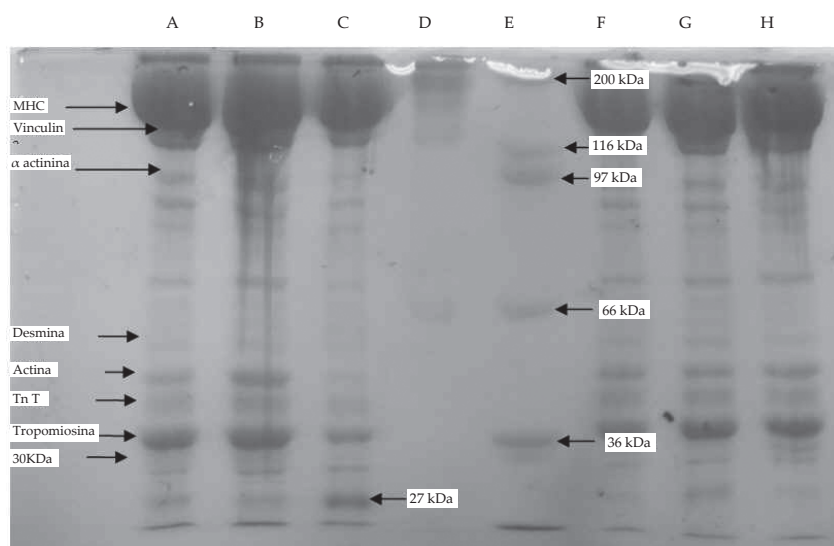


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE en gel del 15 % de acrilamida de extractos de alta fuerza iónica (SAFI) del músculo *Longissimus dorsi* del animal semiestabulado (AS). Las líneas A, B, C, F, G, H corresponden a las muestras de 12, 14, 16, 18, 20 y 22 h respectivamente, mientras las D y E corresponden a patrones de albúmina sérica de bovino (BSA) y a los patrones moleculares Sigma Marker®.

CONCLUSIONES

En las proteínas sarcoplasmáticas la principal observación fue los cambios en la μ -calpaína y en sus productos de autólisis. Los principales cambios vistos se dieron en las proteínas miofibrilares, encontrándose una disminución en la intensidad de proteínas como la actina, la miosina, la desmina y la α -actinina; la desaparición de proteínas como la troponina T y la tropomiosina; aparición de péptidos entre 30 y 33 kDa para el AP a los 10 días e intensificación de péptidos de 28 y 29 kDa a las 22 h para el AS.

La disminución y posterior desaparición más temprana de la troponina T a las 16 h y a los 5 días para el AS, respecto a las 20 h y 7 días del AP, sugiere que las condiciones del AS favorecerían

una tenderización de la carne de ovino en menos tiempo.

Uno de los resultados más importantes fue la aparición de una proteína de 27 kDa a las 14 h y a las 16 h en los animales AP y AS, respectivamente. Esta proteína probablemente sea una proteína de estrés térmico o HSP 27. La importancia radica en que dicha proteína se ha relacionado con la tenderización de la carne y a que está involucrada con el proceso de contracción, lo que permitiría relacionar la aparición de esta banda con la instauración del *rigor mortis* y con la tenderización de la carne.

AGRADECIMIENTOS

Especiales agradecimientos al grupo de investigación de Estudio de Cambios

Químicos y Bioquímicos de Alimentos Frescos y Procesados, y al programa de Jóvenes Investigadores de Colciencias.

REFERENCIAS

1. Huff, E. J.; Parrish, F. C. Bovine *Longissimus* muscle tenderness as affected by postmortem aging time, animal age and sex. *Journal of Food Science*. 1993. **58**(4): 713-716.
2. Aalhus, J. L.; Jones, S. D. M.; Tong, A. K. W.; Jeremiah, L. E.; Robertson, W. M.; Gibson, L. L. The combined effects of time on feed, electrical stimulation and aging on beef quality. *Canadian Journal of Animal Science*. 1992. **72**(3): 525-535.
3. Sánchez, I. C.; Albarracín, H. Análisis sensorial en carne. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2010. **23**(2): 227-239.
4. Warriss, P. D. *Meat Science: An Introductory Text*. CABI. 2010.
5. Bendall, J. R.; Swatland, H. J. A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Science*. 1988. **24**(2): 85-126.
6. Bertram, H. C.; Schüfer, A.; Rosenvold, K.; Andersen, H. Physical changes of significance for early post mortem water distribution in porcine M. *Longissimus*. *Meat Science*. 2004. **66**(4): 915-924.
7. Van Laack, R. L.; Stevens, S. G.; Stalder, K. J. The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *Journal Animal Science*. 2001. **79**(2): 392-397.
8. Warner, R. D.; Kauffman, R. G.; Greaser, M. L. Muscle protein changes post mortem in relation to pork quality traits. *Meat Science*. 1997. **45**(3): 339-352.
9. Ouali, A.; Demeyer, D.; Raichon, C. An introduction to the workshop. *Biochimie* 1992. **74**(3): 213-215.
10. Kemp, C.M.; Sensky, P.L.; Bardsley, R.G.; Buttery, P.J.; Parr, T. Tenderness - An enzymatic view. *Meat Science*. 2010. **84**(2): 248-256.
11. Neath, K. E.; Del Barrio, A. N.; Lapitan, R. M.; Herrera, J. R. V.; Cruz, L. C.; Fujihara, T. et al. Protease activity higher in postmortem water buffalo meat than Brahman beef. *Meat Science*. 2007. **77**: 389-396.
12. Houbak, M. B.; Ertbjerg, P.; Therkildsen, M. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and [mu]-calpain. *Meat Science*. 2008. **79**(1): 77-85.
13. Ouali, A.; Herrera-Mendez, C. H.; Coulis, G.; Becila, S.; Boudjellal, A.; Aubry, L. et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*. 2006. **74**(1): 44-58.
14. Koohmaraie, M.; Geesink, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*. 2006. **74**(1): 34-43.

15. Kemp, C. M.; Sensky, P. L.; Bardsley, R. G.; Buttery, P. J.; Parr, T. Tenderness - An enzymatic view. *Meat Science*. 2010. **84**(2): 248-256.
16. O'Halloran, G. R.; Troy, D. J.; Buckley, D. J.; Reville, W. J. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Science*. 2011. **47**(3-4): 187-210.
17. Huff-Lonergan, E.; Mitsuhashi, T.; Beekman, D.D.; Parrish Jr., F.C.; Olson, D.G.; , R.M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *Journal Animal Science*. 1996. **74**(5): 993-1008.
18. Martinez, I.; Jakobsen Friis, T.; Careche, M. Post mortem muscle protein degradation during ice-storage of Arctic (*Pandalus borealis*) and tropical (*Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*) shrimps: a comparative electrophoretic and immunological study. *Journal Science Food Agriculture*. 2001. **81**(12): 1199-1208.
19. Zor, T.; Selinger, Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry*. 1996. **236**(2): 302-308.
20. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. **227**(5259): 680-685.
21. Bond, J. J.; Warner, R.D. Ion distribution and protein proteolysis affect water holding capacity of *Longissimus thoracis et lumborum* in meat of lamb subjected to antemortem exercise. *Meat Science*. 2007. **75**(3): 406-414.
22. Joo, S. T.; Kauffman, R. G.; Kim, B. C.; Park, G. B. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine *Longissimus* muscle. *Meat Science*. 1999. **52**(3): 291-297.
23. Geensink, G. H.; Veiseth, E. Muscle Enzymes: Proteinases & V. Verrez Muscle Enzymes: Glycohydrolases. In: *Handbook of Muscle Foods Analysis*. Editores. L. Nollet, F. Toldrá Ed. CRC Press. Boca Raton. 2008. pp.91-110,129-140
24. R. G. Kauffman. Meat composition. In: Y. H., Hui, W. K., Nip, R. W., Rogers, O. Young, editors. *Meat Science and Applications*. 1 ed. New York. Marcel Dekker. 2001. pp. 1-127.
25. Prokoratová, V.; Kvasnicka, F.; Sevcik, R.; Voldrich, M. Capillary electrophoresis determination of carnitine in food supplements. *Journal of Chromatography A*. 2005. **1081**: 60-64.
26. Morzel, M.; Chambon, C.; Hamelin, M.; Santé-Lhoutellier, V.; Sayd, T.; Monin, G. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Science*. 2004. **67**(4): 689-696.

27. Sazili, A. Q.; Parr, T.; Sensky, P. L.; Jones, S. W.; Bardsley, R. G.; Buttery, P. J. The relationship between slow and fast myosin heavy chain content, calpastatin and meat tenderness in different ovine skeletal muscles. *Meat Science*. 2005. **69**(1): 17-25.
28. Hwang, I. H.; Park, B. Y.; Kim, J. H.; Cho, S. H.; Lee, J. M. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig *Longissimus*. *Meat Science*. 2005. **69**(1): 79-91.
29. Geesink, G. H.; Koohmaraie, M. Postmortem proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended postmortem storage. *Journal Animal Science*. 1999. **77**(6): 1490-1501.
30. Claey, E.; Uytterhaegen, L.; Buts, B.; Demeyer, D. Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. *Meat Science*. 1995. **39**(2): 177-193.
31. Ojeda, M. A.; Wagner, J. R.; Cru-pkin, M. Biochemical Properties of Myofibrils from Frozen *Longissimus Dorsi* Muscle of Three Lamb Genotypes. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 2001. **34**(6): 390-397.
32. Huff Lonergan, E.; Zhang, W.; Lonergan, S. M. Biochemistry of post-mortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*. 2010. **86**(1): 184-195.
33. Bandman, E.; Zdanis, D. An immunological method to assess protein degradation in post-mortem muscle. *Meat Science*. 1988. **22**(1): 1-19.
34. Huff-Lonergan, E.; Parrish Jr., F. C.; Robson, R. M. Effects of post mortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine *Longissimus* muscle. *Journal Animal Science*. 1995. **73**(4): 1064-1073.
35. Koohmaraie, M. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*. 1994. **36**(1-2): 93-104.
36. Lametsch, R.; Karlsson, A.; Rosenvold, K.; Andersen, H. J.; Roepstorff, P.; Bendixen, E. Post mortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. **51**(24): 6992-6997.
37. Lametsch, R.; Roepstorff, P.; Bendixen, E. Identification of Protein Degradation during Post-mortem Storage of Pig Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. **50**(20): 5508-5512.
38. Ilian, M. A.; Bekhit, A. E. D.; Bickerstaffe, R. The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post mortem aging. *Meat Science*. 2004. **66**(2): 387-397.
39. Hollung, K.; Veiseth, E.; Jia, X.; FjØrgestad, E. M.; Hildrum, K.I. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms

- behind meat quality. *Meat Science*. 2007. **77**(1): 97-104.
40. Morzel, M.; Terlouw, C.; Chambon, C.; Micol, D.; Picard, B. Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science*. 2008. **78**(3): 297-304.
41. Salinthon, S.; Tyagi, M.; Gerthoffer, W. T. Small heat shock proteins in smooth muscle. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008. **119**(1): 44-54.