ITEA (2004), Vol. **100A N.° 1**, 43-55

ACTIVIDAD DE LOS PRINCIPALES ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE EL PERIODO DE OREO DE CULONES DE LA RAZA ASTURIANA DE LOS VALLES

A. Coto-Montes[1], B. Caballero, V. Sierra, I. Vega-Naredo, C. Tomás-Zapico, R. Hardeland*, D. Tolivia, F. Ureña, M.J. Rodríguez-Colunga**

Departamento de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo, E-33006 Oviedo, Asturias, España

* The Institut für Zoologie und Anthropologie der Universität, D-37073 Göttingen, Germany

** From EASA (Empresa Asturiana de Estudios Agrarios, S.A.), Gijón, Asturias, España

RESUMEN

En este trabajo se han medido las actividades de tres de los principales enzimas antioxidantes: la superóxido dismutasa, la catalasa y glutatión reductasa, así como el daño oxidativo de lípidos y proteínas a lo largo del periodo de oreo, mediante medidas efectuadas cada seis horas en el *Longissimus dorsi* de animales pertenecientes a la raza de ganado vacuno Asturiana de los Valles. Al mismo tiempo, se relacionaron los resultados obtenidos con mediciones a las mismas horas de los valores de pH y temperatura de las canales almacenadas. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de la glutatión reductasa permanecía estable a lo largo de las 24 horas de almacenamiento. La superóxido dismutasa y la catalasa por el contrario, mostraron un incremento de actividad durante las primeras 12 horas inmediatas al sacrificio, mientras que el pH decrecía hasta valores de 6,0 y la temperatura de las canales llegaba hasta valores próximos a 15° C. Los cambios observados en los enzimas antioxidantes se correlacionaron perfectamente con los encontrados en daño de lípidos y proteínas. Un descenso en la actividad de los enzimas la superóxido dismutasa y la catalasa después de las primeras 12 horas de almacenamiento trajo consigo un incremento significativo a las 18 horas del daño en las proteínas. Sin embargo, el daño de lípidos no se vio alterado durante estas primeras 24 horas, por lo que, este proceso debe tener lugar en estadios más tardíos de maduración de las canales. Procedimientos futuros encaminados a mejorar la calidad de la carne y su terneza deberían tener en cuenta estos datos sobre destrucción oxidativa de macromoléculas ya que este trabajo muestra que los enzimas antioxidantes están involucrados en la evolución de las proteínas *post-mortem*.

Palabras clave: *Post-mortem* temprano, Radicales libres, Daño de proteínas, Lipoperoxidación, Vacuno.

1. Autora a la que debe dirigirse la correspondencia (acoto@correo.uniovi.es).

SUMMARY

MAIN ANTIOXIDANT ENZYMES ALONG EARLY *POST-MORTEM* IN ASTURIANA DE LOS VALLES CATTLE BREED

Three enzymes of the antioxidant system [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR)] as well as oxidative damage of proteins and lipids were measured every 6 hours in *post-mortem Longissimus dorsi* from Asturiana de los Valles, Spanish cattle breed, during a 24-hour period of storage at 4°C. Concomitantly, we followed changes in meat temperature and pH. Glutation reductase activity remained stable for 24 h of storage. Superoxide dismutase and catalase activities rose within the first 12 hours *post- mortem*, while the pH was decreasing to 6,0 and temperature to somewhat above 15° C. The changes in antioxidant enzymes were reflected by the oxidative damage of proteins and lipids. Oxidative modification of proteins increased after 18 hours, when superoxide dismutase and catalase dropped. No rise in lipid peroxidation was observed within 24 h. Therefore, this process should mainly take place during later stages of ageing. Future procedures for improving meat quality and tenderness should consider these informations on oxidative destruction of biomolecules.

Key words: Early *post-mortem*, Free radicals, Protein damage, Lipid peroxidation, Beef.

Introducción

Asturias por su tradición socio-económica, por su clima y su suelo ha favorecido el desarrollo de una cabaña de ganado vacuno autóctona "Asturiana de los Valles". Las directrices de la Unión Europea han inspirado el que esta cabaña habitualmente dedicada a leche se haya transferido a la obtención de carne de calidad. Sin embargo, la Unión Europea exige cada vez más rigurosos controles, no sólo referidos a la alimentación del animal sino también al tratamiento de las canales. La legislación española señala la necesidad de que las canales sean mantenidas a 4° C durante las 24 horas posteriores al sacrifico.

Las cualidades organolépticas de la carne, de gran interés para el consumidor, están seriamente afectadas por los procesos que ocurren inmediatamente antes y después de la muerte del animal: unos fisiológicos que tienen lugar durante los últimos días de vida del animal y otros ya en las canales durante las primeras horas *post-mortem*. El efecto de estos procesos ha sido estudiado fundamentalmente en relación con la glucolisis anaerobia, en particular, el catabolismo de transformación de la glucosa en ácido láctico (MARSH, 1993). La tasa de consumo de ATP determina el índice de glucolisis *post-mortem* y, así, la fosfofructokinasa y, en menor grado, la fosforilasa juegan los principales papeles en el control del nivel de los metabolitos glucolíticos (POTTHAST *et al.*, 1977).

Se han observado importantes variaciones en la glucolisis entre diferentes animales e incluso entre diferentes localizaciones en canales de ganado vacuno (O'HALLORAN *et al.*, 1997). De acuerdo con KAUFFMAN y MARSH (1987), la tasa de glucolisis dentro de las primeras horas después del sacrificio parece ser determinante para la calidad final de la carne, sin embargo esta tasa varía dentro de un amplio rango de forma inexplicable. La mayor o menor extensión de la glucolisis es uno de los factores determinantes de la terneza final del producto debido al efecto que sobre este proceso tiene la tem-

peratura y el pH. Es conocido además, que la glucólisis influye sobre las actividades de los enzimas proteolíticos (MARSH, 1993). A su vez, la glucolisis y los cambios asociados a la glucolisis se ven afectados por la velocidad de enfriamiento de las canales y sus consecuencias sobre el inicio del rigor.

El periodo inmediato al sacrificio, por lo anteriormente expuesto, parece ser de crítica importancia para la obtención de la terneza de la carne. Más tarde, el periodo de maduración se encargará de ultimar el grado de terneza, siendo éste un periodo determinado por la extensión de la proteolisis, en la cual, las calpaínas juegan un papel principal (UYTTERHAEGEN *et al.*, 1994; WHEELER y KOOHMARAIE, 1994; RONCALES *et al.*, 1995).

A pesar de su indiscutida importancia, los procesos anteriormente mencionados no son capaces de explicar, por sí solos, todos los cambios que se producen en las fibras hasta llegar a la obtención de una carne de calidad con la terneza deseada. Las modificaciones que se van produciendo en las biomoléculas y la destrucción que algunas de ellas sufren debido a modificaciones oxidativas, son procesos conocidos desde hace años y a los que sin embargo no se les ha dado la importancia que merecen en este campo. Estos procesos oxidativos deben contribuir a la degradación y descomposición del material con consecuencias obligadas sobre la calidad y textura de la carne.

Las reacciones de radicales libres implicadas en los procesos oxidativos que se producen durante la rotura celular en la carne o durante el periodo de refrigeración que soportan las canales en oreo, son similares a aquellos que padecen en tejidos enfermos, dañados o envejecidos (DONNELLY y ROBINSON, 1995).

Al mismo tiempo, aunque los cambios *post-mortem* ocurridos en la carne motivados por mecanismos precisos mediados por radicales han sido pobremente explicados, se sabe que los radicales libres son los responsables de la oxidación de aquellos componentes de la carne que van a dar lugar a parámetros de calidad de la carne de tal importancia como son el color, el sabor, el aroma y/o los valores nutricionales de los productos alimenticios (DONNELLY y ROBINSON, 1995).

Estos datos unidos al hecho de que se sabe que muchos enzimas mantienen su actividad durante el periodo temprano de refrigeración *post-mortem* (primeras 24 horas después del sacrificio) han dado lugar al presente trabajo. Nuestra intención ha sido estudiar la duración y conservación de la protección antioxidante con la que cuenta la carne a lo largo de este periodo y la relación que existe entre ésta, determinada mediante el estudio de la actividad de los principales enzimas antioxidantes, y la temperatura y el pH de la canal a lo largo de estas 24 horas. Para este propósito se ha seleccionado carne procedente de una cabaña de vacuno español para conocer más en profundidad las variaciones bioquímicas y fisico-químicas a lo largo del periodo *post mortem* en que son mantenidas las canales y, en particular, el papel que juegan los enzimas antioxidantes, con vistas a mejorar la calidad final de la carne.

Material y metodos

Animales

Animales de entre 14 y 18 meses de edad (n = 9) pertenecientes a la raza "Asturiana de los Valles" con un peso por encima de 250 kg, alimentados durante los cinco primeros meses de vida con leche materna y, posteriormente, en alimentación intensiva con pienso hasta el momento del sacrificio, fueron sacrificados en el Matadero de Avilés (Asturias, España). Las canales fueron

transferidas a cámaras refrigeradas a 4° C a lo largo de las primeras horas después del sacrificio. Los datos de temperatura y pH fueron obtenidos del *Longissimus dorsi* (LD) mediante una incisión con escalpelo en la cual se insertó un electrodo aproximadamente 10 cm en el interior del músculo usando un pHmetro y termómetro digital (HL 8424 Hanna Instruments), las medidas se obtuvieron cada seis horas durante las primeras 24 horas *post-mortem.*

Las muestras utilizadas para los ensayos enzimáticos y el estudio del daño en proteínas y lípidos fueron obtenidas, también a su vez del LD cada seis horas mediante una profunda incisión en el músculo con un cuchillo de doble hoja.

Ensayos enzimáticos

Las muestras extraídas de *Longissimus dorsi* fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a –70° C. En el momento de iniciar los análisis, el tejido fue descongelado y homogeneizado en 50 mM de tampón fosfato a pH 7,5 (1:10 peso/volumen) utilizando un homogeneizador de cristal Potter-Elvehjem con vástago automatizado y recubierto de Teflón. A continuación las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 x g. Los sobrenadantes recogidos se utilizaron para realizar los siguientes ensayos enzimáticos:

• *La catalasa (CAT, EC 1.11.1.6).* La actividad enzimática fue medida de acuerdo a LUBINSKY y BEWLEY (1979). La mezcla de incubación contenía H_2O_2 como sustrato más el tejido homogeneizado. Se midió la destrucción de H_2O_2 durante 4 minutos a 230 nm de longitud de onda. Los resultados se expresaron como µmoles de H_2O_2 consumidos / (mg de prot * min).

• *La superoxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)* fue realizado siguiendo el método de MARTIN *et al.* (1987); la mezcla de reacción se componía de hematoxilina como sustrato y tejido homogeneizado; la oxidación de la hematoxilina se siguió durante 10 minutos a 560 nm. El resultado se expresó como unidades de SOD/ mg de prot.

• *La glutation reductasa (GR, EC 1.6.4.2)* fue determinada siguiendo el protocolo de KUM-TATT *et al.* (1975), la oxidación de NADPH + H^+ fue seguida durante 5 minutos a una longitud de onda de 340 nm. Los resultados se expresaron como nanomoles de NADPH consumidos/(mg de prot * min).

La concentración de proteínas, en todos los casos, fue calculada siguiendo el protocolo descrito por BRADFORD (1976).

Daño de lípidos y proteínas

• *La lipoperoxidación (LPO)* fue medida por determinación de la cantidad de malondialdehido (MDA) y 4-hidroxialquenal (4HDA). Cada muestra fue homogeneizada mediante un homogeneizador igual al descrito anteriormente (Potter-Elvehjem) en una dilución 1:10 en tampón Tris-HCl frío, pH 7,4. Las partículas pesadas se eliminaron del homogeneizado por centrifugación durante 10 minutos a 3000 x g. La cantidad de MDA y 4HDA formada fue determinada en los sobrenadantes utilizando un kit para ensayos de Lipoperoxidación de Calbiochem (No 437634) basado en la reacción de condensación del cromógeno 1-metil-2-fenilindol con MDA y/o 4HDA. Los cromóforos estables fueron determinados a 586 nm. Los resultados se expresaron como nanomoles (MDA + 4HDA)/mg prot.

• *Las proteínas carboniladas (PD)* fueron determinadas a partir del método desarrollado por LENZ *et al.* (1989), modificado posteriormente por FAGAN *et al.* (1999).

Análisis estadísticos

Los datos se presentaron como media ± desviación estándar media calculada a partir de tres réplicas de cada experimento, en cada punto de maduración y para cada animal; cada experimento, a su vez, se llevó a cabo con tres muestras procedentes de cada animal. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), debido a la distribución normal de los grupos establecidos, seguido, en los casos en los que se detectaron diferencias significativas, de un test T de Student para detectar entre qué elementos se presentaban estas diferencias significativas.

Resultados

Los datos muestran un esperable descenso en la temperatura de las canales desde el momento del sacrificio (38,8 ± 0,6 °C) hasta 24 horas más tarde (5,23 ± 0,21 °C) (figura 1; arriba) con diferencias significativas entre cada uno de los puntos (*). Un descenso concomitante fue observado al medir el pH desde valores de 6,52 ± 0,01 hasta 5,54 ± 0,06 (figura 1; abajo), con diferencias significativas encontradas entre el punto 0 y todos los demás valores (*).

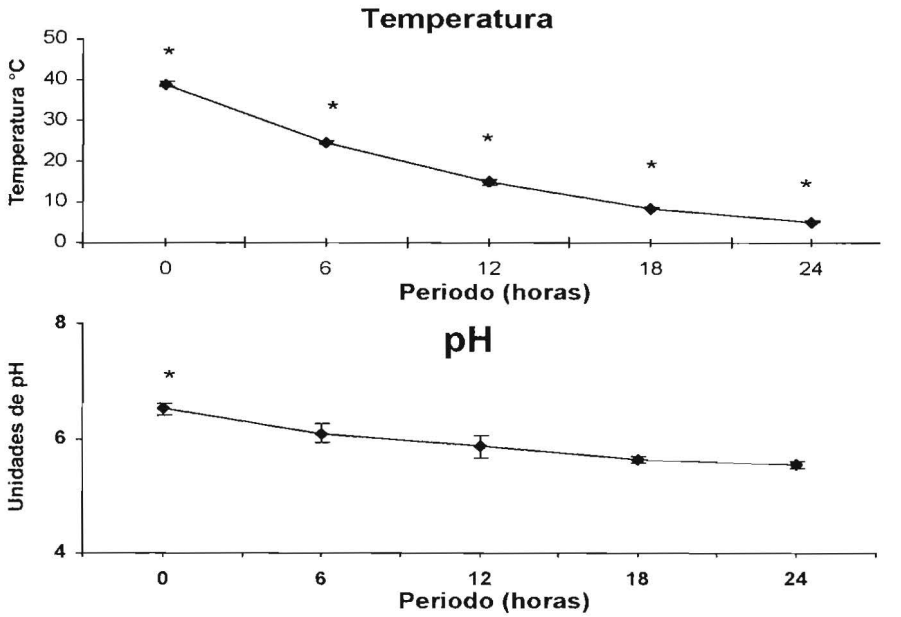


Figura 1. Cambios en la Temperatura (arriba) y el pH (abajo) en el músculo *Longissimus dorsi* de la raza "Asturiana de los Valles" a lo largo de las primeras 24 horas de almacenamiento a 4 °C. Líneas verticales: desviación estándar media. Diferencias significativas (*) en 24 h respecto al resto de periodos.

Figure 1. Changes in temperature (top) and pH (bottom) of Asturiana de los Valles breed Longissimus dorsi *along first 24 h with storage at 4°C. Bars: s.e.m. (*) Statistical differences of period 24 h vs the other periods.*

Actividades de enzimas antioxidantes

Después del sacrificio, la actividad de los enzimas superóxido dismutasa y catalasa fue aumentando continuamente hasta las 12 horas *post-mortem*. Sin embargo, las gráficas de ascenso de actividad fueron remarcablemente diferentes en ambos enzimas; así, en la superóxido dismutasa se observó un lento pero continuo incremento hasta alcanzar un máximo a las 12 horas (**) (figura 2; arriba). La catalasa mostró un incremento retrasado en el tiempo con respecto a la superóxido dismutasa que, sin embargo, terminó en un pico sorprendentemente acentuado a las 12 horas (***) (figura 2; medio). A partir de este punto, ambas actividades comenzaron a descender hasta volver a valores iniciales al cabo de las siguientes 12 horas.

Con respecto a la actividad de la glutatión reductasa no se observaron diferencias significativas (NS) a lo largo de todo el periodo de evaluación, aunque se observó un ligero incremento en actividad entre las horas 0 y 6 h después del sacrificio (figura 2; abajo)

Daño en proteínas y lípidos

El daño oxidativo de proteínas (PD) (figura 3; arriba), expresado como proteínas carboniladas), mostró una tendencia, no significativa, de incremento del daño durante las 6 primeras horas, que se mantuvo estable hasta las 18 h, a partir de las cuales el incremento fue más notable. Al cabo de 24 horas de almacenamiento refrigerado, sin embargo, sí se observó un aumento significativo del daño (**) en comparación con el resto de grupos.

EL daño de lípidos (LPO) decreció a lo largo de las primeras 12 horas *post-mortem* con un descenso significativo a las 6 horas (** vs. 12, 18 y 24), que no alcanzó nuevamente los valores iniciales a lo largo de las restantes 18 horas que duró el experimento (figura 3; abajo).

Discusión

Hasta el momento, el único sistema para poder verificar si realmente las canales han cumplido la normativa de refrigeración a 4ºC es la medición de pH, la cual es a todas vistas insuficiente, al verse influido por muchos otros factores como por ejemplo el estrés que soportase el animal al sacrificio. En el momento de despiece del animal, el tejido muscular se ve sometido a una situación de estrés oxidativo al quedar el tejido en contacto más directo con el oxígeno ambiental aumentando así la producción de radicales libres en las canales. De esta forma, la señal de activación de los enzimas antioxidantes debe comenzar a producirse al despedazar el animal. Debido a ello, se han estudiado los enzimas antioxidantes a lo largo de las primeras 24 horas para observar la variación de sus niveles durante el mantenimiento de la canal refrigerada.

Resolver el problema de la inconsistencia de la calidad de la carne es una prioridad de la industria cárnica. La obtención de terneza se encuentra influenciada por gran número de parámetros entre los que se incluye, el peso, el estrés del animal, la época del sacrificio, así como, el periodo de oreo y la maduración. Campo (1999) llevó a cabo un estudio en siete razas españolas de ganado vacuno observando las variaciones de terneza en función de la raza y el tiempo de maduración. Después de tres días *post-mortem*, los mejores valores obtenidos correspondieron a la raza "Asturiana de los Valles", aunque, al cabo de 14 días, fue esta misma raza la que presentó la peor puntua-

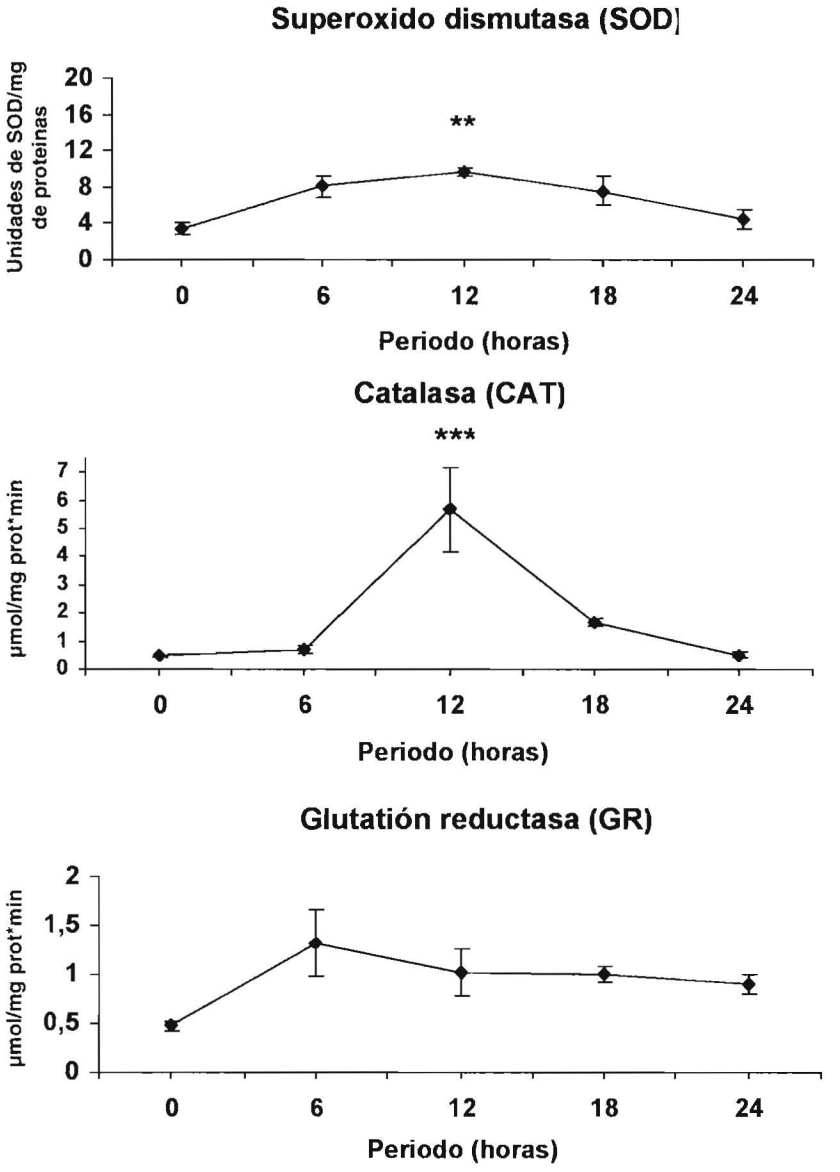


Figura 2. Variación temporal de los principales enzimas antioxidantes: la superóxido dismutasa (SOD) (**) Periodo 12 h presenta diferencias significativas respecto a los periodos 0 y 24 h (arriba); la catalasa (CAT) (***) Periodo 12 h presenta diferencias significativas respecto a los otros periodos (medio); la glutatión reductasa (GR) (abajo) en el músculo *Longissimus dorsi* de la raza "Asturiana de los Valles" durante las primeras 24 horas *post-mortem* a 4 °C (NS). Lineas verticales: desviación estándar media.

Figure 2. Temporal variation in the activities of main antioxidant enzymes: Superoxide dismutase (SOD) (**) Period 12 h is statistically different from periods 0 and 24 h (top); Catalase (CAT) (***) Period 12 h is statistically different from the other periods (middle); Glutathione reductase (GR) (bottom) in Longissimus dorsi *of Asturiana de los Valles breed during first 24 hours* post-mortem *at 4°C (NS). Bars: s.e.m.*

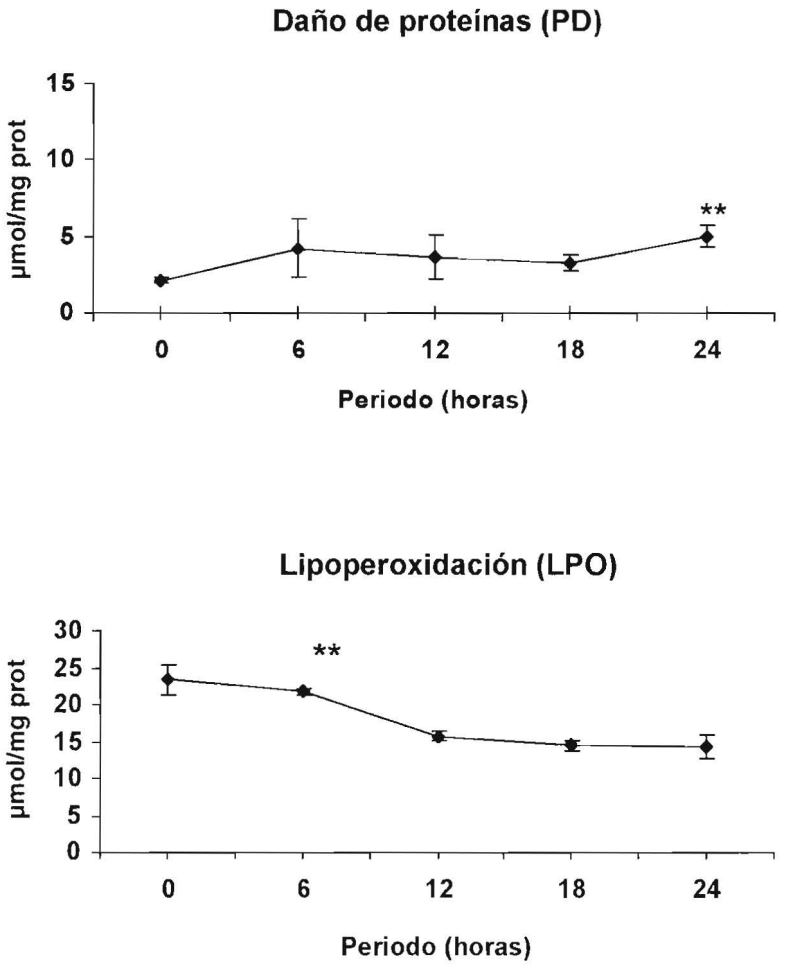


Figura 3. El Daño de proteínas (arriba) expresado como nmol de proteínas carboniladas. (**) El periodo 24 h presenta diferencias significativas respecto al periodo 0 h.
La Lipoperoxidación (LPO) (abajo) expresada como nmol de productos de peroxidación (malonaldehidos + 4-hidroxialquenos). (**) Diferencias estadísticas del periodo 6 h vs 12, 18 and 24 horas a 4ºC en el *Longissimus dorsi* de la raza "Asturiana de los Valles". Lineas verticales: desviación estándar media.

Figure 3. Protein damage (PD) (top) with ordinates as nmol of carbonyl proteins. (**) Period 24 h is statisticaly different from period 0 h. Lipid peroxidation (LPO) (bottom) ordinates as nmol of peroxidation products (malonealdehyde + 4-hydroxyalkenal). (**) Statistical differences of period 6 h vs 12, 18 and 24 hours at 4°C in Longissimus dorsi *of Asturiana de los Valles. Bars: s.e.m.*

ción con respecto al mismo parámetro; esto implica que el periodo de almacenamiento refrigerado de las canales resulta crucial para la mejora o disminución de la terneza de la carne. Por ello, establecer el tiempo mínimo adecuado de maduración para cada raza con respecto a una serie de parámetros que deben seleccionarse, es imprescindible para poder predecir la terneza de la carne antes de que ésta llegue al consumidor.

Con respecto al estrés oxidativo que existe en cada canal, nosotros hemos encontrado una gran correlación entre las actividades de SOD y CAT, mostrando ambas un pico de actividad máximo 12 horas después del sacrificio y un subsecuente declive de la actividad hasta alcanzar los valores iniciales a las 24 horas. CAT es un enzima antioxidante con baja afinidad por su sustrato y que, por lo tanto, a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno realiza un papel más importante que la glutatión peroxidasa (COSTARIDES *et al.*, 1991). Por lo tanto, esta interrelación observada con SOD, debe implicar la formación, principalmente vía actuación de SOD, de altas cantidades de H_2O_2 en el tejido, la cual, vía actuación de CAT, se va compensando en el tiempo por destrucción de este peróxido de hidrógeno. Ya que la actividad de CAT está limitada a una estrecha ventana temporal de actuación, la prevención de la formación de radicales derivados del H_2O_2 es también limitada. Esta interpretación está apoyada por otros datos que muestran el drástico incremento de radicales libres producido durante el periodo de oreo de la carne (DONNELLY y ROBINSON, 1995). Esta abundancia en la formación de radicales libres a partir del sacrificio del animal se explica parcialmente por la incompleta reducción del oxígeno, provocada a su vez por las irregularidades que se producen en el metabolismo redox, una situación que se asemeja a la que se produce en condiciones de isquemia, en la cual, los radicales libres liberados producen efectos devastadores (MOSKOWITZ y KUKIN, 1999).

Después de 12 horas, las actividades tanto de SOD como de CAT disminuyen. Este descenso en la actividad de los dos enzimas puede ser motivado por la caída del pH que produce una progresiva desnaturalización de las proteínas y, por ende, inactivación enzimática. Al mismo tiempo, debe tenerse en cuenta que la máxima actividad de SOD se consigue en un rango de pH entre 6,8 y 7,8. Ya que el pH después de las 12 primeras horas fue siempre inferior a 6,8 ($pH < 5,8 \pm 0,19$), la actividad de SOD en ese periodo debemos suponer que se ha reducido por no ser las condiciones idóneas de actuación del enzima y no debido a un descenso del estrés oxidativo del tejido. Un efecto similar puede ser supuesto para el caso de CAT. En experimentos llevados a cabo a lo largo de periodos de tiempo más largos, incluso tres meses, en los que se estudiaba tejido almacenado en refrigeración y congelación (PRADHAN *et al.*, 2000), se ha comprobado que CAT es capaz de mantener una actividad basal tanto en *Longissimus dorsi* de vacuno como en otros músculos y animales (LEE *et al.*, 1996 y RENERRE *et al.*, 1996), lo cual indica que la caída gradual observada en nuestro estudio para este enzima a partir de las 12 primeras horas no va a dar lugar a una desaparición de la actividad del enzima, sino que éste mantendrá constante su actividad. Esta es la primera vez que se ha observado una variación de la actividad de este enzima antioxidante durante el periodo *post-mortem* antes de alcanzar su estabilidad probablemente debido a que el estudio se ha realizado desde el momento del sacrificio y con intervalos de estudio muy cortos (cada seis horas) que ha permitido la obtención del pico de actividad que de otra forma pasaría desapercibido ya que la actividad a las 0

horas resulta muy similar a la que vuelve a presentar a las 24 horas.

Por su parte, GR mostró sólo una ligera tendencia, no significativa, a aumentar su actividad durante las primeras 6 horas. Después de ese tiempo la actividad se mantuvo constante a lo largo de las siguientes 18 horas que duró el estudio y no se detectó ningún descenso significativo de actividad equiparable al resto de enzimas estudiados. HERNÁNDEZ *et al.* (2002) demostraron que la actividad del enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), el cual actúa en combinación con el enzima GR, decrece en el *Longissimus dorsi* durante los tres primeros días de almacenamiento refrigerado. En la misma línea, LEE *et al.* (1996) han señalado un decrecimiento de la actividad de este enzima en músculo porcino al cabo de 10 semanas de almacenamiento a –15° C. Estos resultados parecen corroborar el mantenimiento de actividad por nosotros observado para GR, ya que el descenso de actividad se produce más tarde en el almacenamiento refrigerado.

Varios datos indirectos corroboran los resultados obtenidos: por un lado, el tándem GSH-Px y GR es responsable de la detoxificación de H_2O_2 a bajas concentraciones, debido a la alta afinidad que GSH-Px presenta por este sustrato (COSTARIDES *et al.*, 1991). GR cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) en presencia de NADPH. El metabolismo anaerobio que se inicia rápidamente después del sacrificio del animal, provoca un incremento en la concentración de NAPDH + H^+ ya que en ausencia de metabolismo aeróbico el NAD^+ no se recicla. Aunque un exceso de NADPH podría empujar la ruta hacia la formación de GSH, este proceso iría progresivamente antagonizado por la caída de pH que favorece al GSSG; el contenido de GSSG intracelular se incrementa en un 37% a pH< 6 (**) en comparación con su contenido a pH 7,4 (IKEBUCHI *et al.*, 1993). Además el H_2O_2 decrece la concentración de GSH tanto por oxidación directa de la molécula como por inactivación irreversible de GSH-Px , ya sea directamente por peróxido de hidrógeno como por radicales hidroxilo derivados de H_2O_2. Todo ello parece apoyar la necesidad del mantenimiento de la actividad de GR observada.

El significado preciso de los cambios observados en la actividad de los enzimas ensayados permanece desconocido pero puede ser explicado si se estudia el daño provocado en las principales biomoléculas por el estrés oxidativo. Debido a ello, en este trabajo se han determinado tanto el daño de proteínas como de lípidos del músculo. El estudio a lo largo del tiempo realizado de estos parámetros mostró claramente que la reducida capacidad de actuación del tejido *post-mortem*, es aún suficiente para que los enzimas actúen a lo largo del periodo de oreo estudiado. Estos datos unidos a nuestros resultados enzimáticos nos permiten concluir que en *Longissimus dorsi* de nuestra raza de estudio el sistema de defensa antioxidante no sólo es capaz de actuar sino incluso de incrementar sus actividades en respuesta al aumento del estrés oxidativo, al menos durante las 12 primeras horas. Por otra parte, RENERRE *et al.* (1996) han mostrado que la actividad de los enzimas antioxidantes en vacuno resulta más alta en músculos más rojos e inestables, como el diafragma, que en estables como el *Longissimus dorsi*. Debido a estos datos, es posible, que bajo nuestras condiciones, otros músculos en el animal mostrasen actividades en sus enzimas antioxidantes incluso más altas que las detectadas por nosotros en *Longissimus dorsi*.

En nuestro estudio, hemos obtenido una estrecha correlación entre las actividades de los enzimas antioxidantes y el daño a biomo-

léculas. La lipoperoxidación mostró un descenso hacia las 12 horas, cuando los antioxidantes mostraron máximos de actividad, mientras que la oxidación de proteínas fue aumentando débilmente durante las seis primeras horas que se mantuvo hasta las 18 horas, para seguir aumentando desde esa hora hasta la finalización del estudio. Este aumento final se corresponde con una caída en la actividad de los enzimas antioxidantes. Esta correlación de datos indudablemente muestra que durante el periodo de oreo el sistema de defensa antioxidante sigue actuando protegiendo a proteínas y lípidos. Resulta indudable que en periodos más avanzados de almacenamiento refrigerado van a producirse los procesos determinantes de desnaturalización de proteínas que van a llevar a la obtención de terneza en la carne y que determinarán una carne de calidad. Sin embargo, la cuestión que permanece sin dilucidar es, cómo pueden afectar estos cambios tempranos a los procesos posteriores y si van a afectar a la obtención de esta calidad deseada. Es un hecho conocido que la modificación oxidativa de proteínas puede influir en su posterior degradación por proteasas, ya que los cambios ocasionados en consecuencia, como es la carbonilación, pueden facilitar la proteolisis. En nuestro estudio, el daño de proteínas muestra un patrón dependiente de la actividad de los enzimas antioxidantes. Resulta esperable que este proceso continúe después del periodo de observación. INSAUSTI *et al.* (2001) han estudiado seis razas españolas de ganado vacuno entre las que se encontraba la raza "Asturiana de los Valles" que ocupa nuestro estudio, observando los procesos oxidativos que tenían lugar en los lípidos después de las primeras 24 horas *post-mortem*. En ese estudio ellos demostraban, mediante evaluación sensorial, la gran variabilidad en cuanto al periodo de tiempo en el que la carne se conserva en buenas condiciones, encontrándose entre los días 5 y 10 en una raza y entre los días 10 y 15 de las demás razas. El daño oxidativo de las biomoléculas puede ser el factor limitante de esta variabilidad observada.

La lipoperoxidación no sigue el mismo desarrollo temporal que la oxidación de proteínas. La lipoperoxidación desciende durante las primeras 18 horas *post-mortem*, pero no vuelve a alcanzar, a lo largo del periodo de estudio, los valores iniciales. Los enzimas antioxidantes pueden ser, como ya se ha discutido, responsables total o parcialmente durante las 18 primeras horas del descenso en la oxidación de proteínas, así como, de su ascenso posterior al descender la actividad de los mismos. Por otro lado, la baja generación de radicales en el tejido, a lo largo de este periodo podría ser la responsable de la ausencia de un incremento en la lipoperoxidación que acompañase a la oxidación de proteínas. Estudios previos han demostrado el efecto que la catalasa juega sobre la modulación de la lipoperoxidación en carne no cocinada (PRADHAN *et al.*, 2000), al observar que la lipoperoxidación que se produce en músculo de vacuno refrigerado aumenta marcadamente cuando se inhibe la catalasa. La oxidación de la oxihemoglobina puede dar lugar a H_2O_2, como también sucede con la metamioglobina (SATOH y SHIKAMA, 1981; XU *et al.*, 1990); ésta una vez calentada parece mantener la capacidad de ser activada por el H_2O_2. El peróxido de hidrógeno en la carne producido, bien a través de la oxidación de la oxomioglobina o a través de otras vías, puede también participar en la reacción de Haber-Weiss donde se producen radicales hidroxilo altamente reactivos por la reacción del H_2O_2 con anión superóxido (JOHNSON *et al.*, 1992). Por todos estos antecedentes parece lógico concluir que todos aquellos factores, agentes y sucesos que pueden influir en los niveles de H_2O_2 afectarán indirectamente también a la

lipoperoxidación que se vaya produciendo en la carne.

Por otro lado, el daño de proteínas fue medido utilizando un método específico para extractos de proteínas de tejidos crudos que permite eliminar los cromóforos (hemoglobina, mioglobina, retinoides...) que se hallan en cantidades significativas en las muestras de carne, por lo que estos factores no han afectado a nuestros resultados de daño de proteínas aunque indudablemente están influyendo en el daño de lípidos observado.

Por último, es conocido que una caída en la defensa antioxidante tiene un efecto negativo en la tenderización *post-mortem*, ya que va a provocar finalmente un descenso en la retención de agua (CHEFTEL y CHEFTEL, 1982), por lo tanto, el conocimiento de sus actividades, como se ha estudiado en este trabajo, debería ser un buen indicador de la terneza final de la carne que llega al consumidor. Al mismo tiempo, nuestros resultados podrían ser utilizados para detectar el tiempo de almacenamiento refrigerado en el que se ha mantenido a la canal.

Conclusiones

Con el presente trabajo, desarrollado en *Longissimus dorsi* de la raza "Asturiana de los Valles", a lo largo de las primeras 24 horas inmediatas al sacrificio, de obligada refrigeración a 4 °C de las canales, hemos podido establecer que todos los enzimas antioxidantes estudiados, SOD, CAT y GR son capaces de aumentar su actividad durante las primeras doce horas *post-mortem* hasta el punto de disminuir el daño oxidativo de lípidos por debajo de los niveles existentes en el momento del sacrificio y mantenerlo sin diferencias significativas en el caso de las proteínas. Las siguientes doce horas de estudio mostraron un descenso de la actividad enzimática que puede ser debido a múltiples factores (descenso de temperatura y de pH por debajo de los niveles idóneos así como disminución de la energía celular) que se manifestó en un aumento del daño de proteínas que, sin embargo, no afectó de forma determinante a los lípidos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a una financiación procedente del MCYT CAJAL-01-07. La licenciada Cristina Tomás-Zapico debe agradecer a la "Secretaría de Estado de Educación y Universidades" su beca predoctoral FPU. La Dra. Ana Coto-Montes es investigadora contratada del programa "Ramón y Cajal". Debemos agradecer al personal del Matadero de Avilés su ayuda intelectual y técnica, así como a D. Jose Manuel Llana García su asistencia instrumental.

Bibliografía

BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.

CAMPO M.M., 1999. Influencia de la raza sobre la textura y las características sensoriales de la carne bovina a lo largo de la maduración. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

COSTARIDES A.P., RILEY M.V., GREEN K., 1991. Roles of catalase and the glutathione redox cycle in the regulation of anterior-chamber hydrogen peroxide. Ophthalmic Res., 23, 284-294.

CHEFTEL J.C., CHEFTEL, H., 1982. Carne y pescado, pp 65-97. En: Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol. 2, Ed. Acribia . Zaragoza.

DONNELLY J.K., ROBINSON, D.S., 1995. Free Radicals in foods. Free Radical Res., 22, 147-176.

FAGAN J.M., SLECZKA B.G., SOHAR I., 1999. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. Int. J. Biochem. Cell Biol., 31, 751-757.

HERNANDEZ P., PARK D., RHEE K.S., 2002. Chloride SALT type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in pork. Meat Sci., 61, 405-410.

IKEBUCHI M., KASHIWAGI A., ASAHINA T., TANAKA Y., TAKAGI Y., NISHIO Y., HIIDAKA H., KIKKAWA R., SHIGETA Y., 1993. Effect of medium pH on glutathione redox cycle in cultured human umbilical vein endothelial cells. Metabolism, 4, 1121-1126.

INSAUSTI K., BERIAIN M.J., PURROY A., ALBERTI P., GORRAIZ C., ALZUETA M.J., 2001. Shelf live of beef from local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. Meat Sci., 57, 273-281.

JOHNSON M.A., FISCHER J.G., KAYS S.E., 1992. Is copper an antioxidant nutrient? Crit. Rev. Food Sc. Nutr., 32, 1-31.

KAUFFMAN R.G., MARSH B.B., 1987. Quality characteristics of muscle as a food, pp 349-360. En: J.F. PRICE, B.S. SCHEIGERT. (Ed.) Science of meat and meat products. Food and Nutrition Press, Inc., Westport.

KUM-TATT L., TAN I.K., SEET A.M., 1975. A new colorimetric method for the determination of NADH/NADPH dependent glutathione reductase in erythrocytes and in plasma. Clin. Chem. Acta, 58, 101-108.

LEE S.K., MEI L., DECKER E.A., 1996. Lipid oxidation in cooked turkey as affected by added antioxidant enzymes. J. Food Sci., 61, 726-728.

LENZ A.G., COSTABEL U., SHALTIER S., LEVINE R.L., 1989. Determination of carbonyl groups in oxidately modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. Anal. Biochem., 177, 419-425.

LUBINSKY S., BEWLEY G.C., 1979. Genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*: Rates of synthesis and degradation of the enzyme in flies aneuploid and euploid for the structural gene. Genetics, 9, 723-742.

MARSH B.B., 1993. ICOMST, Calgary, Canada. Review paper, Session 3.

MARTIN J.P. JR., DAILY M., SUGARMAN E., 1987. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. Arch of Biochem. Biophys., 255, 329-336.

MOSKOWITZ R., KUKIN M., 1999. Oxidative stress and congestive heart failure. Congest Heart Fail., 5, 153-163.

O'HALLORAN G.R., TROY D.J., BUCKLEY D.J., 1997. The relationship between early post-mortem pH and the tenderisation of beef muscles. Meat Sci., 45, 239-251.

POTTHAST K., HAMM R., ACKER L., 1977. Influence of water activity on the enzymatic changes in freeze-dehydrated muscle. IV. Change in the activity of glycolytic enzymes during storage (author's transl). Z Lebensm Unters F A, 165, 18-20.

PRADHAN A.A., RHEE K.S., HERNANDEZ P., 2000. Stability of catalase and its potencial role in lipid oxidation in meat. Meat Sci., 54, 385-390.

RENERRE M., FRANCOISE D., GATELLIER P., 1996. Antioxidant enzyme activity in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. Meat Sci. 43, 111-121.

RONCALES P., GEESINK G.H.,VAN LAACK R.L.J.M., JAIME I., BELTRAN J.A., BARNIER V.H.M., SMULDERS F.J.M., 1995. Meat tenderisation: enzymatic mechanisms, pp. 311-332. En: A. OUALI, D. DEMEYER, F. SMULDERS (Ed.) Expression of Tissue Proteinases and Regulation of protein degradation as related to meat quality. ECCEAMST.

SATOH Y., SHIKAMA K., 1981. Autoxidation of oxymyoglobin: a nucleophilic displacement mechanims. J. Biol. Chem. 256, 10272-10275.

UYTTERHAEGEN L., CLAEYS E., DEMEYER D., 1994. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. J. Anim. Sci., 72, 1209-1223.

WHEELER T.L., KOOHMARAIE M., 1994. Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. J. Anim. Sci., 72, 1232-1238.

XU Y., ASGHAR A., GRAY J.I., PEARSON A.M., HAUNG A., GRULKE E.A., 1990. ESR spin-trapping studies of free radicals generated by hydrogen peroxide activation of metmyoglobin. J. Agr. Food Chem., 38, 1494-1497.

(Aceptado para publicación el 26 de enero de 2004).