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

# ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LA MADURACIÓN DE CARNE DE VACUNO PROCEDENTE DE DOS CABAÑAS AUTÓCTONAS ASTURIANAS

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **102** N.º 3 (288-303), 2006

# Enzimas antioxidantes en la maduración de carne de vacuno procedente de dos cabañas autóctonas asturianas

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

* Departamento de Morfología y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo (España). Correspondencia a: Dra. Ana Coto-Montes, Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina. Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, España. Teléfono:+34 985 102779; Fax: +34 985 103618; e-mail: acoto@uniovi.es
** The Institut für Zoologie, Anthropologie und Entwicklungsbiologie der Universität, D-37073 Göttingen (Alemania).
*** SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario), Apartado 13, 33300 Villaviciosa, Asturias (España).

**Resumen**
En este trabajo se determinó el estado oxidativo de la carne procedente de terneros añojos de genotipo culón (*mh*/*mh*) y normal (+/+) de la raza Asturiana de los Valles (AV) así como terneros normales (+/+) de la raza Asturiana de la Montaña (AM) durante su periodo de maduración a 4ºC, mediante el estudio de la actividad de los principales enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutatión reductasa (GR). Se midió también el nivel de peroxidación lipídica (LPO) a lo largo de la maduración a 4ºC de carne procedente de ambas razas (AV y AM) por ser los lípidos y las proteínas las biomoléculas que más limitan la vida media de la carne durante este periodo. Los resultados reflejaron una clara estabilidad de los enzimas durante el periodo de maduración de la carne, siendo el enzima GR el que mostró menor actividad, mientras que SOD y CAT presentaron actividad a lo largo de todo el período de maduración estudiado con un patrón de actividad que se repitió en la carne de terneros (*mh*/*mh)* y (+/+) de raza AV, siendo más adelantado en los primeros que en los segundos. La peroxidación lipídica no mostró variación alguna a lo largo de la maduración tanto en animales (+/+) de la raza AV como en animales (+/+) de la raza AM. Sin embargo, los animales (*mh*/*mh)* de la raza AV mostraron un incremento significativo del daño lipídico en el músculo tras 7 días de maduración.

**Palabras clave:** Maduración, Asturiana de los Valles, Asturiana de la Montaña, "culón", lipoperoxidación, vacuno

**Summary**
**Antioxidant enzymes throughout ageing from two local cattle breeds**
In this study, meat from double-muscled ("culones", *mh*/*mh*) and normal (+/+) young bulls of the breed Asturiana de los Valles (AV) as well as normal (+/+) animals from Asturiana de la Montaña (AM) was analysed during ageing at 4°C with regard to its oxidative status. Activities of the following main antioxidant enzymes were determined: Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione reductase (GR). In both breeds (AV and AM), lipid peroxidation (LPO) was also measured throughout the ageing period, because meat shelf life is mainly limited by lipids and proteins. All enzymes were apparently stable during meat ageing. While GR exhibited the lowest activity among antioxidant enzymes, SOD and CAT showed activity along the ageing period studied, with similar activity pattern seen in both double-muscled and normal animals, although, being advanced in the formers. In normal

animals of both the AV and AM breeds, lipid peroxidation did not vary during ageing. However, double-muscled meat showed a significant increase after 7 days of maturation.

**Key words:** ageing, Asturiana de los Valles, Asturiana de la Montaña, double muscled, lipid peroxidation, beef.

## Introducción

La maduración es uno de los pasos más importantes que debe seguir la carne de vacuno para obtener un satisfactorio grado de terneza, la cual es decisiva a la hora de ser seleccionada y aceptada por el consumidor.

El proceso de maduración está fundamentalmente basado en la degradación enzimática de las proteínas miofibrilares y del citoesqueleto que, durante la vida del animal, mantienen la integridad estructural de las miofibrillas (Jiang, 1998). Este desarrollo es multifactorial, ya que está influído por muy diversos factores, tanto intrínsecos (raza, edad y sexo del animal) como extrínsecos (alimentación, manejo antes y durante el sacrificio, conservación), todos los cuales afectarán negativa o positivamente a la evolución de la maduración dando como resultado la obtención de una carne de una calidad determinada.

La calidad se define como la capacidad de un producto para satisfacer las necesidades o expectativas del consumidor. En el caso de la carne de vacuno, la calidad a nivel organoléptico, viene determinada principalmente por el nivel de terneza, jugosidad y sabor de la carne y son varios los factores biológicos que la determinan como la caída del pH, el tipo de fibras musculares, la cantidad y solubilidad del colágeno, la cantidad y composición de la grasa, e incluso el desarrollo del tejido. Sin embargo, no todos los procesos de transformación *post-mortem* que sufre el músculo son positivos desde el punto de vista de la calidad sensorial. Este es el caso de la oxidación de los lípidos, una de las principales causas del deterioro de los alimentos que contienen grasa animal, donde el oxígeno molecular puede atacar a los ácidos grasos insaturados por un mecanismo de radicales libres, rindiendo productos complejos responsables del aroma y sabor tipo rancio.

Las modificaciones que se van produciendo a lo largo de la maduración en las biomoléculas y la destrucción que algunas de ellas sufren debido a las modificaciones oxidativas son procesos conocidos desde hace años y a los que, sin embargo, no se les ha dado la importancia que merecen en relación con la calidad final del producto. Estos procesos oxidativos deben contribuir, como los demás factores anteriormente mencionados, a la degradación y descomposición del material con consecuencias obligadas sobre la calidad y textura de la carne (Coto-Montes *et al.*, 2004). Aunque los cambios ocurridos en la carne motivados por mecanismos precisos mediados por radicales libres 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). Existen una serie de enzimas que actúan como antioxidantes gracias a su capacidad para absorber la energía de las especies reactivas de oxígeno (que se producirán durante el almacenamiento de las canales y que son

responsables de los procesos de oxidación de los componentes alimenticios que van en detrimento de la calidad), metabolizando los radicales libres o sus intermediarios reactivos, transformándolos en productos sin efectos nocivos para los tejidos. Así la Superoxido Dismutasa (SOD) destruirá radicales superóxido dando lugar a $H_2O_2$, que por la reacción de Fenton produciría radicales hidroxilo, mucho mas tóxicos que el primero; para evitar esos efectos nocivos entrará en acción la Catalasa (CAT) que elimina el agua oxigenada produciendo $O_2$ y 2 moléculas de agua. Por último, como sistema antioxidante, contamos con el tándem glutatión peroxidasa/reductasa (GSH-Px/GSH) que comparte su sustrato con la catalasa utilizando el glutatión reducido (GSH) como donador específico de H+ para reducir el $H_2O_2$ a agua, pero con una afinidad por su sustrato mucho más alta que la CAT.

Por otro lado, se conoce la existencia de sinergias entre los principales sistemas enzimáticos (proteolíticos, oxidativos) durante la maduración de la carne. Experimentos llevados a cabo con anterioridad en nuestro laboratorio han mostrado a lo largo del periodo de oreo variaciones significativas en los principales enzimas antioxidantes que se correlacionaban perfectamente con los daños de proteínas obtenidos en las canales estudiadas (Coto-Montes *et al.*, 2004), lo que evidenciaba que estos enzimas jugaban algún papel en el proceso de maduración cárnica (Hernández *et al.*, 2002).

Los animales denominados (*mh*/*mh*) se caracterizan por un excepcional desarrollo muscular (Arthur, 1995) que les lleva a incrementar su masa muscular en alrededor de un 20% debido a hiperplasia del músculo esquelético que lleva consigo un incremento en el número de fibras musculares. Este hecho ha recibido una considerable atención por parte de los productores de carne que han descubierto que los (*mh*/*mh*) presentan carne más tierna (Boccard, 1982; Bouton *et al.*, 1982), con un menor contenido en grasa (Uytterhaegen *et al.*, 1994; Oliván *et al.*, 2004a) que animales con conformación muscular normal. Este rasgo culón en la cabaña es el resultado de una mutación inactivante del gen de la miostatina (Grobet *et al.*, 1997), el cual es un regulador negativo de la masa muscular (Thomas *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001). Exactamente, en bovino, una delección de 11 pares de bases en la secuencia que codifica la miostatina, es la causante del excesivo crecimiento muscular (Grobet *et al.*, 1997)

La frecuencia del carácter culón está creciendo en varias cabañas europeas como Piamontesa y Charolais, así como en una de las más importantes razas del norte de España como es Asturiana de los Valles (AV). Asturias por su tradición socio-económica, por su clima y su suelo ha favorecido el desarrollo de dos importantes cabañas de ganado vacuno autóctono, como son: AV y Asturiana de la Montaña (AM). El alma de este trabajo ha sido el estudio de la evolución y conservación de la protección antioxidante a lo largo de la maduración de la carne, estudiando su posible correlación con el daño a biomoléculas y con la vista puesta en el papel que estos enzimas pueden jugar en el complejo proceso de obtención de carne más tierna y de calidad. Para este propósito hemos seleccionado canales procedentes de terneros normales (+/+) de las dos razas citadas anteriormente: AM y AV, así como de terneros culones (*mh*/*mh*) procedentes de ésta última (AV) por su importancia económica en nuestra comunidad.

## Material y métodos

### Animales

Los estudios se llevaron a cabo en canales procedentes de dos categorías genéticas

distintas dentro de la raza AV: animales "normales", es decir, carentes de la mutación en el gen de la miostatina (+/+) y animales "culones", homocigotos recesivos para esta mutación (*mh*/*mh*), así como animales normales (+/+) procedentes de AM, tomando muestras de 5 animales para cada categoría genética (n=15).

Estos animales estuvieron sometidos a unas condiciones alimenticias bien definidas y determinadas, superando los rigurosos controles del Consejo Regulador "Ternera Asturiana", de forma que los terneros se mantuvieron junto a sus madres desde el nacimiento (invierno) hasta el destete (otoño), *etapa de lactación*, durante la cual los terneros recibieron como alimento básico leche materna y hierba del pasto. Después del destete, realizado a los 7-8 meses de edad en la raza AV y 9 meses en la raza AM, se inicia la *etapa de crecimiento y engorde* en la que los terneros fueron alimentados con concentrado (84% cebada, 10% soja, 3% grasa, 3% minerales, vitaminas y oligoelementos) y paja de cereal *ad limitum*, que finaliza con el sacrificio del animal, obteniéndose animales de categoría añojo, de aproximadamente 520 kg de peso vivo en la raza AV y 460 kg en la raza AM, teniendo una edad entre 15 y 16 meses los terneros AV y 18 meses los AM. En este estudio sólo se utilizaron añojos machos.

### Preparación de las muestras

Los animales fueron sacrificados en el matadero de Pravia (Asturias) por electrocución y posterior excisión yugular. Una vez sacrificados y durante las 24 horas posteriores al sacrificio las canales se mantuvieron suspendidas en oreo a 4 ºC.

Tras las primeras 24 horas de oreo *post-mortem*, se cuarteó la media canal izquierda entre la 5ª y 6ª vértebras torácicas con una sierra circular y se extrajo la porción del músculo *Longissimus dorsi* (LD) comprendida entre la 6ª y 13ª costillas. El músculo se transportó al laboratorio y se dividió en filetes de 2,5 cm de grosor destinados a distintos procedimientos analíticos. El filete obtenido a nivel de la 13ª costilla se dividió en tres partes, de aproximadamente 80 g de peso, con el fin de someter cada una de ellas a tiempos progresivos de maduración (corto-medio-largo) para cada músculo y animal. Cada porción se envasó en bolsas permeables al oxígeno y se almacenó a 4 ºC durante 7, 14 y 21 días de maduración en el caso de los animales normales (+/+) AV y AM o durante 3, 7 y 14 días de maduración en el caso de los animales (*mh*/*mh)* de la raza AV, debido a su conocida mayor rapidez en la maduración.

Una vez concluido el periodo de maduración seleccionado, las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a –20 ºC hasta su utilización.

### Ensayos enzimáticos

Para cada músculo y punto de maduración se tomaron 3 muestras de 0,1 g. En el momento de iniciar los análisis, el tejido fue descongelado y homogeneizado en tampón fosfato 50 mM 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, por triplicado, 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).

### Peroxidación lipídica

• 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 formado fue determinado 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.

### Análisis estadísticos

Los datos se presentan como media ± error estándar calculada a partir de las tres réplicas de carne obtenidas de cada músculo y tiempo de maduración, analizadas cada una por triplicado. Se realizó un análisis de los mismos utilizando el programa estadístico SPSS versión 11,5.

Para comprobar la normalidad de las variables se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov, aceptándose como significativo una $p > 0,05$.

Las comparaciones entre categorías por punto de maduración en las actividades enzimáticas se analizaron aplicando un ANOVA de una vía, siendo el genotipo el factor fijo. El efecto del período de maduración (3, 7, 14 y 21 días) en cada genotipo sobre la actividad de cada enzima antioxidante, así como la evolución del daño oxidativo en lípidos, se analizó mediante un ANOVA siendo el tiempo y el animal los factores fijos estudiados. Cuando hubo efecto significativo, las diferencias entre medias se analizaron mediante el test de comparaciones múltiples DMS (diferencias mínimas significativas). El efecto animal no fue significativo en ninguna de las variables estudiadas.

## Resultados

Tanto en la actividad de los principales enzimas antioxidantes como en la formación de peróxidos lipídicos se ha estudiado el patrón de evolución a lo largo de tres puntos crecientes (corto-medio-largo) en el tiempo de maduración, habiéndose aplicado tiempos más cortos en la carne proce-

dente de los terneros (*mh/mh)* (3, 7, 14 días) que para los terneros (+/+) procedentes tanto de AV como de AM (7, 14 y 21 días) debido a que la bibliografía existente sobre el tema (Campo *et al.,* 1999 y 2000; Oliván *et al.,* 2003 y 2004a) indicaba de forma reiterada la más rápida tenderización de la carne en terneros (*mh/mh)* que en el resto de genotipos estudiados.

Superóxido dismutasa

El estudio de evolución de la actividad de SOD a lo largo del tiempo de maduración muestra dos patrones distintos de actuación: por un lado, tanto en la carne (*mh/mh)* como en la (+/+) de la raza AV hubo un incremento paulatino de actividad a lo largo de la maduración, mientras que en los animales procedentes de la raza AM no hubo diferencias de actuación a lo largo del periodo estudiado. También destaca el alto nivel de actividad de SOD en la carne de los terneros (*mh/mh)* en tiempos cortos de maduración (valor medio de 11,7± 4,4 unidades de SOD/mg de proteína a los 3 días), alcanzando valores máximos (22,8 ± 2,32 a los 14 días de maduración) muy superiores a los detectados en el resto de genotipos incluso en tiempos más largos de maduración (17,5-17 uds SOD/mg proteína en (+/+) AV a los 14 y 21 días, respectivamente, tabla 1). Al presentar la carne de los terneros (*mh/mh)* altos niveles de SOD a los 3 días, se observa un escaso incremento entre los 3 y los 7 días, seguido por un crecimiento rápido y significativo de actividad entre los 7 y 14 días de maduración ($p<0,05$, fig 1A). Este incremento de actividad también es significativo en individuos normales de raza AV entre los días 7 y 14 ($p<0,05$, fig 1B), en cambio, en animales normales (+/+) AM no se observan variaciones significativas en la actividad SOD a lo largo del tiempo de maduración analizado (fig 1C), manteniéndose a lo largo de los tres puntos de maduración estudiados los valores de actividad, entre los más bajos obtenidos para este enzima.

Las comparaciones entre categorías por punto de maduración en la actividad SOD muestran un efecto significativo del genotipo en todos los tiempos comunes estudiados ($p<0,001$), observándose que la actividad SOD fue superior en la carne de los (*mh/mh)* AV frente a los (+/+) AV, siendo las diferencias significativas tanto a los 7 ($p<0,05$) como a los 14 días de maduración ($p<0,05$). Así mismo, los animales (+/+) AV mostraron una actividad significativamente superior a los (+/+) de AM para todos los puntos estudiados ($p<0,05$ a los 7 y 14 días, $p<0,001$ a los 21 días, tabla 1).

Catalasa

Al igual que se había observado en SOD, la actividad de CAT a lo largo de la maduración mostró dos patrones de actuación, uno en los terneros de la raza AV (*mh/mh* y +/+) y otro en los terneros AM (+/+). Por un lado, en (*mh/mh)* y en (+/+) de la raza AV, se observó un incremento de actividad entre los puntos primero y segundo de estudio que desciende en el tercero, siendo el patrón de evolución similar en ambos genotipos, aunque más adelantado (en tiempos más cortos de maduración) en el genotipo (*mh/mh)* (figs. 2A y B). Por otro lado, los animales procedentes de AM (fig 2C), mostraron, como había sucedido para SOD, otro patrón de actuación, en este caso con un incremento continuo de actividad, aunque no significativo, y desmarcándose claramente de los animales normales procedentes de AV.

La actividad CAT se observa más elevada en los animales (+/+) de la raza AV respecto a las otras dos categorías, siendo esta diferencia significativa a los 7 ($p<0,05$) y 14 ($p<0,05$) días de maduración (tabla 1).

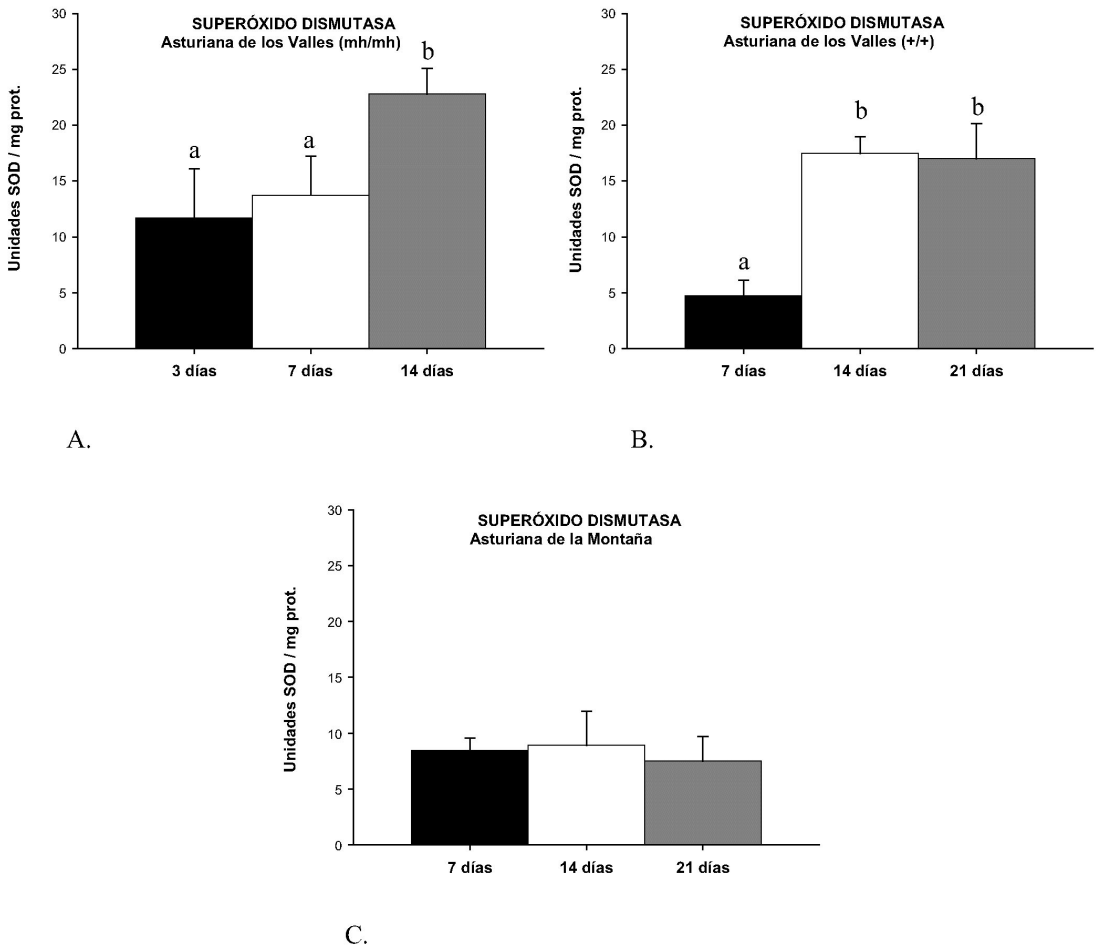



Figura 1. Actividad del enzima Superóxido dismutasa (SOD) expresada como unidades de SOD/mg de proteína, a lo largo del periodo de maduración a 4 °C. Notar que los puntos de maduración son: 3, 7 y 14 días para los animales *mh/mh* de *Asturiana de los Valles* (AV) y 7, 14 y 21 días para el resto de las categorías, siendo: A) *mh/mh*, B)+/+ de AV y C)+/+ de *Asturiana de la Montaña* (AM). Líneas verticales: desviación estándar media. En cada genotipo, las medias marcadas con distinta letra son significativamente diferentes para p<0,05.

*Figure 1. Superoxide dismutase activity ordinates as units of SOD/mg protein along maturation period at 4ºC. Note that ageing times are, for* mh/mh *from* Asturiana de los Valles *(AV) breed : 3, 7, and 14 days and for normal animals : 7, 14 and 21 days, being: A)double-muscled AV; B)+/+ AV; C)+/+ animals from* Asturiana de la Montaña *(AM) breed. Vertical lines: s.e.m. For each genotype, means denoted by different letters are significantly different at the level of p<0.05.*

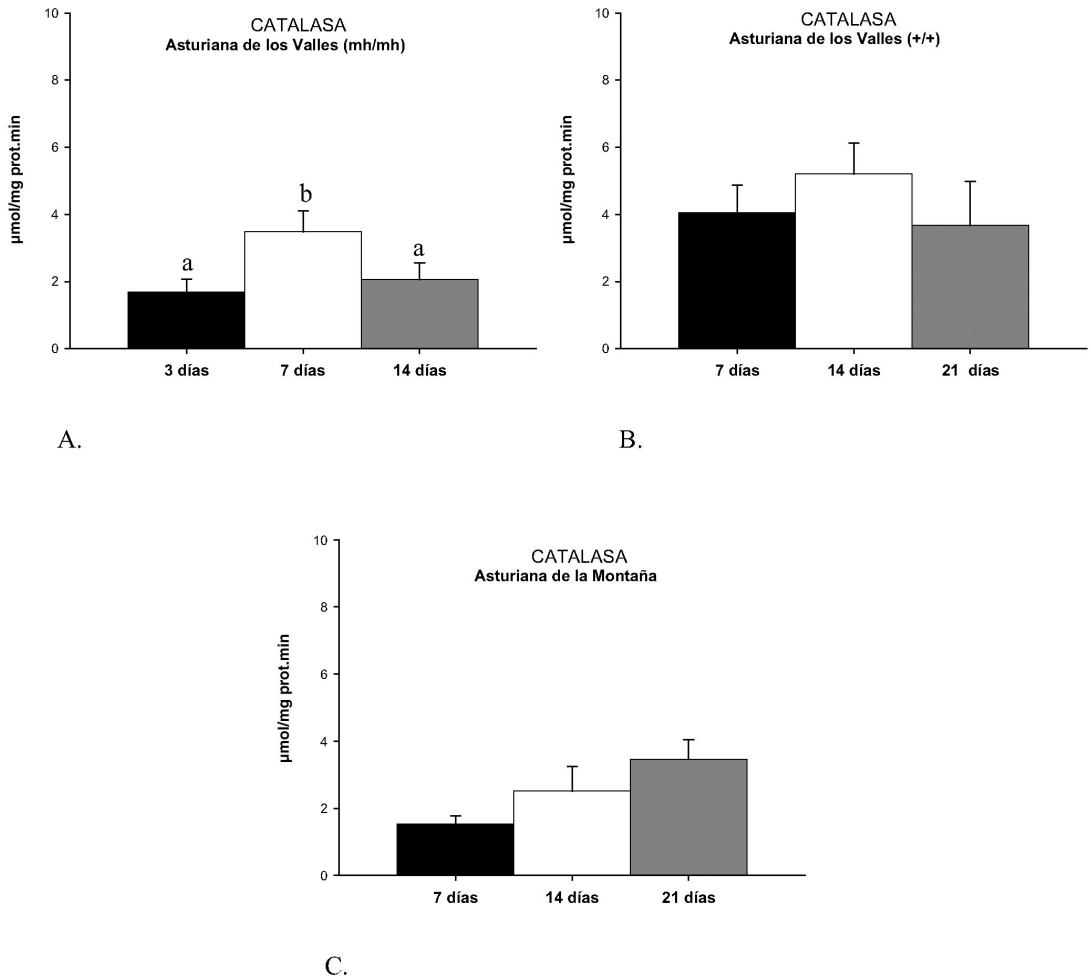



Figura 2. Actividad del enzima Catalasa (CAT) expresada como µmoles $H_2O_2$/mg proteina*min, a lo largo del periodo de maduración a 4 ºC, medida en los mismos tiempos de maduración que los utilizados para la figura 1, siendo: A)*mh/mh*, B)+/+ de AV y C) +/+ de *Asturiana de la Montaña* (AM). Detalles como en figura 1.

*Figure 2. Catalase activity ordinates as µmols $H_2O_2$/mg proteina*min along maturation period (CAT) at 4ºC measured at the same ageing points as explained in figure 1, being: A) double-muscled AV; B)+/+ AV; C)+/+ animals from* Asturiana de la Montaña *(AM) breed. Details as figure 1.*

Glutatión reductasa

Esta actividad antioxidante es muy baja respecto al resto de los enzimas antioxidantes estudiados y, se muestra mantenida a lo largo de los tiempos de maduración seleccionados en todas las categorías estudiadas (fig. 3A, B y C).

Dicha actividad es significativamente más elevada a los 7 días de maduración en los animales (+/+) AV (tabla 1) versus (*mh/mh)*

(p<0,05) y (+/+) AM (p<0,05). En cambio, a los 14 días de maduración, la carne de los terneros (+/+) de las dos razas, AV y AM, presentan valores significativamente más altos (p<0,05) que los terneros (*mh/mh)*.

Peroxidación lipídica

Animales (*mh/mh)* de la raza AV muestran un aumento significativo (p<0,05) de la peroxidación lipídica a partir de los 7 días de maduración (fig. 4A). Sin embargo, el daño observado en los lípidos se muestra mantenido a lo largo de los 21 días de maduración en los animales normales (+/+) de la raza AV (fig. 4B) y presentó en general los valores más altos en la raza AM, con una disminución significativa (p<0,05) entre los 14 y los 21 días *post mortem* (fig. 4C).

En cuanto a la comparación entre categorías, hubo diferencias significativas a los 7 (p<0,001), 14 (p<0,5) y 21 (p<0,001) días de maduración, siendo en general menores los valores de LPO en los terneros (+/+) AV (tabla 1).

Tabla 1. Efecto del genotipo sobre la actividad de los enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GR) y el daño oxidativo en lípidos (LPO) y su evolución a lo largo de la maduración. Siendo (*) p<0,5; (**) p<0,05; (***) p<0,001

*Table 1. Effect of genotype on the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GR) and lipid peroxidation (LPO) and the evolution along ageing. Being (*) p<0,5; (**) p<0,05; (***) p<0,001*

| | | GENOTIPO | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Enzima | Tiempo (días) | AV (*mh/mh*) | AV (+/+) | AM(+/+) | Sign. |
| SOD | | | | | |
| | 3 d | 11,69 | | | |
| | 7 d | 13,73 a | 4,70 b | 8,43 c | *** |
| | 14 d | 22,78 a | 17,49 b | 8,93 c | *** |
| | 21 d | | 16,98 | 7,49 | *** |
| | Sign. | ** | *** | NS | |
| CAT | | | | | |
| | 3 d | 1,69 | | | |
| | 7 d | 3,49 a | 4,05 a | 1,54 b | *** |
| | 14 d | 2,06 a | 5,20 b | 2,20 a | *** |
| | 21 d | | 3,67 | 2,89 | NS |
| | Sign. | *** | NS | NS | |
| GR | | | | | |
| | 3 d | 0,67 | | | |
| | 7 d | 0,54 a | 1,35 b | 0,76 a | ** |
| | 14 d | 0,72 a | 1,28 b | 1,32 b | * |
| | 21 d | | 1,27 | 0,96 | NS |
| | Sign. | NS | NS | * | |
| LPO | | | | | |
| | 3 d | 1,57 | | | |
| | 7 d | 4,89 a | 2,41 b | 4,93 a | *** |
| | 14 d | 4,41 ab | 3,21 a | 5,63 b | * |
| | 21 d | | 3,06 | 4,66 | *** |
| | Sign. | *** | NS | * | |

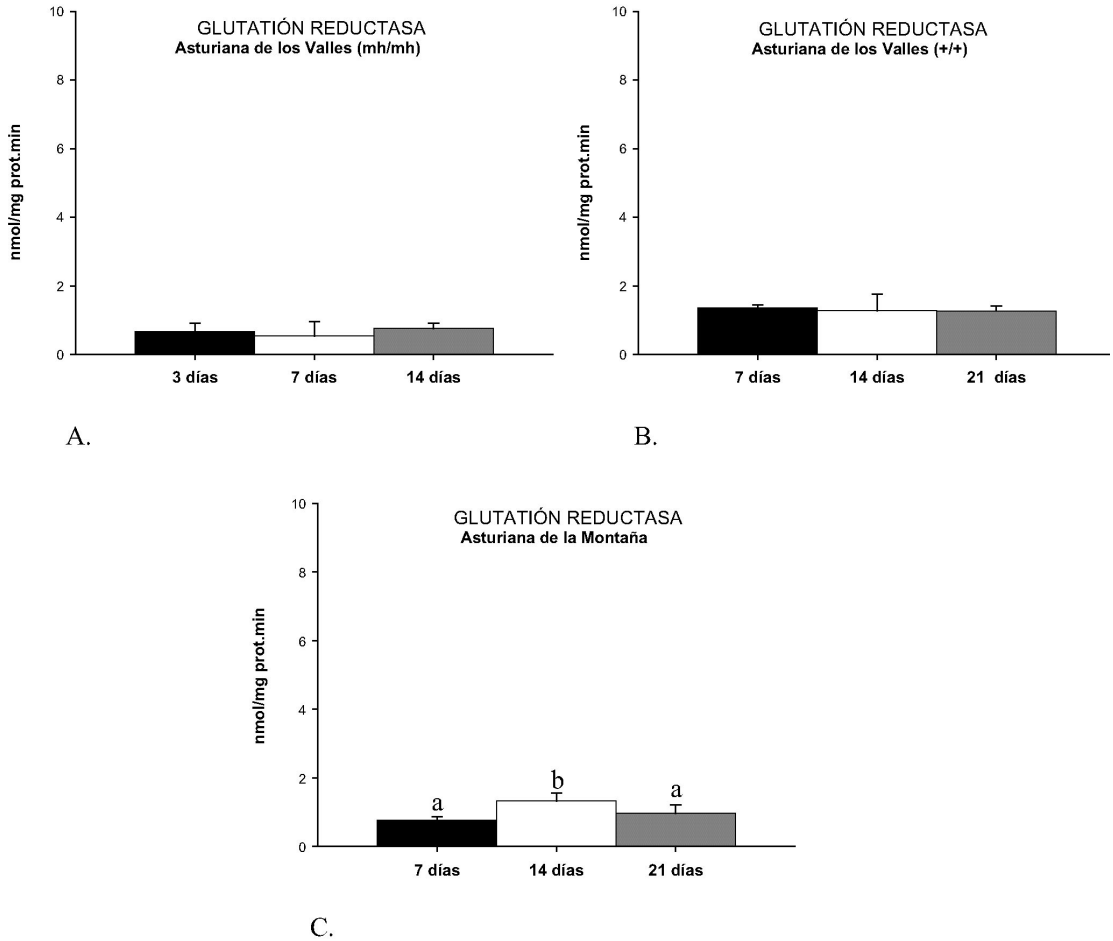



Figura 3. Actividad del enzima Glutatión Reductasa (GR) expresada como nmol/mg proteina*min a lo largo del periodo de maduración a 4 ºC, medida en los mismos tiempos de maduración que los utilizados para la figura 1, siendo: A)*mh/mh*, B)+/+ de AV y C) +/+ de *Asturiana de la Montaña* (AM). Detalles como en figura 1.

*Figure 3. Glutathione reductase activity (GR) ordinates as nmol/mg prot.*min along maturation period at 4ºC measured at the same ageing points as explained in figure 1, being: A) double-muscled AV; B)+/+ AV; C) +/+ animals from* Asturiana de la Montaña *(AM) breed. Details as figure 1.*

## Discusión

Los procesos oxidativos que tienen lugar en la carne desde su sacrificio y a lo largo de la maduración se han estudiado fundamentalmente en base a la acción del oxígeno molecular sobre los ácidos grasos insaturados; de forma que, por un mecanismo de radicales libres y rindiendo productos complejos que influyen notablemente sobre la calidad del aroma y el flavor se puede llegar a afectar incluso la vida útil del producto. Pero los

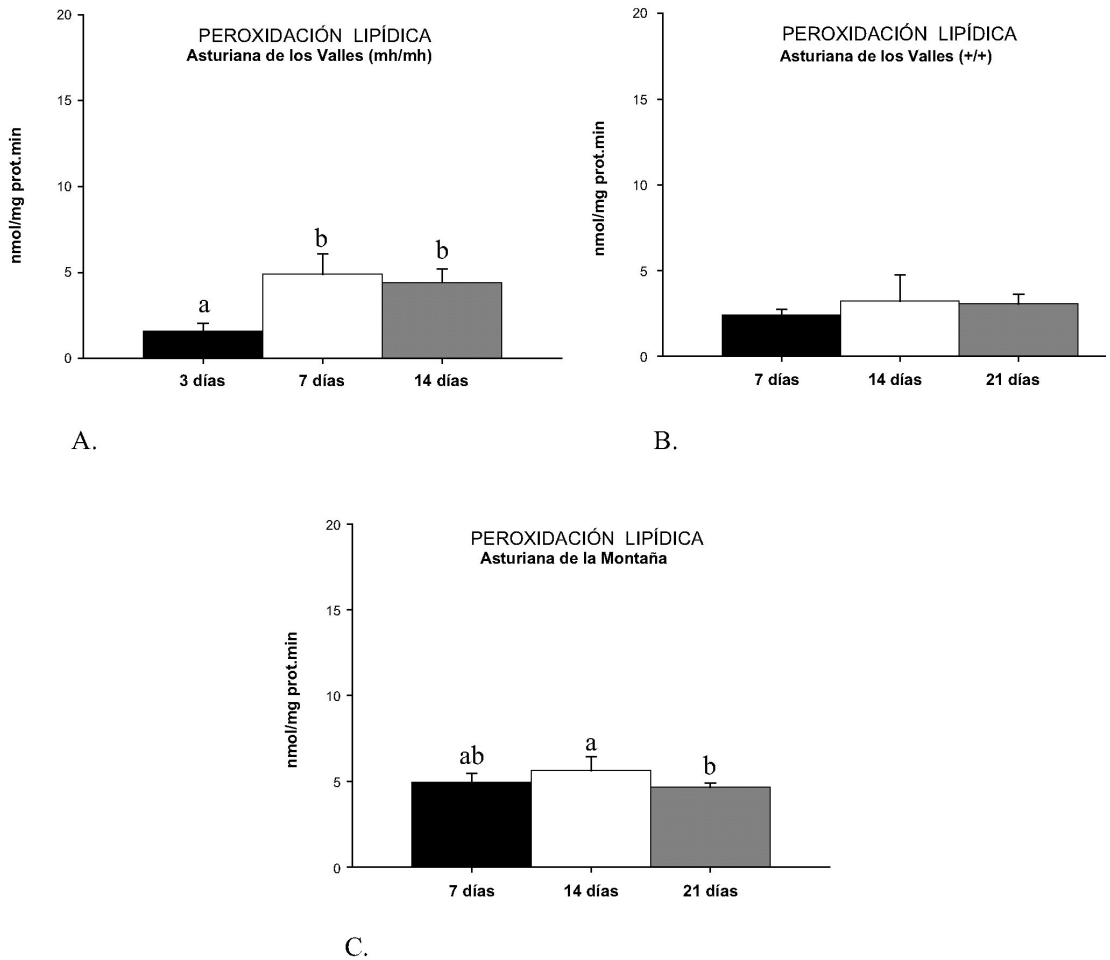



Figura 4. Lipoperoxidación (LPO) expresada como nmol de productos de peroxidación (malonaldehidos + 4-hidroxialquenos) a lo largo del periodo de maduración a 4 ºC medida en los mismos tiempos de maduración que los utilizados para la figura 1, siendo: A)*mh/mh,* B)+/+ de AV y C) +/+ de *Asturiana de la Montaña* (AM). Detalles como en figura 1.

*Figure 4. Lipid peroxidation (LPO) along maturation period at 4 ºC measured at the same ageing points as explained in the figure 1, being: A) double-muscled AV; B)+/+ AV; C) +/+ animals from* Asturiana de la Montaña *(AM) breed. Ordinates as nmol of peroxidation products (malonealdehyde + 4-hydroxyalkenal). Details as figure 1.*

efectos deletéreos de los radicales libres pueden ir mucho más allá, dañando por la acción de los radicales libres también proteínas, entre las que se pueden encontrar los enzimas proteolíticos. Desde este punto de vista, la protección que los enzimas antioxidantes realizan sobre el tejido, impidiendo el daño de los radicales libres a gran número de biomoléculas, tanto lípidos como proteínas, desempeña un papel esencial en el proceso de maduración, en tanto en cuanto, su protección de los enzimas

proteolíticos permite que éstos sigan actuando a lo largo de la maduración y la terneza final del producto se alcance en el tiempo deseado. De ahí que, en definitiva, se admita que los enzimas antioxidantes realizan una labor sinérgica con los enzimas proteolíticos en la evolución del proceso de tenderización y en el nivel de tenderización final.

Trabajos llevados a cabo recientemente por nuestro grupo de investigación sobre el estado de los enzimas antioxidantes durante las primeras 24 horas *post-mortem* del periodo de oreo (cada seis horas) (Coto-Montes *et al.,* 2004), mostraron que la SOD y la CAT eran los principales enzimas antioxidantes activos en la carne en las primeras horas después de sacrificado el animal, con una alta correlación en sus patrones de actuación. Los resultados obtenidos en este estudio se complementan perfectamente con ellos. Así, CAT reflejó una clara estabilidad, principalmente en la raza AV, incrementándose paulatinamente su actividad desde los 3 a los 14 días de maduración a 4 ºC. Dicha actividad sin embargo, tuvo un incremento más tardío en la raza AM. En el caso de la SOD, también hubo un incremento significativo de actividad en animales de la raza AV (*mh/mh* y +/+) durante la maduración y un incremento más tardío en la raza AM, con valores todavía bajos a los 21 días. Sin embargo, característicamente los niveles de actividad de este enzima fueron más elevados en los animales (*mh/mh)* incluso tras los tres primeros días de maduración. Sólo la GR mostró una mínima actividad sin variaciones importantes entre los distintos puntos de maduración, lo cual coincide nuevamente con lo observado en canales durante el periodo de oreo (Coto-Montes *et al.*, 2004), por lo que parece que el tándem SOD-CAT es el principal después del sacrificio del animal.

CAT es un enzima antioxidante que se caracteriza por su baja afinidad por sustrato, lo que motiva que su actuación se limite a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, en presencia de las cuales su papel detoxificante es muy superior que el de la glutatión peroxidasa (Costarides *et al.*, 1991). En una situación como la estudiada, en la que la oxidación de la oximioglobina ($Fe^{2+}$) a metamioglobina ($Fe^{3+}$) es un proceso continúo que se ve incrementado por la concentración de sales (Satoh y Shikama, 1981), la oxidación de pigmentos es un proceso inevitable durante la maduración de la carne siendo además, una fuente adicional de peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) (Rosset y Roussel-Ciquard, 1978), lo cual apoya la activación de la CAT en contra de la GR, el cual es un enzima muy susceptible a la oxidación ante un alto nivel de estrés oxidativo (Pigeolet *et al.*, 1990).

En otros tipos de músculos se ha observado también elevada la actividad SOD (Renerre *et al.*, 1996), lo que parece indicar que este enzima se mantiene estable durante periodos largos en estado *post mortem.* 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, CAT mostró un efecto similar al descrito para SOD (Pradhan *et al.*, 2000), comprobándose que este enzima es capaz de mantener una actividad basal tanto en *Longissimus dorsi* de vacuno como en otros músculos y animales.

La estabilidad de los enzimas antioxidantes durante la maduración y bajo condiciones de refrigeración ya ha sido descrita anteriormente en cerdo y pollo (Renerre *et al.*, 1996; Pradhan *et al.*, 2000). Esta estabilidad, en los animales estudiados, se ha manifestado siguiendo patrones distintos. Así, mientras que tanto (*mh/mh)* como (+/+) pertenecientes a la raza AV siguen patrones similares de

actuación para todos los enzimas estudiados, animales (+/+) de la raza AM siguen un patrón totalmente distinto. Además, el patrón que muestra la carne de terneros (*mh/mh)* tanto en SOD, como en CAT y GR es el mismo que el de los terneros (+/+) aunque presentando evoluciones más tempranas en las actividades enzimáticas.

Estos datos se correlacionan perfectamente con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Oliván *et al.,* 2004b) en el estudio de la actividad de catepsinas, en animales pertenecientes a las mismas categorías, que mostraron cómo el patrón de actuación de estas enzimas lisosomales se encontraba avanzado en el tiempo en la carne de los terneros (*mh/mh)* con respecto a los (+/+). En este estudio se observó que el patrón de actuación se mantenía en todos los animales aunque se ralentizaba en el tiempo dependiendo de la categoría que se tratase, siendo los más rápidos los (*mh/mh)* y los más retrasados los animales (+/+) procedentes de la raza AM. Basándonos en estos resultados previos y teniendo en cuenta los resultados obtenidos para antioxidantes, puede ser que la ausencia de patrón de actuación de los enzimas SOD y GR junto con la baja actividad obtenida para todos en AM, sea debido a que los puntos tomados no fueron lo suficientemente avanzados en el tiempo y no debido a una pérdida de estabilidad enzimática.

Al mismo tiempo corrobora los resultados obtenidos por otros autores (Campo *et al.*, 1999, 2000; Oliván *et al.*, 2003) que indicaban que la tenderización se producía más rápido en la carne de terneros (*mh/mh)* que en animales (+/+), probablemente debido a un descenso más rápido del pH que se observa en las canales de los primeros después del sacrificio, lo cual acelera la actuación de los enzimas acídicos lisosomales (Oliván *et al.*, 2004b).

La alta estabilidad oxidativa de los músculos glicolíticos, como es el *Longissimus dorsi* utilizado en el presente trabajo, es debido a su bajo contenido en grasa intramuscular (Alasnier *et al.*, 1996) tanto saturada (acumulada en adipocitos) como insaturada (fosfolípidos de membranas celulares). El LD presenta un bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que son los más susceptibles de oxidación (Wilson *et al.*, 1976) presentando al contrario un mayor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y más grasa saturada (Muriel *et al.*, 2002) por lo tanto su velocidad de oxidación es menor en comparación con los músculos oxidativos que presentan una mayor cantidad de fosfolípidos, los más abundantes en PUFA (Gray y Pearson, 1987).

La oxidación lipídica es uno de los factores más limitantes en la vida media de la carne durante su maduración, junto con la pérdida de agua y la inestabilidad de la mioglobina (Insausti *et al.*, 2001) por ello en este trabajo se aborda el estudio de su evolución en los tiempos de maduración seleccionados, en ambas razas bovinas (AV y AM). Los datos obtenidos reflejan una estabilidad temporal del nivel de daño oxidativo en lípidos en la carne de los terneros (+/+) AV, mientras que la de los animales (*mh/mh)* mostró un incremento significativo de la peroxidación lipídica a partir de los 7 días de maduración alcanzando así el mismo nivel de daño encontrado en la raza AM al mismo tiempo de maduración. Este incremento observado en los (*mh/mh)* parece ser consecuencia de que los animales de esta categoría aunque presentan un bajo porcentaje de grasa intramuscular (1-2%), su nivel de insaturación es mayor (Aldai *et al.,* 2006), probablemente debido a ello su velocidad de oxidación fue mayor a tiempos tempranos de maduración. Por el contrario, los animales (+/+) de las razas AV y AM muestran el menor nivel de daño oxidativo a lípidos, lo cual puede estar relacionado con un mayor

porcentaje de grasa intramuscular y una menor relación P/S (poliinsaturados/saturados) (Aldai *et al.,* 2006) además de un proceso de tenderización más lento (Oliván *et al.,* 2004b).

El proceso de peroxidación lipídica por su propagación de forma exponencial a lo largo del tejido es uno de los más dañinos, pues se forman radicales peróxidos lo suficientemente tóxicos como para reaccionar con los PUFA más cercanos de forma espontánea (Meneghini y Martins, 1993). Se ha visto que el inicio de la peroxidación lipídica se ve favorecido antes del sacrificio del animal y durante las primeras fases de almacenamiento del músculo, durante las cuales tendrá lugar su transformación en carne (Morrysey *et al.,*1994) por ello el nivel de daño lipídico encontrado en trabajos anteriores, durante el oreo en animales (*mh/mh)* ha sido elevado (Coto-Montes *et al.*, 2004). La última fase de la peroxidación lipídica y parece ser que una de las más importantes tiene lugar durante la manipulación, procesamiento, almacenaje y cocinado de la carne (Morrisey *et al.,* 1994), por lo que se esperaría, probablemente, un aumento de lípidos oxidados durante este periodo con respecto al que hemos observado durante el proceso de maduración a 4 ºC.

En conclusión, el presente trabajo revela que la actividad de los enzimas antioxidantes, fundamentalmente SOD y CAT en condiciones de refrigeración (4 ºC), se mantienen a lo largo del tiempo con un patrón de actuación estable que se inicia prematuramente en la carne de los terneros (*mh/mh)* de la raza AV, pero que no se pone de manifiesto durante el tiempo que dura el estudio en animales (+/+) de raza AM. Este dato es uno más que apoya que los procesos enzimáticos relacionados con la tenderización se llevan a cabo más rápidamente en animales (*mh/mh)* que en animales (+/+) y nuestros datos indican que los enzimas antioxidantes colaboran en este proceso de tenderización de forma activa. Respecto a la peroxidación lipídica, en el periodo estudiado, ésta aún no alcanza valores lo suficientemente altos como para que influya de forma determinante en las características organolépticas como el sabor y olor sobre las cuales ejerce una presión importante a altos niveles. Sin embargo, es necesario profundizar más en el papel de los enzimas antioxidantes sobre la obtención de la terneza óptima de la carne, estudiando diferentes músculos y animales procedentes de distintos sistemas de producción. Esto podría darnos información adicional de la influencia de la defensa enzimática antioxidante sobre la actividad proteolítica durante la tenderización.

**Agradecimientos**

Agradecemos al personal del Área de Sistemas de Producción Animal del SERIDA su participación en el manejo de animales y canales.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una financiación procedente del INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) CAL 03-074-C2 y del FIS (Fondo de Investigación Sanitaria) RED FIS-G03/137. La Dra. Ana Coto Montes es investigadora contratada del programa "Ramón y Cajal" del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Cristina Tomás Zapico agradece a la "Secretaría de Estado de Educación y Universidades" su beca predoctoral F.P.U. Beatriz Caballero García agradece a FICYT (Fundación para el fomento en Asturias de la Investigación Científico Aplicada y la Tecnología) su beca predoctoral. Ignacio Vega Naredo agradece a la Universidad de Oviedo su beca predoctoral.

## Bibliografía

Alasnier C, Rémignon H, Gandemer G, 1996. Lipid characteristics associated with oxidative and glycolytic fibres in rabbit muscles. Meat Sci. 43: 213-224.

Aldai N, Murray BE, Oliván M, Martínez A, Troy DJ, Osoro K, Nájera AI, 2006. The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physico-chemical characteristics and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. Meat Sci., 72: 486-495.

Arthur PF, 1995. Double muscling in cattle: a review. Aust J Agr Res 46: 1493-1515.

Boccard R, 1982. Relationship between muscle hypertrophy and the composition of skeletal muscles, pp 148-162 En. JWB King, F Ménissier (Ed) Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. The Hague, The Neatherlands: Martinus Nijhoff.

Bouton PE, Harris PV, Shorthose WR, 1982. Comparison of some properties of beef from animals homozygous or heterozygous for muscular hypertrophy. Meat Sci. 6: 309-318.

Bradford NM, 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 MM, Sañudo C, Panea B, Alberti P, Santolaria P, 1999. Breed type and ageing time effects on sensory characteristics of beef strip loins steaks. Meat Sci. 51: 383-390.

Campo MM, Santolaria, P, Sañudo C, Lepetit J, Olleta JL, Panea B, Alberti P, 2000. Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices. Meat Sci. 55: 371-378.

Costarides AP, Riley MV, Green K, 1991. Roles of catalase and the glutathione redox cycle in the regulation of anterior-chamber hydrogen peroxide. Ophthalmic Res. 23: 284-294.

Coto-Montes A, Caballero B, Sierra V, Vega-Naredo I, Tomás-Zapico C, Hardeland R, Tolivia D, Ureña F, Rodríguez-Colunga MJ, 2004. Actividad de los principales enzimas antioxidantes durante el periodo de oreo de culones de la raza Asturiana de los Valles. ITEA. 100A: 43-55.

Donnelly JK, Robinson DS, 1995. Free Radicals in foods. Free Radical Res. 22: 147-176.

Gray JI, Pearson AM, 1987. Rancidity and warmed-over flavor. pp. 221-260 En: AM Pearson, TR Dutson (Ed) Advances in Meat Research Vol. 3, Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY.

Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M, 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. Nat. Genet. 17: 71-74.

Hernandez P, Park D, Rhee KS, 2002. Chloride salt type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in pork. Meat Sci. 61: 405-410.

Insausti K, Beriain MJ, Purroy A, Alberti P, Gorraiz C, Alzueta MJ, 2001. Shelf live of beef from local spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. Meat Sci. 57: 273-281.

Jiang ST, 1998. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B. 22.: 97-107.

Kum-Tatt L, Tan IK, Seet AM, 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.

Lubinsky S, Bewley GC, 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 91: 723-742.

Martin JPJr, Daily M, Sugarman E, 1987. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. Arch. Biochem. and Biophys. 255: 329-336.

Meneghinni R, Martins EL, 1993. Hydrogen peroxide and DNA damage., pp 83-93. En B Halli-

well, OI Aruoma (Ed). DNA and free radicals. Harwood, London.

Morrisey PA, Buckley DJ, Sheehy PJA, Monahan FJ, 1994. Vitamin E and meat quality. Proc. Nutr. Soc. 53: 289-295.

Muriel E, Antequera T, Ruiz J, 2002. Efecto del tipo de músculo sobre parámetros de calidad en carne fresca de cerdo ibérico. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 3: 241-247.

Oliván M, Osoro K, Martínez A, Guerrero L, 2003. Características físico-químicas y calidad sensorial de la carne de terneros añojos de las razas asturianas cebados en intensivo o extensivo. ITEA. Vol extra 24: 22-24.

Oliván M, Martínez A, Osoro K, Sañudo C, Panea B, Olleta JL, Campo MM, Oliver MM, Serra X, Gil M, Piedrafita J, 2004a. Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. Meat Sci. 68: 567-565.

Oliván M, Coto-Montes A, Caballero B, Sierra V, Aldai N, Rodríguez-Colunga MJ, Osoro K, 2004b. Meat tenderization by acidic lisosomal proteinases associated with genotype in beef. Proceedings of 50th ICoMST (International Congress of Meat Science and Technology), Helsinki, Finlandia.

Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J, 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mech. Ageing. Dev. 51: 283-297.

Pradhan AA, Rhee KS, Hernández 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 activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. Meat Sci. 43: 111-121.

Rosset R, Roussel-Ciquard N, 1978. Conditionnement de la viande fraiche. IAA. 357-369.

Satoh Y, Shikama K, 1981. Autoxidation of oxymyoglobin. A nucleophilic displacement mechanism. J. Biol. Chem. 256:10272-10275.

Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH, Kull FC, González-Cadavid N, 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280: E221-E228.

Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R, 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J. Biol. Chem. 275: 40235-40243.

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.

Wilson BR, Pearson AM, Shortland FB, 1976. Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over-flavor in red and white muscle from several species as mesured by thiobarbituric acid análisis. J. Agric. Food Chem. 24: 7-10.

(Aceptado para publicación el 26 de octubre de 2005)