

**Evolución *post-mortem* de
parámetros indicativos de calidad
en carne de vacuno: efecto de la
raza y el gen de la hipertrofia
muscular**



Verónica Sierra Sánchez
Tesis Doctoral, 2010





Universidad de Oviedo

Evolución post-mortem de parámetros indicativos de calidad en carne de vacuno:
efecto de la raza y el gen de la hipertrofia muscular

Verónica Sierra Sánchez

ISBN: 978-84-693-8858-7
Depósito Legal: AS.00971-2010

<http://www.tesisenred.net/TDR-1018110-131248>

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

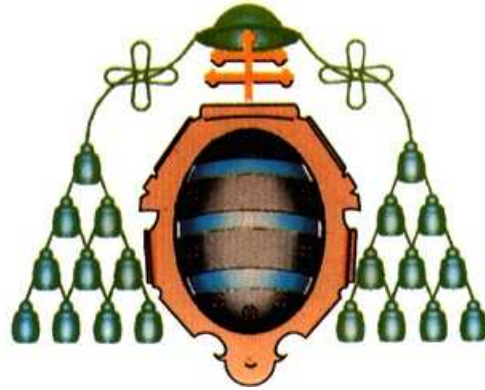
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Reservados todos los derechos
© El autor

Edita: Universidad de Oviedo,
Biblioteca Universitaria, 2010
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 75
ISBN: 978-84-693-8858-7
D.L.: AS.00971-2010

Universidad de Oviedo



Departamento de Morfología y Biología Celular

Evolución *post-mortem* de parámetros
indicativos de calidad en carne de
vacuno: efecto de la raza y el gen de la
hipertrofia muscular.

Verónica Sierra Sánchez
Tesis Doctoral, 2010



Evolución *post-mortem* de parámetros indicativos de calidad en carne de vacuno: efecto de la raza y el gen de la hipertrofia muscular.

Tesis realizada en el Departamento de Morfología y Biología Celular
de la Universidad de Oviedo y en el Área de Sistemas de Producción
Animal del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo
Agroalimentario (SERIDA)

Directoras:

Dra. Ana María Coto Montes

Profesora titular

Departamento de Morfología y Biología Celular

Facultad de Medicina

Universidad de Oviedo

Dra. María del Carmen Oliván García

Investigadora

Área de Sistemas de Producción Animal

Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario.



AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Curso: 2009/2010

Datos personales:

Apellidos: SIERRA SANCHEZ
D.N.I. 71642943J

Nombre: VERONICA

Datos Académicos:

Programa de Doctorado cursado: Biología funcional y molecular (interdepartamental)

Departamento responsable: BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

Departamento en el que presenta la tesis doctoral: MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR

Título definitivo de la Tesis: EVOLUCIÓN POST-MORTEM DE PARÁMETROS INDICATIVOS DE CALIDAD EN CARNE DE VACUNO: EFECTO DE LA RAZA Y EL GEN DE LA HIPERTROFIA MUSCULAR.

Autorización del director/es de la tesis

D/D^a: OLIVAN GARCIA, MARIA DEL CARMEN

Universidad: ORGANISMOS O ENTIDADES PRIVADAS

D/D^a: COTO MONTES, ANA MARIA

Departamento: MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR

Autoriza la presentación de la tesis doctoral en cumplimiento de lo establecido en el *Art. 35.1a* de la "Modificación del Reglamento del tercer ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de doctor y otros cursos de postgrado", aprobada por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 23 de octubre de 2008 (BOPA del 19 de diciembre de 2008).

Oviedo, 22 de junio de 2010

Director de la Tesis

Fdo: OLIVAN GARCIA, MARIA DEL CARMEN

Director de la Tesis

Fdo: COTO MONTES, ANA MARIA

SR. DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR

FOR-OFE-VCE-021



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Ordenación Académica y Nuevas Titulaciones

AUTORIZACIÓN PARA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Datos del alumno:

Apellidos: SIERRA SANCHEZ
DNI: 71642943J

Curso: 2009/2010

Nombre: VERONICA

Datos Académicos:

Programa de Doctorado cursado: Biología funcional y molecular (interdepartamental)

Departamento responsable: BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

Departamento en que presenta la tesis doctoral: MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR

Título definitivo de la Tesis: EVOLUCIÓN POST-MORTEM DE PARÁMETROS INDICATIVOS DE CALIDAD EN CARNE DE VACUNO: EFECTO DE LA RAZA Y EL GEN DE LA HIPERTROFIA MUSCULAR.

FOR-OFE-VCE-024

Autorización del director/es de la tesis

D/D^a: MARIA DEL CARMEN OLIVAN GARCIA
Universidad: ORGANISMOS O ENTIDADES PRIVADAS
D/D^a: ANA MARIA COTO MONTES
Departamento: MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR

Resolución

El Departamento MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR en su reunión de fecha 22 de Junio de 2010, acordó **dar su conformidad para** la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, en cumplimiento de lo establecido 35.2 de la "Modificación del Reglamento del tercer ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de doctor y otros cursos de postgrado", aprobada por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 23 de octubre de 2008 (BOPA del 19 de diciembre de 2008).

Asimismo el director/directores de la tesis doctoral, cumplen con el requisito establecido en el artículo 2 de la "Modificación del Reglamento del tercer ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de doctor y otros cursos de postgrado", aprobada por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 23 de octubre de 2008 (BOPA del 19 de diciembre de 2008).

Oviedo, 22 de Junio de 2010



Fdo.: JOSÉ ANTONIO VEGA ÁLVAREZ

SR./SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Agradecimientos

Este trabajo es fruto del esfuerzo compartido de muchas personas a las que quiero dar las gracias en estas primeras líneas. He tenido la gran suerte de haber trabajado en dos grupos de investigación, siendo y sintiéndome parte de ambos, lo que habría sido imposible sin el esfuerzo de mis Directoras Ana y Mamen. Gracias por facilitarme tanto las cosas, por introducirme en el mundo de la ciencia, por permitirme hacer lo que más me gusta, gracias por todo vuestro tiempo, vuestra dedicación, paciencia y sobre todo el apoyo no sólo profesional sino también personal.

Comencé en el Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo, que fue “mi segunda casa” durante los primeros años de esta Tesis, y quiero agradecer a Ana, por confiar en mí, por enseñarme, por los ánimos y por ayudarme a diferenciar lo que es importante de lo que no. A Pepa (a la que considero mi tercera directora) por aquel ¿Cuándo empiezas? el primer día que pisé el laboratorio y toda la ayuda y el cariño que me ha dado desde entonces. A Delio, que en paz descanse, por sus clases de Histología y por su forma de explicar las cosas. Gracias a Cris, Bea y Nacho por los buenos ratos, por las sesiones de cine en el lab los viernes, por lo mucho que aprendo de vosotros y por vuestra amistad...no se si sabéis lo que os echo de menos. Al resto de compañeros que han ido pasando a lo largo de este tiempo, Diana, Covi, Clara, Ana..., y a los que forman ahora el grupo, David, Marina, Bea, Susana..., por vuestros ánimos y ayuda. A todo el personal del Departamento, que siempre me han tratado con mucho cariño, especialmente a Gloria y a Toli, que me han ayudado en todo lo que he necesitado y con las que he pasado muy buenos ratos.

Quiero dar las gracias a la Asociación Marie Curie, que me permitió disfrutar de un periodo de formación en Dublín. I am very gratefull to The Ashtown Food Centre staff and specially to Declan Troy and Anne Marie Mullen for accepting me as Marie Curie Training Site Fellowship and for their guidance and also I would like to thank Marzena, Karen, Aileen, Elaine, Viky, Niall, Gosia, Miquele and others for their friendship.

Los últimos años de esta Tesis los he realizado en el SERIDA y quiero agradecer especialmente a Mamen todo su esfuerzo para que me adaptara, por su paciencia infinita, por su forma de hacer las cosas, su disponibilidad absoluta y todo lo que me has enseñado. A Koldo por permitirme formar parte del grupo, por disponer los medios necesarios para la realización del trabajo y por sus oportunas correcciones. A Pepa, María y Vero (y algún que otro estudiante de prácticas) que me han ayudado con los experimentos, por su paciencia conmigo y mi forma de

trabajar. A ellas y el resto de compañeros que forman o han formado parte del grupo por su ayuda, consejos y buenos ratos: Rocío, Berta, Raquel, Noe, Rafa, Pedro, Miguel, Aitor, Bea y a los que no nombro pero han colaborado de alguna forma en esta Tesis con su trabajo tanto en las fincas como en el manejo de los animales en Villanueva, Grado e Illano. En general, quiero agradecer a todo el personal del SERIDA por participar en las sesiones de cata y por el cariño con el que me han tratado.

También me gustaría agradecer a otros científicos que de forma desinteresada me ayudaron en los distintos experimentos, como Boga, Luis Guerrero, Juan García Olmo, Ana Gutierrez, así como a grupos de investigación tanto de la Universidad de Oviedo (Departamentos de Fisiología, Farmacología y Bioquímica) como del SERIDA (Área de Nutrición, Pastos y Forrajes, Programas de Mejora Genética y Patología Vegetal) que me permitieron utilizar los equipamientos necesarios para el desarrollo de los mismos.

Quiero agradecer a mis amigos, Dani, Raquel, Sonia, Ales, Edu, Nico... que siempre están ahí y especialmente a Esther, por todo su apoyo, siento mucho haberos descuidado tanto estos últimos meses.

Esta Tesis no estaría terminada sin la ayuda de toda la familia especialmente la de mis padres, gracias por tantos sacrificios por nosotros, por enseñarme lo importante que es intentar hacer las cosas bien, por financiar gran parte de este “capricho”, pero sobre todo por cómo habeis cuidado a María, supliendo mis ausencias con creces. Gracias a los Barrio por sus ánimos y apoyo. A mis hermanos y sus respectivos, Isma y Silvia, que me ha contagiado su entusiasmo por la Ciencia, y María y Dani, que siempre están al pie del cañón, incluso con la maquetación de esta Tesis. Pero sobre todo a mi pequeña María por darme fuerzas y cambiar mi orden de prioridades y a Pablo por respetar pacientemente todas mis decisiones, por todos los sacrificios que esta Tesis ha significado para nosotros y por quererme así como soy.

Quiero dar gracias a Dios por poner a todas estas personas en mi vida y por su amor infinito.

Así mismo, quiero agradecer al Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo y al Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agrolimentario (SERIDA) del Principado de Asturias por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo. Agradezco al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), del Ministerio de Ciencia e Innovación, la financiación de este trabajo mediante la concesión de la beca Predoctoral (2005/2009) y de los proyectos de investigación CAL03-074-C2 y RTA2007-00087-C02-01.

Resumen

La calidad de la carne y en concreto la terneza, que es el parámetro más importante para el consumidor, puede verse afectada por numerosos factores, por lo que conseguir un mayor grado de homogeneidad en los productos, es una de las mayores preocupaciones de la industria cárnica. Esto requiere un estudio de las características de cada producto y de los procesos que afectan a la calidad y a la tenderización de la carne.

Asturias es una región que se distingue por la producción de carne de calidad, amparada por la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Ternera Asturiana”, que engloba distintos productos de las razas autóctonas “Asturiana de los Valles” (AV) y “Asturiana de la Montaña” (AM) y sus cruces. La raza AV presenta diferentes genotipos dependiendo de la presencia de una mutación en el gen de la miostatina que produce hipertrofia muscular, generando diferencias en los parámetros productivos y en la calidad de los distintos productos amparados por la IGP.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivos estudiar la evolución *post-mortem* de parámetros indicativos de calidad en la carne de vacuno de machos añojos de las razas AV y AM, así como desarrollar herramientas analíticas que permitan una predicción “on-line” de la calidad de los productos.

Como la terneza final depende del grado de alteración de la estructura muscular, se estudiaron los principales sistemas proteolíticos del músculo, encontrándose un papel relevante de las catepsinas y las calpaínas en el proceso de tenderización de la carne. Además, la evolución *post-mortem* de estos sistemas enzimáticos mostró paralelismo con las diferencias de dureza instrumental observadas, y con la evolución de los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas, siendo significativamente más rápidos todos estos procesos en la carne de los biotipos con presencia de la mutación en el gen de la miostatina (*mb/mb* y *mb/+*). Parece por tanto que la hipertrofia muscular adelanta en el tiempo el proceso de tenderización, probablemente debido a que promueve un metabolismo más glicolítico, que a su vez parece ir

ligado a un agotamiento más temprano de los sistemas proteolíticos, de modo que estos procesos también terminan antes, ya que el aumento del tiempo de maduración reduce las diferencias entre genotipos.

Otros parámetros de calidad de la carne tales como el pH, la capacidad de retención de agua, la composición química o el color mostraron diferencias entre los distintos biotipos estudiados, haciendo que la percepción de los principales atributos sensoriales permita distinguir dos tipos de productos. Por un lado, carne que muestra valores altos de aceptabilidad a tiempos de maduración intermedios (entre los 7 y los 14 días *post-mortem*), caracterizada por altas pérdidas de jugo, mayor luminosidad y menor engrasamiento intramuscular y que coincide con la carne de los biotipos con hipertrofia muscular (*mh/mh* y *mh/+*) de la raza AV, y por otro lado carne de los biotipos sin presencia de hipertrofia muscular (*+/+*) de las razas AV y AM y su cruce (AVxAM) que muestra mayor contenido graso, mayor nivel de pigmentos hemínicos y procesos de tenderización más lentos, requiriendo tiempos de maduración más largos para alcanzar su óptimo de maduración.

También se analizó la evolución del perfil electroforético de la fracción miofibrilar y sarcoplásmica del músculo, con el fin de identificar cambios relacionados con el proceso de maduración *post-mortem* de la carne y poder determinar la presencia de biomarcadores de calidad. Se encontraron correlaciones significativas entre fragmentos miofibrilares de troponina T y troponina I con algunos enzimas metabólicos, como la creatina kinasa y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, observándose que dichos cambios ocurren paralelos a la actividad de las micro-calpaínas y se correlacionan significativamente con la dureza instrumental. La determinación de estos biomarcadores parece servir para indicar el estadio de maduración e incluso permitir clasificar los productos según la tasa de tenderización.

Debido a las desventajas (complejidad, alto coste...) de los métodos analíticos precisos para determinar los parámetros de calidad indicados, se hace necesario desarrollar herramientas que permitan un análisis rápido y fiable de la calidad de la carne, así como la caracterización “on-line” de los productos. Por ese motivo, se analizó la capacidad de la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS) para la predicción de parámetros de calidad en los productos, tales como la composición química y el perfil de ácidos grasos en la carne, consiguiéndose predicciones adecuadas para la determinación del contenido en humedad, grasa, proteína, mioglobina y la proporción de ácidos grasos saturados, ramificados y monoinsaturados. Por todo

ello se propone este método como herramienta fácil y rápida para determinar la calidad de los productos en la industria.

Por último, a partir de la información obtenida y como línea de investigación a desarrollar en el futuro, se proponen nuevas estrategias para la comprensión del proceso de conversión del músculo en carne, a través del estudio de los procesos de muerte celular que tienen lugar en las primeras horas tras el sacrificio del animal (período *pre-rigor*) y cuyos mecanismos biológicos pueden tener gran influencia sobre la evolución de la tenderización de la carne y sobre la calidad final del producto, pudiendo proporcionar marcadores tempranos de calidad.

Summary

Meat quality, in special meat tenderness, which is the most important trait for consumers, is affected by a wide range of factors; therefore increasing meat quality homogeneity is one of the major concerns for meat industry. This requires a deep study of every product and processes affecting meat quality and tenderization.

Beef production in Asturias is distinguished by a quality labell, the Protected Geographical Indication (PGI) “Ternera Asturiana”, which includes meat from two local breeds “Asturiana de los Valles” (AV) and “Asturiana de la Montaña” (AM), as well as their crossbreed. AV breed shows three different genotypes depending on the presence of the mutation in the myostatin gene which produces muscular hipertrophy and generates quality differences between the different meat products protected by the PGI.

The aim of the present Doctoral Thesis was to study the *post-mortem* evolution of different quality traits in beef from yearling bulls from AV and AM breeds and also to develop analytical tools that allow “on-line” prediction of meat quality parameters.

Due to the fact that final meat tenderness mainly depends on the degree of destructuration of the muscle structure, the main proteolytic systems in muscle were studied, finding a relevant role of cathepsins and calpains in the meat tenderization process. Moreover, their *post-mortem* evolution paralelled meat instrumental toughness and the occurrence of changes in the electrophoretic pattern of miofibrillar and sarcoplasmic proteins, occurring all those changes faster in meat from biotypes with presence of myostatine mutation (*mb/mb* and *mb/+*). It seems therefore, that muscle hypertrophy brings forward in time the tenderization process, probably due to the more glycolitic metabolism of muscle in *mb*-biotypes, but promotes an earlier exhaustion of the proteolytic systems, so that the differences among biotypes diminished along ageing.

Other meat quality traits such as pH, water holding capacity, chemical composition or colour showed differences between the different biotypes studied, thus influencing meat quality

perception and discriminating two main types of products. On the one hand, meat from mh-biotypes (*mh/mh* y *mh/+*) from AV breed, showing high acceptability scores at intermediate maturation times (7 to 14 days *post-mortem*) characterized by higher drip loss, higher lightness and lower intramuscular fat content, and on the other hand, meat from biotypes without muscular hypertrophy (+/+) from AV and AM breeds and their cross-breed (AVxAM) showing higher intramuscular fat and heminic pigments content and slower tenderization process, thus requiring longer ageing times to reach their optimum quality.

The evolution of the electrophoretic pattern of miofibrillar and sarcoplasmic proteins was also analyzed in order to identify changes related with meat ageing processes that could be useful as quality biomarkers. Positive significant correlations were found between miofibrillar fragments of troponin T and troponin I with some metabolic enzymes such as creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, showing parallelisms with the activity of μ -calpains and significant correlations with meat instrumental toughness. Determination of these biomarkers in cellular extracts could be useful to indicate the meat maturation state and also to discriminate meat products according to the tenderization rate.

Due to disadvantages (complexity, high cost...) of conventional analytical methods to determine meat quality parameters, it is necessary to develop sensitive, fast and non destructive techniques that allow “on-line” characterization of meat products. The potential of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) to predict meat quality traits, such as the chemical composition and the fatty acid profile, was analysed, obtaining good calibration equations for the quantitative prediction of moisture, fat, protein, myoglobin and the proportion of saturated, branched and monounsaturated fatty acids. Thus, this method is proposed as an easy, fast and promising tool for “on-line” control of meat quality in the industry.

Finally, from the information here obtained and as future research trends, new research strategies are proposed in order to understand the process of conversion of muscle into meat through the study of Cell Death Processes that occur in the first hours after animal slaughter (pre-rigor phase) and whose biological mechanisms may greatly influence meat tenderization and final meat quality acquisition and could provide to meat scientist early meat quality markers.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES GENERALES.....	3
1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR CÁRNICO EN ASTURIAS.	4
1.2 CALIDAD DE LA CARNE: PARÁMETROS INDICATIVOS.....	8
1.3 FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA CARNE.	14
1.3.1 Factores ante-mortem: raza, hipertrofia muscular, sexo, edad, alimentación.	14
1.3.2 Factores peri-mortem: transporte, manejo y estrés al sacrificio.....	21
1.3.3 Factores post-mortem: enfriamiento, envasado, tiempo de maduración.....	23
1.4 TRANSFORMACIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE.....	24
1.4.1 Mecanismos moleculares y bioquímicos que participan en la transformación del músculo en carne.	26
1.4.2 Principales sistemas proteolíticos implicados en la tenderización.....	28
1.4.3 Principales cambios post-mortem en la arquitectura del músculo.	37
1.4.4 Desarrollo de métodos on-line para el control y trazabilidad de los productos: Aplicación de la tecnología NIRS.	40
OBJETIVOS.....	45
1. OBJETIVOS.	47
2. PUBLICACIONES GENERADAS.....	48
PUBLICACIONES	49
ARTÍCULO 1	51
<i>Activity of cathepsins during beef aging related to mutations in the myostatin gene.....</i>	<i>51</i>
ARTÍCULO 2	61
<i>Post-mortem evolution of calpains and proteolytic profiles in meat from different biotypes showing distinct tenderization rate</i>	<i>61</i>
ARTÍCULO 3	99
<i>Eating quality of beef from biotypes included in the PGI “Ternera Asturiana” showing distinct physicochemical characteristics and tenderization pattern.</i>	<i>99</i>
ARTÍCULO 4.....	111
<i>Prediction of the fatty acid composition of beef by near infrared transmittance spectroscopy.....</i>	<i>111</i>
ARTÍCULO 5.....	121
<i>Cell Death Processes and Markers: A Novel Approach to Deal with Meat Quality.....</i>	<i>121</i>
DISCUSIÓN	161
CONCLUSIONES.....	177
REFERENCIAS	181

Introducción

1. Antecedentes generales.

El sector ganadero representa el 40% del producto interior bruto (PIB) agrícola mundial, genera empleo para 1.300 millones de personas, medios de subsistencia para 1.000 millones de pobres en todo el mundo y utiliza el 70% de la superficie agrícola mundial, es decir, el 30% de la superficie terrestre (Steinfeld y cols., 2006). Además, atendiendo a su ritmo de crecimiento, en las próximas décadas se convertirá en el sector agrícola más importante a nivel mundial en términos de valor añadido y uso de tierras.

Desde comienzos de los años 80, la producción, el consumo y el comercio mundiales de carne han aumentado considerablemente. Estos cambios se relacionan con el crecimiento de la población mundial, la urbanización y el incremento de los ingresos internos en los países en desarrollo, así como con los cambios en los patrones de consumo, detonantes de un incremento global de la demanda de alimentos de origen animal (Delgado y cols., 1999). Por todo esto, se estima que el consumo mundial de carne seguirá aumentando a un ritmo del 2 % al año hasta 2015. La mayor parte de este aumento se producirá en el mundo en vías de desarrollo, donde se prevé que el consumo crecerá un 2,7 por ciento al año, frente a un incremento del 0,6 por ciento al año en el mundo desarrollado (FAO, 2002).

La sucesión, en los últimos años, de crisis en los mercados de la carne debidas a la aparición de enfermedades y alertas sanitarias como las dioxinas, la peste porcina, la encefalopatía espongiforme bovina o la fiebre aftosa, han generado situaciones de alarma entre los consumidores y grandes alteraciones en la evolución normal de los precios y de la producción del sector ganadero, con consecuencias muy graves para sus productores. Al contrario de lo que ocurre a nivel mundial, en Europa el consumo de carne de vacuno ha ido disminuyendo, y las previsiones no son mejores, puesto que se prevé una disminución aún mayor a medio plazo de la producción (descenso del 4,8%) y del consumo (0,8%) de vacuno como consecuencia de la crisis económica, en favor de la producción de carne de porcino y aves de corral (Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Comisión Europea, 2009). Ante esta situación, y la creciente dependencia de carne de vacuno de importación, el desafío para la Unión Europea es el mantenimiento del tejido productivo en el medio rural y la producción de carne de calidad diferenciada que pueda hacer frente a la importación de carne de menor coste.

En los países desarrollados, los requerimientos de los consumidores se centran, cada vez más, en la confianza y seguridad que les reporta el producto que compran, además de exigir mejores cualidades organolépticas y una mayor garantía sanitaria. Una de las herramientas disponibles para cubrir esta demanda son las marcas de calidad. El Comité Económico y Social Europeo (2008) destaca una tendencia generalizada por parte de los consumidores a conceder importancia al origen de los productos, una característica que influye en la elección de compra. Del mismo modo, los consumidores parecen dispuestos a pagar más por la certificación de los productos con denominación de origen, considerados, por lo general, más seguros y de calidad superior, que tienen un sabor, textura y apariencia propios, lo que les hace diferenciarse de otros productos similares.

En nuestro país, la actividad ganadera aporta en torno a un 40% de la producción final agraria. El sector vacuno español es, dentro de las producciones ganaderas, el tercero en importancia económica por detrás del porcino y ovino, representando a finales de 2008 aproximadamente el 10,6% de la producción final ganadera. En relación con la Unión Europea, ocupamos el quinto lugar en cuanto a censo y producción de vacuno de carne, por detrás de países con amplia tradición en este sector, como Francia o Alemania, aportando el 7,3% del censo total europeo. Por Comunidades Autónomas, el primer lugar en número de cabezas de ganado, lo ocupa Castilla y León (20%), seguido de Galicia (14%), Extremadura (13%), Andalucía y Cataluña (ambas con un 10%), ocupando Asturias el quinto lugar (7%) (MARM, 2008). Sin embargo, también en nuestro país, la tendencia de consumo de carne de vacuno ha registrado, en los últimos tres años, descensos paulatinos como consecuencia de múltiples factores como son los cambios en los hábitos de consumo, cambios sociológicos y demográficos, el incremento de su precio y la competencia con otras carnes (MARM, 2008).

1.1 Situación actual del sector cárnico en Asturias.

En la Cornisa Cantábrica, las condiciones edafo-climáticas y la tradición socio-económica hacen que la ganadería sea la actividad dominante en el sector primario. En el caso particular del Principado de Asturias, la actividad ganadera, fundamentalmente de vacuno de leche y de carne, tiene una trascendencia significativa, tanto a nivel económico, como por su incidencia sobre la ordenación territorial, el mantenimiento de población en las zonas rurales, la conservación de los recursos naturales y la biodiversidad e incluso sobre el control del cambio climático. Sin embargo, el sector ganadero ha sufrido importantes reestructuraciones tanto a nivel nacional como regional

en los últimos años, derivadas principalmente de los cambios económicos y sociales, así como de las directrices promovidas por la Política Agraria Comunitaria (PAC). Desde los años 80, la orientación hacia la producción cárnica de las explotaciones asturianas ha ido ganando protagonismo, debido a una disminución paulatina de la producción lechera. Sin embargo, las políticas de abandono de la actividad ganadera, el aumento de los costes de producción y la extensión de enfermedades, como la lengua azul, están produciendo nuevamente un retroceso productivo en algunas zonas, que tiene visos de irse agravando debido al envejecimiento de los titulares de las explotaciones ganaderas y la escasa incorporación de la población joven a estas actividades. La cabaña ganadera asturiana que en la actualidad se compone de más de 500.000 ejemplares, estando altamente especializada en ganado bovino, ha mostrado una disminución paulatina en los últimos diez años. Entre los pequeños rumiantes, los censos ovinos y caprinos se han visto reducidos en un 40% y un 37 %, respectivamente según las estadísticas publicadas por la Sociedad Asturiana de Estudios Económicos e Industriales (SADEI) en 2009. En cuanto a la cabaña bovina, ha tenido un descenso de más de 63.000 cabezas y más de 11.000 explotaciones según los informes de la Consejería de Medio Rural y Pesca (SADEI, 2009). Estos descensos reflejan en gran medida las políticas de abandono de actividad y la reducción estructural de la cabaña lechera.

En Asturias coexisten distintas razas de ganado bovino: la Frisona y la Pardo Alpina (razas europeas introducidas en España) y las razas autóctonas Asturiana de los Valles “AV” (considerada raza “De Fomento”, es decir, que por su censo y organización se encuentran en expansión) y Asturiana de la Montaña “AM” (considerada en “Peligro de Extinción”, es decir, que se encuentra en grave regresión o en trance de desaparición, de acuerdo con los criterios establecidos a nivel nacional o internacional) (Real Decreto 2129/2008). El mayor descenso de efectivos en los últimos años se dio entre las vacas mestizas (cruces de las razas cárnicas, incluyendo la raza Pardo Alpina), cuyo censo se redujo un 45%, y las de raza Frisona (reducción del 30%), mientras que el número de vacas de las razas cárnicas AV y AM se incrementó un 8% y un 31%, respectivamente. Esta evolución, incentivada en gran medida por las subvenciones recibidas en los últimos años a las vacas nodrizas, refleja además la excelente adaptación de estas dos razas autóctonas asturianas a los sistemas productivos propios de la región, existiendo sin embargo entre ellas notables diferencias productivas y de implantación.

La raza AV es la dominante en cuanto a número de efectivos (más de 90.000 hembras reproductoras en 2006). Es una raza de maduración tardía, gran desarrollo muscular y bajo

contenido en grasa (Franco, 1997; Piedrafita y cols., 2003; Aldai y cols., 2006, 2007) que está muy bien valorada en el sector por su excelente aptitud cárnica debido, principalmente, a la elevada incidencia en la población del fenómeno de la hipertrofia muscular (Figura 1).



Figura 1. Ejemplar de la raza “Asturiana de los Valles”.

Dicho fenómeno está causado por una mutación inactivante del gen de la miostatina (Grobet y cols., 1997), que produce terneros culones, con hiperplasia (aumento del número) e hipertrofia (aumento del tamaño) de fibras musculares, lo que redundaría en un elevado rendimiento cárnico de la canal, produciendo estos genotipos canales de mayor conformación (Figura 2) y menor engrasamiento (Piedrafita y cols., 2003; Albertí y cols., 2005; Alzón y cols., 2007).



Figura 2. Canales de animales de la raza “Asturiana de los Valles” con distinto genotipo respecto al gen de la miostatina, siendo la canal izquierda de un individuo normal y la derecha de un individuo homocigototo recesivo para la mutación (culón).

Además, la carne procedente de los animales homocigotos culones (*mb/mb*) tiene menor contenido de grasa intramuscular, carne más clara y menor capacidad de retención de agua que la de los terneros de genotipo normal (+/+) de la misma raza, presentando los terneros heterocigotos (*mb/+*) características intermedias (Oliván y cols., 2004a; Aldai y cols., 2006). También se han observado diferencias en el perfil lipídico de las grasas, mostrando la carne de los animales culones AV (*mb/mb*) menor proporción de ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA) y mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que la de los otros genotipos (Aldai y cols., 2006). Además, estos individuos presentan diferencias en cuanto a las características metabólicas de las fibras musculares de la carne, observándose que la carne de los terneros culones AV (*mb/mb*) tiene mayor actividad glicolítica que la de los animales heterocigotos AV (*mb/+*), así como menor contenido de colágeno (Oliván y cols., 2004a).

Con respecto a la dureza de la carne, existen resultados contradictorios obtenidos en diferentes estudios. Así, Oliván y cols. (2003a) encontraron valores más altos de dureza instrumental de la carne en animales AV culones que en heterocigotos y normales a los 7 días post-mortem. Sin embargo, experimentos posteriores no mostraron diferencias (Oliván y cols., 2003b) o incluso mostraron valores de dureza instrumental más bajos en culones (Oliván y cols., 2004a,b).

Por otro lado, la raza AM cuenta con menor número de efectivos, aunque muestra en los últimos años una importante recuperación de censos, habiendo superado el techo de 10.000 hembras reproductoras.



Figura 3. Ejemplar de la raza "Asturiana de la Montaña".

Esta raza (Figura 3), más rústica, de maduración temprana y de menor formato que la anterior, produce terneros de peor conformación y menor rendimiento carnicero, mayor contenido graso y carne más oscura y oxidativa, con mayor contenido en mioglobina, como corresponde a las razas más rústicas (Gil y cols., 2001; Piedrafita y cols., 2003; Aldai y cols.,

2006), pero está muy bien valorada por su calidad sensorial, por lo que tiene gran reconocimiento en la restauración. Esta raza se explota en régimen extensivo para producción de carne, principalmente en la zona oriental del Principado de Asturias (Figura 4), donde cumple un papel fundamental en el mantenimiento del medio rural, estando muy adaptada a zonas desfavorecidas de alta montaña.



Figura 4. Distribución geográfica por concejos de las razas bovinas asturianas AV y AM.

Los productos de ambas razas, así como de los cruces entre ellas, se encuentran amparados por la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Ternera Asturiana”, distintivo de calidad que desde su aprobación en el año 2001 muestra un crecimiento continuado, ocupando el segundo puesto en el mercado nacional de carnes frescas de ternera amparadas por una IGP de calidad, tanto por su nivel de producción (18.980 animales sacrificados en 2009), como por el valor económico total (19,40 millones de euros), siendo superada a nivel nacional sólo por la IGP “Ternera Gallega”.

De los distintos productos que comercializa la IGP “Ternera Asturiana”, que según la edad pertenecen a la categoría “ternera” (menor de 12 meses, 60% de la producción) o “añojo” (de 12 a 18 meses, 40% de productos), las estadísticas muestran que el tipo de producto mayoritario que se sacrifica es un animal de la raza AV (88%), macho (70%) y de carácter culón (74%). Por lo tanto, la hipertrofia muscular juega un papel fundamental en la calidad de la carne de la IGP “Ternera Asturiana”.

1.2 Calidad de la carne: parámetros indicativos.

La calidad es un término complejo de definir. El concepto de calidad más extendido es el que la define como “la adecuación al uso”, es decir, la capacidad de un producto para satisfacer las expectativas de los consumidores.

En el caso de un alimento, la calidad engloba diferentes conceptos:

- Calidad higiénico-sanitaria: que no presente contaminación microbiana ni sustancias tóxicas.
- Calidad nutritiva: que aporte los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades del organismo.
- Calidad organoléptica: que ofrezca durante su consumo cierta cantidad de sensaciones satisfactorias de carácter sensorial.
- Calidad tecnológica: que mantenga las características necesarias para el desarrollo de determinados procesos de transformación en la industria y de manejo y conservación.
- Calidad de servicio: que tenga ciertas cualidades culinarias o cierto formato de presentación que permita que sea fácil de preparar y/o consumir.
- Calidad simbólica: que posea ciertas características que el consumidor asocie con una mayor calidad como por ejemplo, crianza en campo frente a cebadero, producto fresco frente a congelado, imagen de una determinada marca, etc.

Atendiendo a las distintas definiciones de calidad, existen diversos parámetros y atributos indicativos de la calidad de la carne, como son, el pH, el color, el contenido en pigmentos, la flora bacteriana, la capacidad de retención de agua, la composición química y energética, los niveles de oxidación lipídica, propiedades de textura, atributos sensoriales como olor, gusto, aromas percibidos durante la masticación, etc. Dichos atributos de calidad no pueden considerarse independientes, ya que están muy relacionados entre sí y su interacción proporciona las características globales de calidad de carne.

De todos ellos, los principales indicadores de la calidad tecnológica y organoléptica de la carne que vamos a considerar en esta Tesis son:

- El **pH**, que se define como el logaritmo negativo de la concentración de protones de una disolución. Su valor se expresa en una escala de 0 (ácido) a 14 (básico). Es un atributo determinante de la calidad de la carne, ya que afecta a los procesos bioquímicos que tienen lugar durante la transformación del músculo en carne, influyendo directamente sobre la estabilidad y propiedades de las proteínas y sobre las características físico-químicas de la carne. Tras la muerte del animal, una vez que se corta el flujo sanguíneo, se

genera ATP mediante la glucólisis anaeróbica a partir de la glucosa almacenada en el músculo en forma de glucógeno. La acumulación de metabolitos intermedios de esta vía, en particular ácido láctico y otros ácidos orgánicos, provoca un descenso del pH muscular, que en vacuno oscila desde los valores fisiológicos cercanos a 7 hasta valores últimos entre 5,5 – 5,7 que se alcanzan a las 24h o 48h *post-mortem*. La evolución del pH tras el sacrificio puede tener un profundo efecto sobre las propiedades sensoriales y tecnológicas de la carne, afectando al color, la textura y el grado de exudación, así como a la degradación proteolítica de la carne.

El **Color**, es una de las cualidades más importantes de la carne, ya que es el primer atributo que el consumidor puede apreciar y por lo tanto motivará su aceptación y opción de compra. El color de la carne dependerá de la estructura y tipo de músculo, de la concentración de pigmentos hemínicos (principalmente mioglobina) que contenga el músculo y del estado de oxidación de los mismos. El contenido de mioglobina en el músculo depende de diversos factores productivos, tales como especie, raza, edad, músculo, tipo de alimentación, etc, mientras que su estado de oxidación o desnaturalización dependerá de procesos *post-mortem* que se ven afectados por la disminución de la temperatura y la tasa de descenso de pH, así como de los tiempos de almacenamiento y las condiciones de comercialización. Dependiendo del estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo podemos diferenciar tres formas diferentes del pigmento que proporcionarán distinta tonalidad a la carne (Figura 5).

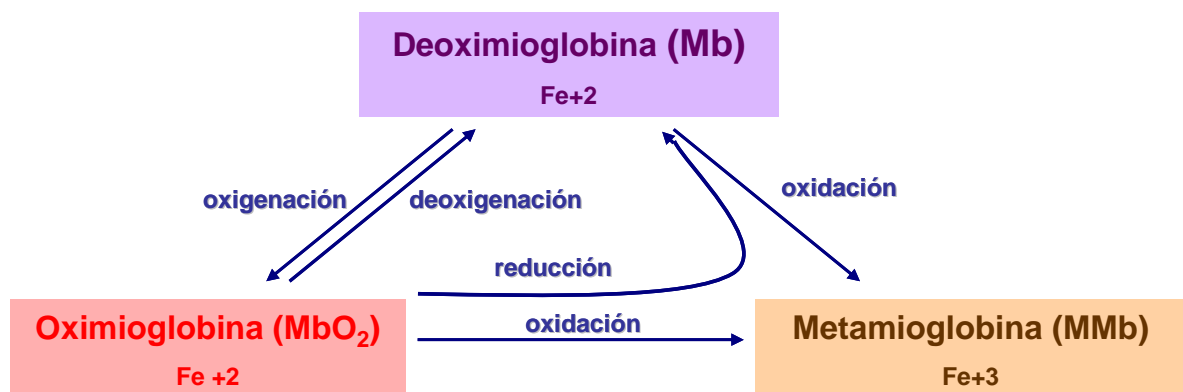


Figura 5. Interconversión redox de los pigmentos de la carne.

Así, en ausencia de oxígeno, el pigmento estará en la forma deoximioglobina o mioglobina reducida (Mb) que tiene un color rojo-púrpura. En contacto con el aire el

pigmento se oxigena y se transforma en oximioglobina (MbO_2), que confiere al músculo una coloración rojo brillante más atractiva para los consumidores. Tanto la deoximioglobina como la oximioglobina pueden reaccionar con el oxígeno, de modo que se produce la forma oxidada del pigmento, llamada metamioglobina (MMb), que tiene un color parduzco apagado que los consumidores asocian con una pérdida de calidad del producto (Mancini y Hunt, 2005).

Técnicamente, el color percibido se define como “el atributo visual que se compone de una combinación cualquiera de contenidos cromáticos y acromáticos” (CIE, 1978). Así, para determinar el color de una forma objetiva, los colores se transforman en valores triestímulo del espectro visible: rojo(x), verde (y) y azul (z) que, a su vez, son transformados matemáticamente en coordenadas que definen el color. Las coordenadas que más se conocen son las características del espacio de color CIE, representadas con las letras L^* , a^* y b^* , donde la coordenada L^* es el índice de luminosidad, representado en una escala de 0 (toda la luz es absorbida: negro) a 100 (toda la luz es reflejada: blanco), la coordenada a^* representa el índice de rojo que oscila de +60 (rojo) a -60 (verde) y, por último, la coordenada b^* representa el índice de amarillo y tiene un rango de variación entre +60 (amarillo) y -60 (azul) (CIE, 1978).

- La **Capacidad de retención de agua (CRA)**, se define como la habilidad de la carne para retener su contenido acuoso durante la aplicación de fuerzas externas como pueden ser gravedad, corte, calentamiento, picado o presión (Zhang y cols., 2005). La parte muscular de los mamíferos contiene alrededor de un 75% de agua, que disminuye como consecuencia de fenómenos de evaporación, pérdidas por gravedad, presión, cocinado, descongelado, etc. Offer y Tricnick (1983) presentaron evidencias de que la mayor parte del agua en el músculo es retenida por fuerzas capilares entre los filamentos finos y gruesos de las miofibrillas. La CRA en carne está en su mínimo cuando se alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas (pH entre 5,0-5,5), que es el pH último de la carne tras sufrir el *rigor mortis*. Hamm (1986) propuso cuatro maneras diferentes de medir este atributo: pérdidas por goteo, determinadas por la formación de exudado sobre la carne sin aplicación de fuerzas externas, pérdidas por descongelación, pérdidas por cocinado y jugo exprimible, resultante de la aplicación de fuerzas externas como pueden ser la compresión, centrifugación o succión. Posteriormente, Honikel (1998) describió los

métodos de referencia para determinar las pérdidas por goteo (drip loss) en carne cruda y las pérdidas de agua en carne cocinada.

- La **Composición química**, tiene gran relevancia sobre la calidad, ya que la carne es un componente importante de la dieta humana, que aporta un amplio rango de nutrientes: proteínas, grasas, agua, minerales y vitaminas. Además la composición de la carne afecta a su calidad tecnológica, higiénica, sensorial y de servicio. En general, se puede decir que la carne contiene entre 71 y 75% de agua, de un 20 a un 23% de proteínas, de 1 a 6% de grasa, un 1% de sustancias minerales y menos de un 1% de hidratos de carbono. Sin embargo, hay muchos factores que influyen sobre la composición química de la carne, sobre todo en el contenido graso, como la especie, raza, genotipo, estado fisiológico, dieta, sistema de manejo, tipo de músculo, etc. Estos factores no sólo afectan al contenido total de grasa intramuscular, sino también al perfil lipídico de la misma, que tiene gran interés desde el punto de vista de la salud humana, y además, puede tener efectos sobre determinados atributos sensoriales como el flavor, la textura y el color, y afectará a la estabilidad oxidativa de la carne durante la maduración *post-mortem* (Farmer, 1994; Wood y cols., 2003).
- La **Terneza**, es uno de los parámetros indicativos de calidad más importantes, especialmente en la carne de vacuno. Szczenesniak (1963) la definió como “la manifestación sensorial de la estructura del alimento y la forma de reaccionar de esta frente a la aplicación de fuerzas”. La terneza de la carne puede ser evaluada por diferentes métodos mecánicos (corte, compresión, penetración), estructurales o químicos, además del análisis sensorial. Uno de los métodos más utilizados para medir la dureza instrumental es el método mecánico de corte o cizalla mediante la célula de Warner-Bratzler, que mide la fuerza necesaria para cortar un pedazo de carne con una cuchilla de borde romo. Existen numerosas fuentes de variación en la terneza que pueden deberse no sólo a diferencias en raza, sexo, alimentación, peso vivo y estrés ante-mortem, sino que también la terneza de la carne dependerá desde un punto de vista físico de cambios post-mortem en la arquitectura e integridad de la célula muscular esquelética, de cambios en la longitud sarcomérica, de la cantidad de tejido conectivo y enlaces cruzados de las fibras de colágeno, del tamaño y cantidad de depósitos de grasa intramuscular y también de la actividad de enzimas proteolíticos sobre proteínas miofibrilares, que podrían

explicar la mayor parte de la variación de calidad en la carne madurada (Smith, 2001; Koohmaraie y cols., 2002; McCormick, 2009).

- **Calidad Sensorial.** El análisis sensorial se basa en un conjunto de técnicas que permiten valorar las propiedades sensoriales de un alimento, es decir, los atributos de ese alimento que se pueden detectar por medio de los sentidos. A pesar de que existen numerosos métodos analíticos de laboratorio que permiten medir con precisión diversos parámetros que definen la calidad de los alimentos, cada vez se tiene más en cuenta que sólo los jueces humanos pueden integrar todas las sensaciones sensoriales que va a percibir el consumidor, de modo que el análisis sensorial es una herramienta útil, necesaria y complementaria de otros análisis instrumentales o químicos. En todo estudio de análisis sensorial, al ser los instrumentos de medida los seres humanos, es necesario cumplir escrupulosamente determinadas pautas de actuación, evitando al máximo las fuentes de variación o error, por lo que la obtención de medidas objetivas que aporten una información precisa y reproducible exige un control riguroso de los métodos y condiciones de las pruebas y la aplicación de un diseño experimental correcto (Guerrero y Guardia, 1998). Los principales componentes de la palatabilidad de la carne que se suelen evaluar son ternera, jugosidad, calidad e intensidad de olor y flavor, masticabilidad y apreciación global (Monsón y cols., 2005; Serra y cols., 2008). En los estudios de consumidores se realizan valoraciones hedónicas de atributos básicos como son flavor, jugosidad, ternera y aceptabilidad global (Monsón y cols., 2005; Font i Furnols y cols., 2009).
- El **Estado oxidativo.** Las modificaciones que se van produciendo a lo largo de la maduración *post-mortem* en las biomoléculas musculares incluyen un descenso de la defensa antioxidante y un incremento del grado de oxidación de lípidos y proteínas por la acción de radicales libres (Renerre, 1999), con consecuencias sobre la calidad sensorial y la textura final de la carne. En el músculo, la oxidación lipídica se inicia a nivel de las fracciones de fosfolípidos de membrana, debido principalmente a sistemas autocatalíticos de radicales libres en cadena. Se sabe, además, que la oxidación de las proteínas altera su estructura secundaria y terciaria y puede conducir a la formación de agregados (Grune y cols., 2004) y en ocasiones inactivación de enzimas, lo que puede afectar negativamente a la tenderización de la carne (Rowe y cols., 2004a,b). Para tratar de contrarrestar los efectos de la oxidación, existen en las células una serie de enzimas antioxidantes como

son la Superóxido Dismutasa (SOD), la Catalasa (CAT) y el tándem glutatión peroxidasa/reductasa (GSH-Px/GSH), que son capaces de neutralizar la energía de las especies reactivas de oxígeno metabolizando los radicales libres o sus intermediarios reactivos, transformándolos en productos sin efectos nocivos para los tejidos. El método más utilizado en alimentos, y en particular en la carne, para medir el estado oxidativo, es el índice TBARS, que mide la cantidad de malonaldehído que se produce como resultado de la peroxidación de las grasas y que generalmente está altamente correlacionado con la calidad sensorial.

1.3 Factores que afectan a la calidad de la carne.

La calidad de la carne depende de diversos factores intrínsecos propios del animal (raza, genotipo, sexo y edad) y extrínsecos o ligados al proceso productivo (alimentación, castración), además de otros relacionados con el manejo del animal y la canal en los momentos previos y posteriores al sacrificio (transporte, tiempo de espera, ayuno, estrés, método de aturdimiento, sangrado, enfriamiento de la canal, tiempo de maduración, envasado, etc...). Dichos factores pueden dividirse en función del espacio temporal en el que actúan.

1.3.1 Factores *ante-mortem*: raza, hipertrofia muscular, sexo, edad, alimentación.

1.3.1.1 Efecto de la raza.

La raza es un factor muy importante que afecta a muchas características productivas de los animales y también a la calidad final de la carne. Se han realizado diversas clasificaciones de distintas razas de ganado vacuno atendiendo a criterios productivos (razas cárnicas *vs* razas lecheras), a la velocidad con la que alcanzan la madurez, lo que determinará su edad óptima de sacrificio (maduración rápida o lenta), al tamaño corporal, etc. Un estudio reciente de Albertí y cols. (2008), que incluye varias razas locales europeas, establece la siguiente clasificación atendiendo a parámetros productivos:

- Razas especializadas en producción de carne: comprende razas caracterizadas por una gran musculatura, maduración tardía y bajo o moderado contenido graso, como la Piamontesa, Asturiana de los Valles, Pirenaica, Limousin, South Devon, Charolais y Aberdeen Angus.

- Razas lecheras y autóctonas: con poca musculatura y compacidad y niveles elevados o medios de grasa. Entre ellas estarían razas del tipo Jersey, Asturiana de la Montaña, Morucha, Highland, Holstein y Roja Belga.

- Grupo intermedio: de razas caracterizadas por una conformación muscular y contenido graso intermedio, que comprendería a las razas Avileña, Marchigiana y Simmental, entre otras.

La raza afecta a la composición química de la carne, sobre todo, cuando se comparan razas de madurez precoz y tardía, ya que a la misma edad las primeras presentan una proporción más baja de músculo y más alta de grasa. También existen diferencias en la composición grasa dependiendo de la raza (Insausti y cols., 2004, Aldai y cols., 2006), como por ejemplo en la proporción de SFA y PUFA como hemos apuntado en las razas autóctonas asturianas AV (aptitud cárnica) y AM (raza rústica). Además, las razas rústicas presentan mayor contenido en fibras rojas (de contracción lenta y metabolismo oxidativo), las cuales se caracterizan por poseer mayor cantidad de mioglobina, mayor número de mitocondrias y concentraciones de glucógeno más bajas (Hocquette y cols., 2005; Lefaucheur y cols., 2010).

En cuanto al efecto de la raza sobre la textura, Smith (2001) afirmó que el ganado vacuno criado y seleccionado durante siglos para la tracción tiene más tejido conectivo y colágeno con mayor grado de cruzamiento de enlaces, que el ganado que ha sido criado y seleccionado para producir carne. Análogamente, Failla y cols. (2004) indicaron que la carne de razas rústicas, concretamente de las razas españolas Asturiana de la Montaña y Avileña, era más dura que la de razas con elevada aptitud cárnica como la Piamontesa. Así mismo, Vieira y cols. (2002), comparando Morucha (rústica) con el cruce mejorado de aptitud cárnica (Morucha x Charolés) encontraron que la carne de vacuno proveniente de la raza rústica necesita un período de maduración más largo para alcanzar el mismo grado de terniza. De igual manera, Sañudo y cols. (2004), observaron en animales de edades similares (machos enteros añojos) que el músculo *Longissimus thoracis* de razas rústicas y de doble aptitud presentaba una mayor dureza a tiempos cortos de maduración (7 días) que en las razas de aptitud cárnica.

En cuanto al efecto de la raza sobre la calidad sensorial, existen resultados muy dispares, posiblemente porque el efecto de la raza interacciona con otros como son el sexo y la edad del animal, el manejo y el tipo de alimentación. Así, Wheeler y cols. (2005) apenas encontraron diferencias en la calidad sensorial comparando siete razas cárnicas europeas, mientras que Ikeman y cols. (2005), en un estudio realizado con catorce razas, concluyeron que existen importantes

efectos genéticos sobre los atributos sensoriales. También Campo y cols. (1999) encontraron diferencias al comparar siete razas españolas en muchos de los parámetros sensoriales estudiados, si bien apuntaban que el efecto del tiempo de maduración resultó más importante que el de la raza, coincidiendo esto con los resultados obtenidos por Monsón y cols. (2005). Parte de las diferencias encontradas entre razas radican, posiblemente, en diferencias genéticas en la actividad enzimática del músculo y su composición, especialmente en relación a los niveles de grasa o tipo de fibra (Mandell y cols., 1997; Sañudo y cols., 2004). Diferentes razas requerirán de diferentes sistemas de producción, por lo que una adecuada combinación de ambos permitiría generar productos de calidad diferenciada (Alberti y cols., 2008).

1.3.1.2 Efecto de la hipertrofia muscular.

El alto grado de desarrollo muscular observado en algunas razas europeas como la Azul Belga, Piamontesa, South Devon o Asturiana de los Valles, está asociado con un síndrome genético producido por una mutación en el gen regulador de la miostatina. La miostatina es un factor de crecimiento secretado por las células musculares que actúa inhibiendo su crecimiento (McPherron y Lee, 1997; Thomas y cols., 2000). La presencia de esta mutación produce miostatina no funcional, lo que ocasiona un incremento en la masa muscular debido a un incremento del tamaño (hipertrofia) así como del número (hiperplasia) de las fibras musculares (Swatland y Kieffer, 1974; Ansay, 1976) produciendo fenotipos hipermusculados conocidos como “double-muscléd”, “doble grupa” o “culones” (Arthur, 1995; Joulia-Ekaza y Cabello, 2006). Aunque existen distintos tipos de mutaciones en este gen, la más común consiste en una delección de 11 pares de bases que es la que presenta la raza Asturiana de los Valles (Grobet y cols., 1997; Warner y cols., 2010). La herencia del carácter se ajusta a un modelo de un único gen autosómico parcialmente recesivo con penetrancia incompleta (Ménissier, 1982), de tal manera que no todos los animales homocigotos para una mutación del gen expresan el carácter. En general, los animales pueden clasificarse como homocigotos positivos para la mutación (*mb/mb*), que suelen exhibir musculatura extrema (culones), heterocigotos para la mutación (*mb/+*), expresando una musculatura intermedia entre los homocigotos positivos y los normales (*+/+*), que son aquellos animales sin mutación. Este síndrome afecta a muchas otras características fisiológicas e histológicas y su grado de expresión dependerá de sus antecedentes genéticos (raza, haplotipo de la mutación) y otros factores como dieta, sexo, etc.

La hipertrofia muscular produce una serie de efectos negativos para la producción animal, como son problemas de fertilidad, mayor susceptibilidad al estrés, menor viabilidad de las camadas y retraso en la madurez sexual (Ménissier, 1982; Arthur, 1995).

En lo que respecta a la producción cárnica, la presencia de la hipertrofia muscular produce canales con mayor proporción de músculo, menor proporción de hueso, menor cantidad de tejido conectivo y mucha menor proporción de grasa (subcutánea, inter e intramuscular) que las canales convencionales (Arthur, 1995; Fiems y cols., 2000). Además de menor proporción de grasa, esta grasa presenta diferente composición de modo que diversos estudios encontraron en animales culones de distintas razas (Asturiana de los Valles, Azul Belga, South Devon) menor proporción de ácidos grasos saturados con respecto a los poliinsaturados que en los individuos normales (Raes y cols., 2001; Aldai y cols., 2006; Wiener y cols., 2009). Además, muchas otras características de la carne se ven también afectadas por la mutación, por ejemplo el color, de modo que la carne procedente de los animales homocigotos para la mutación es más clara que la de los normales (Clinquart y cols., 1994; Fiems y cols., 1995; Aldai y cols., 2006), lo que podría deberse tanto a la mayor proporción de fibras blancas en el músculo (Fiems y cols., 1995) como al menor contenido en pigmentos hemínicos (Morita y cols., 1970; Arthur, 1995; Fiems y cols., 2000). También se ha observado que la carne de terneros culones presenta una menor capacidad de retención de agua (Boccard, 1981; Uytterhaegen, 1994; Aldai y cols., 2006). En cuanto a la dureza de la carne, es preciso destacar la alta variabilidad encontrada en los terneros afectados por hipertrofia muscular. En general, se ha descrito que la carne de los terneros culones es más tierna que la de los terneros de genotipo normal, en parte debido a su menor contenido de colágeno en el músculo y la menor cantidad de enlaces cruzados no reducibles, es decir, mayor solubilidad y por tanto menor dureza residual (Boccard, 1981; De Smet y cols., 1998; Oliván y cols., 2004a). Sin embargo, en la bibliografía existente hay numerosos estudios que han descrito valores altos de dureza en carne de terneros culones, de distintas razas, comparados con animales de genotipo normal (Clinquart y cols., 1994; Uytterhaegen y cols., 1994; Fiems y cols., 2000). Estas diferencias entre estudios pueden atribuirse a la utilización de animales de diferente raza, edad, peso, dieta, nivel de alimentación o a la realización de los análisis sobre distintos músculos y/o en distintas condiciones de maduración y cocinado.

Con respecto a las características sensoriales, Wiener y cols. (2009), en un estudio realizado en la raza South Devon, encontraron que la presencia de la hipertrofia muscular se asociaba con una peor valoración del flavor y en general con peor aceptabilidad de la carne, coincidiendo con

Wheeler y cols. (2001), que demostraron una reducción en la intensidad del flavor y la jugosidad de la carne de terneros cruzados (Hereford o Angus con Piamontesa), homocigotos para la mutación.

1.3.1.3 Efecto del sexo o del estado fisiológico.

Los estudios enfocados a comparar la calidad de la carne y de los productos cárnicos atendiendo al sexo (machos *vs* hembras) o estado fisiológico (castrados *vs* enteros) han generado resultados variables, tal y como apuntan las revisiones realizadas por Field (1971) y Seideman y cols., (1982), lo cual podría deberse a la utilización en los diversos estudios de animales de diferentes razas, pesos, dietas y sistemas de manejo. Existen diferencias musculares entre sexos que se muestran de forma notable tras la pubertad del animal y que pueden deberse a la producción de hormonas sexuales, en concreto la testosterona (Schreurs y cols., 2008). Estas diferencias hormonales afectan a la composición del músculo, de modo que en los machos la testosterona favorece una rápida formación de músculo en contra de la deposición de grasa, haciendo que la carne de machos presente un menor contenido graso que la de hembras o machos castrados, lo que afectará a las características físico-químicas y sensoriales de la carne. Las hembras presentan además un menor diámetro de las fibras musculares (Church y Wood, 1992), lo cual influye sobre la textura de la carne. Por otro lado, la carne de los animales machos tiene mayor tendencia a incrementar su dureza con la edad en comparación con las hembras, lo que podría deberse en parte al posible efecto estimulador de la testosterona sobre el contenido de colágeno (Seideman y cols., 1982; Gerrard y cols., 1987). Por todo esto, generalmente la carne de las hembras es de mejor calidad sensorial que la de los machos (Riggs y cols., 1967; Purchas y cols., 2002; Fiems y cols., 2003), sin embargo en el mercado predomina la carne de animales machos, ya que gran parte de las hembras se reservan como nodrizas en las explotaciones.

En cuanto al efecto del estado fisiológico o castración, Purchas y cols. (2002) encontraron en animales de raza Angus de distintos rangos de edad (16-18 meses y 24-28 meses) y distintos niveles de crecimiento (rápido, restringido y lento), que la carne de los terneros castrados presentaba mayor engrasamiento intramuscular, resultando más tierna y jugosa que la de los machos enteros. Además, en este estudio, los machos enteros mostraron mayores tasas de crecimiento, dando lugar a una carne con menor capacidad de retención de agua, pH más alto y menor actividad proteolítica, lo que también podría explicar la mayor dureza encontrada. Page y cols. (2001) también describieron pHs más altos en machos enteros que en castrados y hembras,

además de valores más bajos de L^* y de b^* . La menor actividad proteolítica de los animales enteros en comparación con los castrados fue también descrita por Huff-Lonergan y cols. (1995), que observaron una degradación más lenta de las proteínas titina y nebulina en la carne de machos enteros.

En las razas bovinas asturianas, los estudios sobre el efecto de la castración en la calidad del producto han mostrado un incremento significativo del engrasamiento intramuscular y de la valoración sensorial por el consumidor en animales castrados, tanto cebados en intensivo (Osoro y cols., 2001, Oliván y cols., 2001a, b, 2003a) como en extensivo (Oliván y cols., 2001a, 2002). En general, se ha observado que los factores de manejo que producen aumento en el engrasamiento intramuscular tienen un efecto muy beneficioso sobre la valoración sensorial de la carne de vacuno de las razas asturianas, especialmente en la raza AV caracterizada por bajos niveles de grasa intramuscular, existiendo una correlación positiva entre el engrasamiento intramuscular y la calidad global de la carne percibida por el consumidor (Oliván y cols., 2001b). Esta observación coincide con resultados obtenidos en la raza Piamontesa, también afectada por la hipertrofia muscular, en la que la castración, que incrementa la deposición de grasa, mejora también la aceptación sensorial de la carne (Lazzaroni y Biangini, 2008).

1.3.1.4 Efecto de la edad.

El efecto de la edad del animal sobre la calidad de la carne aún no está claro debido a que, en muchas ocasiones, el estudio del efecto edad interacciona con otros factores como la velocidad de crecimiento del animal y el nivel de alimentación (Purchas y cols. 2002), por tanto, es preciso diferenciar entre la edad cronológica (días desde el nacimiento) y la edad fisiológica (porcentaje de peso vivo adulto alcanzado) que determina el estado de desarrollo del individuo, ya que esta última influye en la diferencia entre razas, determinando su precocidad y su peso al sacrificio (Santolaria, 1993).

En general, el contenido lipídico se incrementa con la edad cronológica y el peso del animal; así a medida que se produce el engrasamiento global de los animales, aumenta también el contenido de grasa intramuscular. Con la edad también cambia el perfil lipídico de la carne, produciéndose un descenso de la proporción PUFA/SFA (Warren y cols., 2008) y además aumenta el contenido de pigmentos hemínicos (Gil y cols., 2001; Varela y cols., 2003). Además, en animales de edad más avanzada la estabilidad del color de la carne es más baja, posiblemente por la mayor proporción de fibras rojas oxidativas (Jurie y cols., 2005), favoreciendo que la

oxidación de oximioglobina a metamioglobina sea más rápida (paso del color rojo brillante al color marrón), lo que explica que la carne de ganado bovino de edad más avanzada presente un color más oscuro e intenso frente a la de animales jóvenes.

Algunos autores han descrito una disminución en la terneza de la carne al aumentar la edad del animal, en especial cuando se han estudiado rangos de edad muy amplios que abarcan de pocos meses a varios años (Hiner y Hankins, 1950; Tuma y cols., 1962; Shorthose y Harris, 1990). Este efecto es más acusado cuando se analizan músculos con alto contenido en tejido conectivo, posiblemente debido a un incremento en el entrecruzamiento del entramado de colágeno con la edad. En rangos de edad más reducidos, hay estudios que han encontrado incrementos, descensos o ningún cambio notable en la medida de la terneza al aumentar la edad del animal (Dikeman y cols., 1986; Gullet y cols., 1996; Purchas y cols., 2002). Así por ejemplo, estudios de Sañudo y cols. (2004) sobre el efecto del peso al sacrificio (terneros de 300-350 kg y 530-560 kg) en distintas razas españolas obtuvieron resultados sorprendentes en parámetros como la dureza de la carne, con valores más altos en la carne de los terneros pequeños. Recientemente se ha postulado que puede haber variaciones entre animales de distinta edad en cuanto a las actividades enzimáticas proteolíticas y oxidativas en el músculo (Kolzac y cols., 2003; Xiong y cols., 2007; Warren y cols., 2008), lo cual explicaría en parte, la necesidad de un período de maduración de la carne más largo a medida que va aumentando la edad del animal.

1.3.1.5 Efecto de la alimentación.

La alimentación es uno de los factores que más influyen en la calidad final de la carne, sobre todo debido a que la nutrición puede tener un efecto regulador sobre los procesos biológicos que tienen lugar en el músculo y que finalmente determinarán la calidad del producto (Andersen y cols., 2005; Descalzo, 2007). Se ha demostrado que la dieta afecta a la composición química de la carne de vacuno de modo que dietas ricas en piensos concentrados producen una mayor proporción de grasa en comparación con la carne procedente de animales alimentados con forrajes (O'Sullivan y cols., 2003). Así mismo, la dieta afecta a la composición de la grasa, produciendo la ingestión de forrajes cambios en el perfil lipídico de la carne, que presentará mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados n-3 y en particular de ácido linolénico (Descalzo y cols., 2005; Descalzo, 2007).

Con respecto al colágeno, existen resultados contradictorios en cuanto al efecto de la dieta; así, mientras algunos estudios no han encontrado diferencias producidas por la dieta en la

solubilidad del colágeno (Mandell y cols., 1998; French, y cols., 2001), otros sugieren que dietas energéticamente más ricas aumentan la cantidad de colágeno soluble y aceleran la tasa de transformación del tejido conectivo, lo que afectaría positivamente a la ternura de la carne (Miller y cols., 1987; Archile y cols., 2010).

La dieta también afecta al color de la carne y de los tejidos adiposos (Priolo y cols., 2001; Dunne y cols., 2006). Así, la ingestión de forrajes produce grasa más amarilla, debido a la acumulación de pigmentos carotenoides. En cuanto al color de la carne, la mayoría de los autores afirman que la carne de ganado bovino cuya alimentación está basada en el consumo de forraje, es más oscura que la de aquellos animales alimentados con piensos (Bennet y cols., 1995, Priolo y cols., 2001; Oliván y cols., 2002), sin embargo, esto dependerá en gran medida de la duración del período de tiempo durante el cual se ha suministrado el forraje y de la introducción o no de un periodo de acabado con pienso (Oliván y cols., 2005).

Por otro lado, la dieta influye sobre la calidad sensorial de la carne, sobre todo en parámetros como el flavor (Warren y cols., 2008). Numerosos estudios han mostrado que una dieta a base de concentrados genera una mayor calidad sensorial de los productos (Schroeder y cols., 1980; Medeiros y cols., 1987; Warren y cols., 2008). Sin embargo, se ha podido comprobar que la inclusión de forrajes en la dieta de los rumiantes puede ocasionar un incremento de determinados compuestos con actividad antioxidante, como la vitamina E, que incrementan la estabilidad oxidativa del producto (Descalzo y cols., 2005; Descalzo, 2007; Oliván y cols., 2009), evitando los efectos negativos de la oxidación sobre el color y el flavor (Campo y cols., 2006) y previniendo por tanto el deterioro de la calidad sensorial de la carne durante su almacenaje y procesado (Yang y cols., 2002; Realini y cols., 2004; Warren y cols., 2008).

1.3.2 Factores *peri-mortem*: transporte, manejo y estrés al sacrificio.

Todos los animales destinados a la producción de carne van a sufrir ciertos niveles de estrés al sacrificio, y esto puede tener efectos negativos sobre la calidad del producto. Desde que los animales salen de la granja hasta que son sacrificados están expuestos a numerosos estímulos que perturban su homeostasis y generan respuestas adaptativas para restaurar el equilibrio. Dicha respuesta es muy variable entre individuos, que no sólo no perciben el estrés de igual modo, sino que coordinan de diferente modo su respuesta al mismo (Moberg, 2001). Esto estará modulado por distintos factores intrínsecos del animal (genética, sexo, edad, estado fisiológico) además de

por experiencias anteriores y aprendizaje adquirido (Boissy, 1995; Hemsworth y Barnett, 2001; Moberg, 2001).

El estrés que sufren los animales antes del sacrificio provoca cambios en la composición de metabolitos (fosfocreatina, glucógeno), cambios en la temperatura y pH al sacrificio (Warner y cols., 2000; Warner y cols., 2005) y también cambios en la actividad del retículo sarcoplásmico afectando especialmente al transporte de calcio, lo que puede alterar la glucólisis produciendo un consumo excesivo de glucógeno muscular (Ferguson y cols., 2008; Mach y cols., 2008). El nivel de depleción de glucógeno puede depender de infinidad de factores de manejo, tales como el cansancio físico y el estrés al que se someta el animal (Nockels y cols., 1996; Immonen y Puolanne, 2000), el tiempo que dure el transporte, el manejo aplicado durante el transporte de los animales desde la granja al matadero (Schaefer y cols., 1997; Arthington y cols., 2003), las condiciones de carga y descarga de los animales, el tiempo de espera en el matadero (Warris, 2003), las temperaturas extremas (Kreikemeier y cols., 1998; Silva y cols., 1999), la ruptura de grupos sociales establecidos o reagrupación de animales de distinta procedencia (Apple y cols., 1995), la exposición a un ambiente nuevo (Hambrecht y cols., 2005; Mounier y cols., 2006) y la privación de agua y alimento (Ferguson y cols., 2008). La concentración de glucógeno también varía notablemente en el momento del sacrificio, dependiendo de la tasa de alimentación (Schaefer y cols., 1997; Gardner y Thompson, 2003; Bee y cols., 2006), peso vivo (Smith y Dobson, 1990), estado nutricional (Geay y cols., 2001), tipo de músculo y fibras musculares (Hambrecht y cols., 2005), capacidad tamponadora del músculo (Silva y cols., 1999; Immonen y Puolanne, 2000), sexo (Shackelford y cols., 1994; Hoffman y cols., 1998), raza (Gardner y Thompson, 2003) y temperamento propio de los animales (Gardner y Thompson, 2003; King y cols., 2006).

Todos estos factores pueden tener un gran efecto sobre diferentes atributos de calidad como son cambios en pH, (Warner y cols., 2005), en terneza, color, capacidad de retención de agua y también sobre la maduración de la carne (Gregory, 2003) y pueden determinar la aparición de carnes oscuras, duras y secas conocidas como DFD (“Dark, Firm, Dry”), con un pH elevado y unas características como color, capacidad de retención de agua o textura que no son las deseables (Beriaín y Lizaso, 1998; Viljoen y cols., 2002; Wulf y cols., 2002).

1.3.3 Factores *post-mortem*: enfriamiento, envasado, tiempo de maduración.

La temperatura del músculo durante las fases pre y post-rigor tendrá un gran efecto en el metabolismo muscular *post-mortem* (Marsh, 1954). La temperatura modula la velocidad de la glucólisis y afecta, a su vez, a la tasa de descenso de pH y a la velocidad de aparición del *rigor mortis* y del acortamiento sarcomérico. Se ha descrito que cuando el rigor tiene lugar a temperaturas entre 15-20°C, se produce menor grado de acortamiento sarcomérico, si bien mantener a estas temperaturas las canales no es factible debido a los peligros microbiológicos. Además, otra consideración importante es que la tasa de descenso de temperatura puede variar en los distintos músculos, así en canales grandes con gran cobertura grasa, se producirá un gradiente de temperatura entre los músculos más externos y los internos.

Los procesos metabólicos que se suceden en el músculo después de la muerte, pueden considerarse concluidos con la aparición del *rigor mortis* o rigidez cadavérica. Sin embargo, la carne lista para el consumo se obtiene después de un cierto tiempo de almacenamiento en refrigeración (0-5°C) conocido como maduración, tras el cual la carne resulta más tierna y jugosa (Carballo y López de Torre, 1991). La maduración habitual de la carne se realiza por almacenamiento en frío de los medios o cuartos de canal durante 10 ó 14 días. Sin embargo, su vida útil está limitada principalmente por dos factores: el efecto del oxígeno atmosférico y el crecimiento de microorganismos aerobios productores de alteraciones. Estos factores, de forma individual o asociados con otros, producen cambios de olor, sabor, color y textura, que van produciendo un deterioro general de la calidad. El almacenamiento refrigerado retrasa estos cambios indeseables, pero no incrementa la vida útil lo suficiente para las exigencias de la distribución al por menor. Existen diversos tipos de envasado en atmósferas protectoras para incrementar la vida útil de los alimentos. El método de referencia en la mayoría de las investigaciones es el envasado al vacío, que permite estudiar períodos largos de maduración *post-mortem* y se emplea ampliamente para productos como primeros cortes de carnes rojas frescas (López Vázquez y Vanaclocha, 2004). En estas condiciones se inhibe la proliferación de patógenos y alterantes aerobios y la oxidación lipídica. Además, este sistema facilita la manipulación y transporte de la carne.

Como se ha dicho anteriormente, el tiempo de maduración de la carne es fundamental para la adquisición de un grado de ternura adecuado debido al ablandamiento de la carne, que se atribuye a una degradación progresiva y selectiva de la estructura de las miofibrillas a causa de la acción de enzimas proteolíticos endógenos. Además, a lo largo de la maduración ocurren

fenómenos oxidativos que afectan a lípidos y proteínas y provocan cambios en el color de la carne y contribuyen de forma positiva en el desarrollo adecuado de su flavor característico. Por un lado, los procesos *post-mortem* acontecidos hasta la instauración de la rigidez cadavérica conducen a la degradación de ATP a inosín-monofosfato (IMP), que al degradarse da lugar a ribosa, fosfato e hipoxantina y a esta última molécula se le atribuye un efecto favorable sobre las características sensoriales de la carne (Prändl y cols., 1994). Por otro lado, también se producen durante la maduración compuestos que contribuyen al aroma de la carne por degradación de proteínas y grasas (Touraille y Girard, 1985). Marino (2006) comprobó que una extensión del tiempo de maduración de 15 a 21 días *post-mortem* incrementaba el flavor de la carne, coincidiendo con resultados de Campo y cols. (1999) y Napolitano y cols. (2001) que encontraron que la intensidad del flavor se incrementaba con el tiempo de maduración, probablemente debido a fenómenos de proteólisis y lipólisis que dan lugar a la formación de precursores del sabor. Además, muchos péptidos que son producidos durante la maduración podrían reaccionar con otras moléculas produciendo nuevos componentes del flavor, razón por la que Campo y cols. (1999) apuntaban la necesidad de un tiempo de maduración adecuado para el desarrollo de componentes del flavor y la adquisición de ciertas propiedades sensoriales de la carne tras el sacrificio.

1.4 Transformación del músculo en carne.

El concepto de músculo define al tejido muscular del animal *in vivo*, mientras que la carne es el resultado de una serie de transformaciones estructurales y de reacciones bioquímicas que tienen lugar en el músculo tras la muerte del animal, durante el proceso de maduración *post-mortem*, que produce cambios que afectan a su calidad tecnológica y sensorial.

El tejido muscular tiene diversas funciones mecánicas, encargándose del movimiento del cuerpo, de mantener el equilibrio y la coordinación, pero además el metabolismo de las células musculares está implicado en el mantenimiento del calor corporal y la movilización de sangre y linfa. Pocas células han de generar tanta fuerza y están sometidas a cambios tan dramáticos en su metabolismo como las células musculares. Por todo esto, la organización, estructura y metabolismo del músculo es clave para mantener su función e integridad.

El músculo esquelético está compuesto por conjuntos de fascículos, estando a su vez cada fascículo formado por un conjunto de fibras musculares (células musculares) que son mantenidas juntas por tejido conjuntivo. El tejido conjuntivo rodea tanto a las fibras individuales

(endomisio), como a los fascículos (perimisio) y a los conjuntos de fascículos que forman el músculo (epimisio) y es indispensable para la transducción de fuerzas.

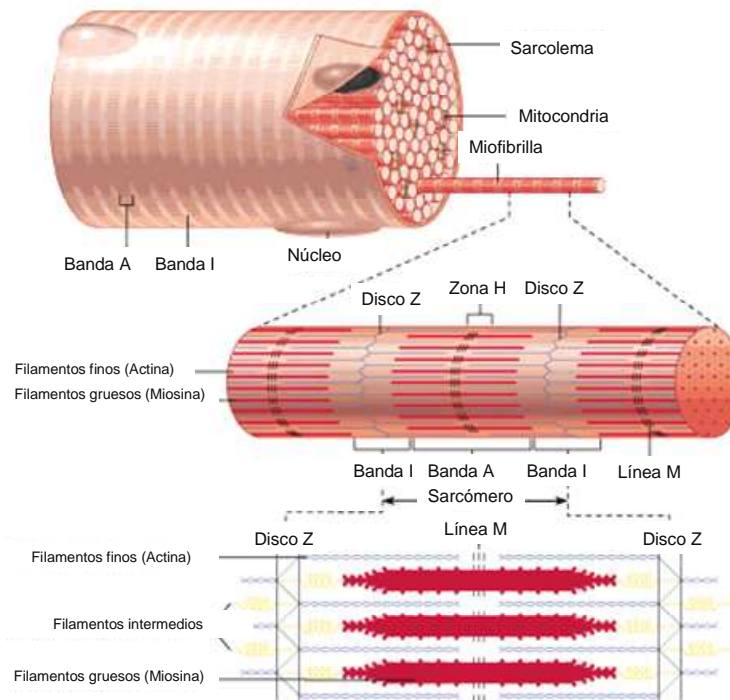


Figura 5. Esquema de la estructura miofibrilar.

La fibra muscular es un sincitio multinucleado rodeado de membrana plasmática, también llamada sarcolema, a la que se adhiere el tejido conjuntivo del exterior. Las fibras musculares (Figura 5) están ocupadas en casi su totalidad por agrupaciones de unidades longitudinales, las miofibrillas, que constituyen la “maquinaria” contráctil de la célula muscular y están compuestas a su vez por haces de miofilamentos, que son polímeros filamentosos individuales de miosina II (filamentos gruesos) y de actina y sus proteínas asociadas (filamentos finos) y son los verdaderos elementos contráctiles del músculo estriado.

La unidad funcional de la miofibrilla es el sarcómero y contenidos en el mismo están todos los elementos estructurales necesarios para desarrollar físicamente la contracción. El alineamiento de los sarcómeros es lo que confiere la apariencia estriada a la célula muscular. Las estriaciones aparecen por la alternancia de zonas proteicas densas (bandas A) y zonas menos densas (bandas I) en las miofibrillas. Tanto las bandas A como las I están divididas en dos mitades por regiones estrechas de densidad contrastante, así las bandas I estarán divididas por una línea oscura conocida como línea o disco Z y las bandas A por una menos densa o clara llamada banda o zona

H. Además, a mitad de la zona H hay una fina línea densa llamada línea M. La estructura comprendida entre dos líneas Z es un sarcómero. Las bandas I están compuestas principalmente de filamentos finos mientras que las A están compuestas por filamentos gruesos y algunos finos superpuestos. La actina, la troponina y la tropomiosina de los filamentos finos y la miosina II de los gruesos son las proteínas primarias del aparato contráctil muscular. Además, existen también una serie de proteínas accesorias que mantienen la alineación precisa de los filamentos finos y gruesos como son la desmina, filamina, etc (Ross y Pawlina, 2007).

1.4.1 Mecanismos moleculares y bioquímicos que participan en la transformación del músculo en carne.

El proceso de conversión del músculo en carne está compuesto por tres fases (Sentandreu y cols., 2002): la fase *pre-rigor* durante la cual el músculo permanece excitable y se correspondería con la fase de supervivencia del sistema nervioso (Chrystall y Devine, 1985); *el rigor*, en la que los componentes energéticos (ATP, fosfocreatinina, glucosa) se agotan; y por último la fase *post-rigor* de maduración o tenderización de la carne en la que se produce una desestructuración de la arquitectura muscular. Tras el sacrificio del animal, como consecuencia del desangrado, se produce un descenso abrupto del aporte de oxígeno y nutrientes al músculo, lo que producirá un descenso gradual y progresivo de la energía disponible. En estas circunstancias, el músculo se ve obligado a utilizar las reservas de glucógeno para sintetizar ATP a partir de glucosa, con el fin de mantener su temperatura e integridad estructural, produciéndose un cambio del metabolismo aerobio al anaerobio. A medida que se van reduciendo los niveles de ATP, se genera fosfato inorgánico que estimula la degradación de glucosa a piruvato. Esta ruta en ausencia de oxígeno continúa hasta la formación de ácido láctico, cuyo incremento provoca un descenso gradual del pH muscular, que continuará hasta que se agotan las reservas de glucógeno o se inactivan los enzimas que rigen el metabolismo muscular. Cuando se agotan las reservas musculares, la desaparición del ATP que mantiene la integridad estructural del músculo provoca una lenta despolarización de las membranas, se produce entonces un incremento en la fuerza iónica, en parte debido a la incapacidad de funcionamiento de las bombas de Ca^{+2} , Na^{+} y K^{+} ATP-dependientes, lo que ocasiona la salida de Ca^{+2} del retículo sarcoplásmico al espacio miofibrilar, además de disminuir la capacidad celular de mantener las condiciones reductoras. Estos iones Ca^{+2} reaccionan con la troponina que, como respuesta, modifica su configuración, desbloqueando los sitios activos de la actina a los que se unía. Al quedar éstos libres, las cabezas de miosina se unen a la actina, dando lugar a una unión irreversible entre ambas, justo en los puntos ocupados

antes por la troponina (Paniagua y cols., 1996). De esta forma, los filamentos finos son trasladados sobre los gruesos, produciéndose un acortamiento muscular (acortamiento del sarcómero), sin que haya acortamiento de los filamentos finos sino sólo desplazamiento. La formación de actomiosina da lugar a una tensión y rigidez muscular que conduce a la instauración del *rigor mortis* o rigidez cadavérica. Tras el *rigor* comienza la etapa de tenderización, que produce la mejora de la terneza de la carne como consecuencia fundamentalmente de la rotura de la estructura miofibrilar por parte de sistemas proteolíticos endógenos que juegan un papel determinante (Ouali 1992; Sentandreu y cols., 2002; Weaver y cols., 2009, Huff-Lonergan y cols., 2010). Sin embargo, a pesar del conocimiento acumulado a lo largo de los años sobre los procesos que conducen a la instauración del *rigor mortis* y los que ocurren durante el período de maduración *post-rigor*, no se ha conseguido explicar de forma definitiva la variabilidad en la tenderización de la carne, de forma que en los últimos años están surgiendo hipótesis que abren la puerta a nuevos campos de investigación, a través de una reconsideración del proceso de conversión de músculo en carne. La información obtenida en estudios relacionados con diversas patologías como cáncer, Alzheimer, enfermedades neuromusculares, etc (Majino y Jons, 1995; Hengartner 2000; Tews, 2005), que transcurren en condiciones similares de estrés e isquemia a las que se producen en las primeras horas tras la muerte y desangrado del animal, parece apuntar que en los cambios en la estructura celular y proteica que se observan en el músculo tras la muerte del animal y que no han sido todavía explicados, podrían participar procesos de muerte celular programada (MCP) (Ouali y cols., 2006). Estos procesos se han observado en tejidos vivos sujetos a condiciones de isquemia y se trata de estrategias que inducen el “suicidio” o muerte de algunas de sus células, con el objetivo último de asegurar la supervivencia del tejido y evitar daños mayores.

Se han descrito diferentes tipos de muerte celular, programada (apoptosis, autofagia) o no programada (necrosis). Su prevalencia en el tejido muscular dependerá de las condiciones pre- y post-sacrificio y puede afectar enormemente al proceso de conversión del músculo en carne y por tanto, a la adquisición final de un grado de terneza y calidad óptimo. Se desconoce el mecanismo de señalización que lleva a esos procesos de muerte celular programada tras el desangrado del animal, pero este primer paso puede ser de crucial importancia, puesto que todas las modificaciones posteriores que contribuyen a la transformación de músculo en carne dependerán de estos eventos tempranos. Por tanto, se hace muy importante el estudio del *pre-rigor* y, más concretamente, de los procesos que ocurren en momentos muy tempranos tras la muerte, ya que

por ejemplo en apoptosis desde que ocurren los primeros cambios mitocondriales hasta la activación de las caspasas (principal sistema proteolítico efector de apoptosis) sólo transcurren aproximadamente 10 minutos, aunque el proceso completo hasta la total destrucción celular puede durar horas o incluso días, pero una vez que ésta ha comenzado, la muerte celular es inevitable (Green, 2005).

1.4.2 Principales sistemas proteolíticos implicados en la tenderización.

A pesar de conocerse que la degradación proteolítica es responsable de la mejora de la terneza o tenderización de la carne a lo largo de la maduración, existe sin embargo, un importante debate sobre el papel y la relevancia de los principales sistemas proteolíticos implicados en este proceso. Hasta el momento, la mayor parte de los estudios se han centrado en analizar la contribución relativa de tres sistemas proteolíticos celulares: 1) las calpaínas (dependientes de calcio) y sus inhibidores endógenos las calpastatinas, consideradas por muchos como el sistema proteolítico de mayor influencia en el proceso, especialmente en el *post-mortem* temprano, ya que su actividad declina con la acidificación sucesiva del pH del músculo; 2) las catepsinas (enzimas lisosomales) activas a pHs más ácidos que las anteriores y por tanto más importantes en fases más tardías de la maduración *post-mortem*, así como sus inhibidores endógenos, las cistatinas; y 3) el sistema ubiquitina-proteosoma (dependiente de ATP). Recientemente, se han propuesto otros sistemas proteolíticos como caspasas y metaloproteinasas (Sentandreu y cols., 2002) tanto por su capacidad proteolítica sobre el músculo esquelético, como por sus posibles implicaciones en los procesos de muerte celular. Lo más probable es que, al igual que la integridad y funcionalidad de las células musculares no depende de una única proteína, sino de una interacción coordinada de varias, el debilitamiento estructural de las células musculares durante la maduración *post-mortem* no va a depender únicamente de un sistema enzimático sino de la interacción de varios (Sentandreu y cols., 2002).

1.4.2.1 Calpaínas.

La familia de las calpaínas está compuesta por 14 miembros de cisteín-proteasas no lisosomales activadas por calcio (Goll y cols., 2003), además de por los inhibidores endógenos de las mismas, las calpastatinas. Las dos isoformas mejor caracterizadas de las calpaínas son μ - y m-calpaínas, cuyos nombres hacen referencia a los requerimientos de calcio que tienen para activarse. En general, en condiciones “*in vitro*”, la μ -calpaína requiere concentraciones de entre 5 y 65 μM de Ca^{+2} mientras que la m-calpaína requiere entre 250 y 1000 μM de Ca^{+2} (Goll y cols.,

1992). Estas calpaínas son heterodímeros formados por dos subunidades, una subunidad catalítica de 80kDa, responsable de su actividad proteolítica, y una subunidad reguladora de 28kDa. La subunidad pequeña es idéntica en ambas, mientras que la catalítica es similar pero está codificada por distintos genes (Suzuki, 1990). Como sus actividades proteolíticas son potencialmente deletéreas para la célula, las calpaínas están estrechamente reguladas y se suponen inactivas la mayor parte del tiempo (Goll y cols., 2003). En ausencia de calcio, los residuos que forman la unidad catalítica están muy apartados entre sí para formar el sitio activo, debido a la presencia de puentes salinos con otras partes de la molécula. Cuando el calcio se une, estos puentes salinos se rompen permitiendo la unión de los residuos que forman el centro activo. Posteriores uniones de calcio a ambos lados de la hendidura catalítica, completan el proceso, apareciendo un centro activo completo (Moldoveanu y cols., 2002). Aunque requieren calcio para activarse, las calpaínas sufren auto-proteolisis en presencia de éste (Cong y cols., 1989). La forma autolisada de la subunidad grande (de 76kDa, que se forma a través de un intermediario de 78kDa) es activa y muestra requerimientos de calcio menores que la forma nativa, aunque la autólisis también hace que el enzima sea menos estable y finalmente produce una pérdida de actividad (Goll y cols., 2003).

En la célula, el sistema calpaínico cubre un amplio rango de funciones fisiológicas, que incluyen proteólisis de proteínas envueltas en el ciclo celular, apoptosis, organización de citoesqueleto y señales de transducción. Además, están envueltas en numerosos procesos durante la diferenciación, vida y muerte celular (Goll y cols., 2003). Así, las calpaínas están activas en todos los estadios que se suceden como respuesta al estrés celular, conduciendo a resultados diferentes dependiendo del momento específico, del compartimento donde el enzima es activado y las funciones específicas de las células.

En el tejido muscular se expresan fundamentalmente tres tipos distintos de calpaínas: las ubicuas (μ - y m - calpaína) y la calpaína 3/p94 que es activamente expresada en este tejido. Con respecto a la tenderización de la carne, durante décadas las calpaínas han centrado el interés de la mayoría de las investigaciones, debido a que estos enzimas citosólicos tienen acceso a las miofibrillas, no requieren ATP para su activación y reproducen “*in vitro*” los cambios observados en las miofibrillas, siendo capaces de alterar la densidad de la línea-Z, proceso que se observa normalmente durante la desestructuración *post-mortem* del músculo (Koohmaraie, 1988; Huff-Lonergan y cols., 1996). Además, el hecho de que en músculo bovino y ovino se produce un descenso significativo de la actividad de μ -calpaína en el *post-mortem*, mientras que la m -calpaína

permanece más o menos estable, llevó a Koohmaraie y cols. (1987) a concluir que es la μ -calpaína y no la m-calpaína la principal responsable de la tenderización. Dicha asunción ha sido apoyada por estudios posteriores (Geesink y cols., 2006) realizados con ratones knock-out para μ -calpaína, donde apenas se encontró proteólisis *post-mortem*.

Debido a su baja especificidad, las calpaínas no degradan proteínas hasta sus aminoácidos constituyentes y tampoco degradan las proteínas miofibrilares mayoritarias (actina y miosina). Sin embargo, se ha hipotetizado que su papel en el músculo es iniciar la proteólisis específica de determinadas proteínas miofibrilares como titina y nebulina y también de los filamentos intermedios (desmina) durante las primeras 24h *post-mortem* (Koohmaraie, 1992; Huff-Lonergan y Lonergan., 1999). Incluso algunos autores apuntan que estas contribuyen al 95% de la tenderización *post-mortem* inducida por proteasas (Delgado y cols., 2001). Uno de los modelos propuestos (Goll y cols., 2003; Neti y cols., 2009) sugiere que las calpaínas catalizan la liberación de los miofilamentos de las miofibrillas y los hacen disponibles al proteosoma y a los enzimas lisosomales para la completa degradación hasta sus aminoácidos constituyentes. De hecho, existen algunos trabajos que muestran evidencias de que en el tejido muscular vivo las calpaínas actúan en conjunto con el proteosoma y las proteasas lisosomales en la degradación de proteínas sarcoméricas y del citoesqueleto (Purintrapiban y cols., 2003).

La calpaína 3/p94 se expresa casi exclusivamente en tejido muscular (Sorimachi y cols., 1989) y su papel en la tenderización aún no está claro. Parr y cols. (1999) no encontraron ninguna asociación entre la expresión de calpaína 3/p94 y la dureza instrumental en carne de cerdo tras 8 días de maduración. Sin embargo, Ilian y cols. (2001) encontraron correlaciones significativas entre el ARN mensajero y la expresión de calpaína 3 con la terneza de la carne en ovino.

Diversos investigadores han demostrado que la cantidad de calpaínas en músculo y, más aún, la relación entre la concentración de calpaínas y su inhibidor endógeno, la calpastatina, son buenos indicadores de la terneza final de la carne (Ouali y Talmat 1990; Delgado 2001; Huff-Lonergan y cols., 2010). Las calpastatinas son el inhibidor endógeno de las calpaínas y están presentes en todos los tejidos donde hay calpaínas. Existe un único gen de calpastatina que contiene diversos promotores y genera por splicing alternativo distintos ARN mensajeros que dan lugar a las distintas isoformas de calpastatina (Meyers y Beever, 2008). Curiosamente éstas también requieren de calcio para unirse a las calpaínas, siendo sus requerimientos de calcio menores que los que necesitan para activarse la μ - y m-calpaína. La unión de la calpastatina a la

calpaína es reversible puesto que hay agentes quelantes de calcio que pueden causar la disociación de éstas y por tanto se cree que las calpastatinas actuarían como tamponadoras de la actividad de calpaínas (Otsuka y Goll, 1987). La calpastatina es degradada en el músculo *post-mortem* (Lonergan y cols., 2001) existiendo evidencias de que esa degradación es llevada a cabo por las calpaínas (Doumit y Koohmaraie, 1999). La tasa de inactivación de las calpaínas está relacionada con la proteólisis y tenderización *post-mortem* (Geesink y Koohmaraie, 1999; Lonergan y cols., 2001), de forma que niveles altos de calpastatinas reducen el nivel de proteólisis necesario para alcanzar un grado de terneza adecuado (Kemp y cols., 2010).

1.4.2.2 Catepsinas.

Las catepsinas son una familia de endo y exo-peptidasas localizadas en los lisosomas y activas a pHs ácidos (desde 3,5 hasta 6,5) que comprenden cisteín- (catepsinas B, H, L, X, etc), aspartil- (castepsina D y E) y serin- (catepsina G) peptidasas. Estas son sintetizadas como proenzimas que mediante una serie de cortes específicos en sus extremos amino-terminales, bien por autoproteólisis o bien por la acción de otras proteasas, son transformadas en enzimas activos (Turk y cols., 2000). Éstas poseen un alto poder hidrolítico, pudiendo alcanzar concentraciones celulares de más de 1mM (Lloyd y Mason, 1996). Su actividad es controlada por numerosos factores tales como pH, potencial redox, por la activación de determinados precursores, y también por la concentración de sus inhibidores endógenos, las cistatinas. Durante mucho tiempo se pensó que eran responsables únicamente de la degradación inespecífica intra-lisosomal, debido a su bajo pH óptimo, y a que están confinadas en dicho compartimento. Sin embargo, su alto potencial hidrolítico, junto con su capacidad para actuar fuera de los lisosomas, las implican en numerosas funciones celulares en la mayoría de tejidos y tipos celulares, tales como la iniciación de procesos de muerte celular programada, activación y procesamiento de hormonas y otros enzimas, la remodelación del hueso, etc... (Brix y cols., 2008). Su desregulación bajo condiciones anormales para la célula, conduce a la aparición de muchas enfermedades como cáncer, aterosclerosis, Alzheimer, esclerosis múltiple o desórdenes musculares (Kirschke y cols., 1995) de un modo directo, por la degradación de la matriz extracelular, o de un modo indirecto, activando a otras proteasas (Kos y Lah, 1998). También están implicadas en miopatías inflamatorias donde, junto con la acción de otras peptidasas, constituyen un importante mecanismo de degeneración de fibras musculares (Kumamoto y cols., 1997).

En el músculo, se expresan distintas catepsinas: seis cisteín peptidasas (catepsina B, L, H, S, F y K) y una aspartil proteasa (catepsina D). Existe una gran controversia sobre su posible implicación en los procesos de tenderización *post-mortem*, siendo las principales objeciones que son enzimas confinados en los lisosomas, y por tanto, no tienen acceso a las miofibrillas (Hopkins y Thompson, 2002), que durante la maduración *post-mortem* no se observa degradación de actina y miosina, siendo éstos sus principales sustratos (Koohmaraie y cols., 1991) y también que no se han observado relaciones entre la actividad de catepsinas y la variabilidad en la terneza de la carne en algunos casos (Whipple y cols., 1990). Sin embargo, diversos estudios las han implicado en el proceso de tenderización *post-mortem*; así se encontró que la actividad de catepsinas, especialmente de B, H, y L se correlaciona con la terneza desde las 24 horas *post-mortem* hasta el final del período de maduración de la carne (Jhonson y cols., 1990; O'Halloran y cols., 1997; Thomas y cols., 2004). Por otro lado, estudios histoquímicos han demostrado que con la maduración *post-mortem* se produce una rotura lisosomal, que es casi completa a los 14 días (Zeece y cols., 1992) observándose además un cambio considerable en la actividad de estas enzimas de la fracción lisosomal a la fracción citosólica (O'Halloran y cols., 1997). Una posible explicación de la rotura lisosomal puede ser el descenso de pH cuando la temperatura de la canal es todavía alta o como consecuencia de la alteración de las bombas iónicas de la membrana lisosomal durante el rigor (Hopkins, 2000; Sentandreu y cols., 2002). Además, recientemente, se ha demostrado que en los procesos de muerte celular programada se puede producir una translocación temprana de las catepsinas desde el lisosoma al citosol, manteniendo éstas su actividad, a pesar de que el pH citosólico es más elevado, gracias al efecto estabilizador que determinados fluidos fisiológicos tienen sobre las catepsinas (Broker y cols., 2005). Tampoco la asunción de que no existe degradación *post-mortem* de actina y miosina es del todo cierta, puesto que la aplicación de la proteómica en los últimos años ha permitido detectar fragmentos procedentes de la degradación de ambas proteínas durante la maduración de la carne (Lametch y cols., 2002). Además, las catepsinas podrían degradar otras proteínas implicadas en la estructura muscular, así se ha visto que la catepsina L puede hidrolizar varias proteínas miofibrilares como troponina T, I y C, nebulina, titina y tropomiosina, además de actina y miosina, en distintos tipos de carne de vacuno, conejo y pollo (Mikami y cols., 1987), aunque existen muchos otros cambios *post-mortem* que no se pueden explicar sólo por la acción de este sistema proteolítico.

Las cistatinas son un grupo de inhibidores endógenos de cisteín peptidasas que inhiben a la papaína y a las catepsinas mayoritarias B, L, H, etc. Las cistatinas, en condiciones “*in vivo*”, están

localizadas en el citoplasma, de modo que impiden la acción de las catepsinas fuera del lisosoma. Sin embargo, durante el *post-mortem* y debido a la desestabilización lisosomal, el balance catepsinas/cistatinas es lo que determinará el nivel de efectividad de la actividad de las catepsinas. Las diferencias en la calidad de la carne parecen estar más estrechamente relacionadas con este balance enzima/inhibidor que con los niveles de enzima en sí mismos. Así, los niveles de cistatinas resultaron importantes marcadores de la tenderización de la carne en algunos estudios (Shackleford y cols., 1991). Sin embargo, aún se conoce poco de estos inhibidores y se requiere encontrar métodos de detección más específicos para entender su papel en los procesos de tenderización (Sentandreu y cols., 2002).

1.4.2.3 Proteosoma.

El proteosoma (26S) es un complejo proteico multicatalítico que se encarga de destruir proteínas dañadas y controlar la concentración de determinadas proteínas necesarias para los procesos celulares. Dichas proteínas deben ser previamente marcadas con una cadena de ubiquitina que permite al proteosoma identificarlas, requiriendo este paso ATP (Taillandier y cols., 2004). Una vez que una molécula de ubiquitina se añade a una proteína a eliminar, gracias a la enzima ubiquitina ligasa, se empiezan a agregar más proteínas ubiquitina, dando como resultado la formación de una cadena poliubiquitínica que permite al proteosoma identificar y degradar dicha proteína.

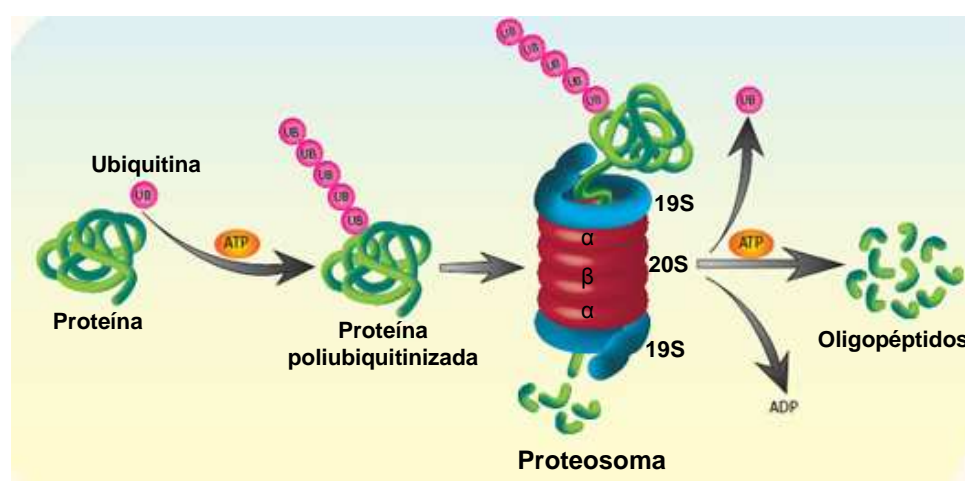


Figura 6: Esquema del mecanismo de degradación del sistema ubiquitin-proteosoma.

Estructuralmente, un proteosoma es un complejo con forma de barril (Figura 6) que contiene un "núcleo" compuesto de cuatro anillos apilados alrededor de un poro central que es la estructura catalítica (20S). Cada uno de estos anillos está compuesto por siete proteínas

individuales. Los dos anillos internos contienen subunidades proteicas β , conformando los sitios activos de las proteasas. Estos sitios se encuentran en las caras internas de los anillos, de manera que la proteína a degradar tenga que entrar por el poro antes de ser procesada. Los dos anillos exteriores contienen subunidades α , cuya función es mantener una "puerta" por la cual las proteínas puedan entrar al barril. Las subunidades α son controladas por partículas reguladoras (19S), a veces llamadas "pestañas", que reconocen los compuestos poliubiquitínicos en los sustratos de las proteínas e inician el proceso de degradación. El proceso de ubiquitinación más el proceso de degradación proteosómica recibe el nombre de sistema ubiquitin-proteosoma.

En las células eucariotas, este sistema juega un papel determinante en la proteólisis no lisosomal (Coux y cols., 1996; Attaix y cols., 2001). La degradación proteosómica es un mecanismo esencial para varios procesos celulares como el procesamiento antigénico (Stolze y cols., 2000), la diferenciación celular (Baz y cols., 1997) y la apoptosis (Anderson y cols., 2000; Pasquini y cols., 2000). También están implicadas en la degradación muscular acelerada asociada a ciertas enfermedades (Attaix y Taillandier, 1998; Lecker y cols., 1999). Se sabe que el proteosoma tiene un papel muy importante "in vivo" en la degradación del tejido muscular (Goll y cols., 2008), aunque no está aún muy claro su papel en la proteólisis *post-mortem*, si bien es cierto que el proteosoma tiene la capacidad de mantenerse activo en condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica similares a las condiciones de la carne. Sekikawa y cols. (2001) mostraron que, en músculo bovino, inmediatamente tras el sacrificio hay ubiquitina y complejos ubiquitín-proteína que son degradados por el proteosoma. Además, una vez que se produce la depleción de ATP se produce la disociación reversible del complejo proteosoma 26S en los dominios de 20S y de 19S. La subunidad 20S no requiere ni ATP ni ubiquitina (Peters y cols., 1994), ésto junto con sus altos niveles de expresión en el músculo esquelético han llevado a varios grupos a pensar que podría contribuir a la proteólisis *post-mortem* postulando que al igual que las calpaínas, podría estar implicado en la degradación de las líneas Z y M de las miofibrillas (Taylor y cols., 1995).

En condiciones "in vitro", se ha visto que las proteínas miofibrilares y las miofibrillas en sí mismas son degradadas tras tratarlas con proteosoma 20S purificado (Mickles, 1995). Además otros autores (Taylor y cols., 1995; Robert y cols., 1999) encontraron que los proteosomas bovinos podían degradar proteínas miofibrilares como nebulina, miosina, actina y tropomiosina. Un estudio realizado en carne de avestruz (Thomas y cols., 2004) demostró una actividad importante del proteosoma en el tejido después de 12 días de maduración, así como de las catepsinas D, B, L y H. Otros estudios en carne de bovino encontraron alta actividad del

proteosoma 20S a pHs por debajo de 6 a los 7 días *post-mortem* (Lamare y cols., 2002). Sin embargo Jia y cols. (2006) encontraron que, a las 24 horas *post-mortem*, ya había comenzado la degradación de varias de las subunidades del proteosoma. Houback y cols. (2008) demostraron, utilizando un inhibidor del proteosoma, que en ausencia de éste no se observaba degradación *post-mortem* de troponina T o nebulina, aunque Kohhmarai y Geesink (2006) afirmaron que el patrón de degradación de las proteínas miofibrilares incubadas con proteosoma 20S no es el mismo que el que se observa en el músculo. Por tanto, la capacidad de este sistema de degradar las mismas proteínas y del mismo modo que la degradación *post-mortem* aún está en duda, al igual que la relación de esos cambios con la calidad final de la carne.

1.4.2.4 Caspasas.

Las caspasas son una familia de cisteín proteasas que no requieren calcio y que se caracterizan por su capacidad para degradar proteínas a nivel de residuos específicos de ácido aspártico tras su propia activación, que requiere autólisis y dimerización de las mismas (Alnemri y cols., 1996; Barret y cols., 1998). Hasta hoy se han identificado 14 miembros de esta familia, que pueden dividirse según su papel en procesos de apoptosis o inflamación, clasificándose en caspasas iniciadoras (caspasas 8, 9, 10 y 12) o efectoras (caspasas 3, 6 y 7) dependiendo de su localización en las rutas de muerte celular programada (Kos y Lah, 1998; Earnshaw y cols., 1999; Fuentes-Prior y Salvensen, 2004). Se han propuesto un amplio número de rutas que conducen a la apoptosis (Earnshaw y cols., 1999) siendo el paso común en casi todas ellas la activación de las caspasas (Hengartner, 2000) y su acción a nivel de membrana y citoesqueleto disminuyendo su integridad, lo que produce un incremento de los niveles intracelulares de calcio, degradación de calpastatinas y activación de calpaínas. Además, las caspasas pueden tener otras muchas funciones en diversos procesos celulares (Beere, 2001). Estudios preios han mostrado que están envueltas en el desarrollo del músculo esquelético, y su remodelación, siendo su expresión esencial para la diferenciación muscular durante la miogénesis (Fernando y cols., 2002). También están reguladas al alza en condiciones como sarcopenia (Dupont-Versteegden, 2005) y distrofias musculares (Sandri y cols., 2001) y son rápidamente activadas en condiciones patológicas asociadas con hipoxia/isquemia (Gustafsson y Gottlieb, 2003), situaciones éstas semejantes a las condiciones *post-mortem* del músculo.

Sentandreu y cols. (2002) y Ouali y cols. (2006) apuntaron a la apoptosis como uno de los procesos de muerte celular que podría suceder de forma mayoritaria en el músculo *post-mortem* y,

por tanto, las caspasas, que son las enzimas efectoras de la apoptosis, serían las primeras peptidasas activas que podrían contribuir a la proteólisis temprana y a la tenderización. Es cierto que las caspasas estarían en condiciones más favorables que otras peptidasas para alterar estructuras celulares, puesto que éste es su papel fundamental en condiciones “*in vivo*” (Creagh y Martin, 2001) junto con la formación del apoptosoma (Tews, 2005). Se sabe que su activación “*in vivo*” ocurre rápidamente, aproximadamente 10 minutos tras el estímulo apoptótico. Esta rápida activación, junto a su capacidad para degradar proteínas asociadas al citoesqueleto como vimentina, desmina y espectrina, que tiene un importante papel estructural (Wang 2000), las convierte en marcadores potenciales de tenderización de la carne.

Teniendo en cuenta esto, se ha estudiado el efecto de las caspasas en la maduración de la carne. Kemp y cols. (2006) comprobaron en carne de cerdo que éstas se expresaban y eran activas en distinta proporción en los distintos músculos estudiados. Estos autores describieron una disminución *post-mortem*, a lo largo de 8 días de maduración, en la concentración de las caspasas 3, 7 y 9 y encontraron productos de degradación de proteínas sustrato de caspasas tales como PARP y Alpha II espectrina, que evidenciaban su actividad. En un estudio posterior, estos autores (Kemp y Parr., 2008) demostraron con caspasa 3 recombinante humana, la capacidad de estas enzimas para reproducir “*in vitro*” los mismos patrones de degradación miofibrilar que se producen en la maduración *post-mortem* del tejido muscular, causando la degradación de troponina I y desmina. Coincidiendo con esto, otros autores encontraron correlaciones significativas entre la expresión de determinados factores relacionados con apoptosis y la calidad de la carne (Bernard y cols., 2007). Sin embargo, Underwood y cols. (2008) examinaron la actividad de la caspasa 3 durante la maduración *post-mortem* en músculo de bovinos y, aunque ésta estaba activa, no observaron ningún cambio significativo en un período comprendido entre 0 y 240 h *post-mortem*, ni tampoco encontraron ninguna asociación entre ésta y la terneza final de la carne.

1.4.2.5 Metaloproteinasas.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una gran familia de metaloendopeptidasas zinc-dependientes que se encargan del remodelado de la matriz extracelular y que, en conjunto, pueden degradar todos los constituyentes de la misma. Las MMPs y sus inhibidores tisulares endógenos (TIMPS) son sintetizadas y secretados por varios tipos celulares entre los que se encuentran las células musculares y su expresión parece ser dependiente del tipo de fibra (Balcerzak y cols., 2001). El músculo esquelético bovino muestra muchas actividades de MMPs y

RNA mensajero distintos: MMP-1, -2, -9, -14, -16, sus inhibidores endógenos (TIMP)-1, -2, -3, el activador plasminógeno y su receptor. La síntesis de algunas de estas MMPs aumenta drásticamente tras una serie de condiciones patológicas tales como heridas musculares, denervación, anoxia, y tienen un papel fundamental en embriogénesis (Sentandreu y cols., 2002).

Los cambios que transforman el músculo durante la maduración *post-mortem*, no sólo afectan al componente miofibrilar, principal responsable de la dureza inicial de la carne, sino que también ocurren a nivel del tejido conectivo, que a su vez puede tener un importante papel sobre la dureza de la carne, dependiendo de su densidad y solubilidad. Esto ha despertado el interés por esta familia de peptidasas, que además de degradar los distintos tipos de colágeno, son capaces de degradar proteínas que conectan el sarcolema con la matriz extracelular, los ditroglicanos asociados a membrana y las placas neuromusculares (Frisdal y cols., 2000; Yamada y cols., 2001).

El colágeno juega un papel muy importante en la textura de la carne y se piensa que contribuye a la dureza residual de la misma (Bailey, 1985). Sin embargo no existen evidencias claras de que ocurra degradación del colágeno durante la maduración, aunque algunos estudios apuntan a un debilitamiento del perimisio y del endomisio durante el almacenamiento prolongado de la carne (Nishimura y cols., 1998). La actividad de las MMPs durante la maduración ha sido estudiada por Sylvestre y cols. (2002) en corderos, encontrando degradación *post-mortem* de colágeno y una pequeña actividad de MMPs que podrían estar implicadas en ese catabolismo y, por tanto, en los cambios que ocurren en el músculo. Estos resultados hacen necesario un estudio más profundo de la regulación *ante-* y *post-mortem* de estos sistemas proteolíticos, de los sitios de ataque a las distintas isoformas de colágeno y de su posible relación con la calidad final de la carne.

1.4.3 Principales cambios *post-mortem* en la arquitectura del músculo.

Los principales cambios que se producen en la arquitectura del músculo son el acortamiento sarcomérico y posteriormente, durante la maduración de la carne, cambios proteolíticos en la arquitectura de las miofibrillas y sus proteínas asociadas.

Estudios proteómicos recientes estiman que la estructura sarcomérica está compuesta de al menos 65 proteínas, sin contar las distintas isoformas que se coordinan estrechamente entre sí (Fraterman y cols., 2007). Hay muchas proteínas clave localizadas en distintas regiones de la célula muscular (Figura 7), como por ejemplo en o cerca de la línea Z o de la banda I, que están

implicadas de algún modo en el mantenimiento de la estructura y función de la célula muscular y que son degradadas durante el proceso de tenderización *post-mortem*.

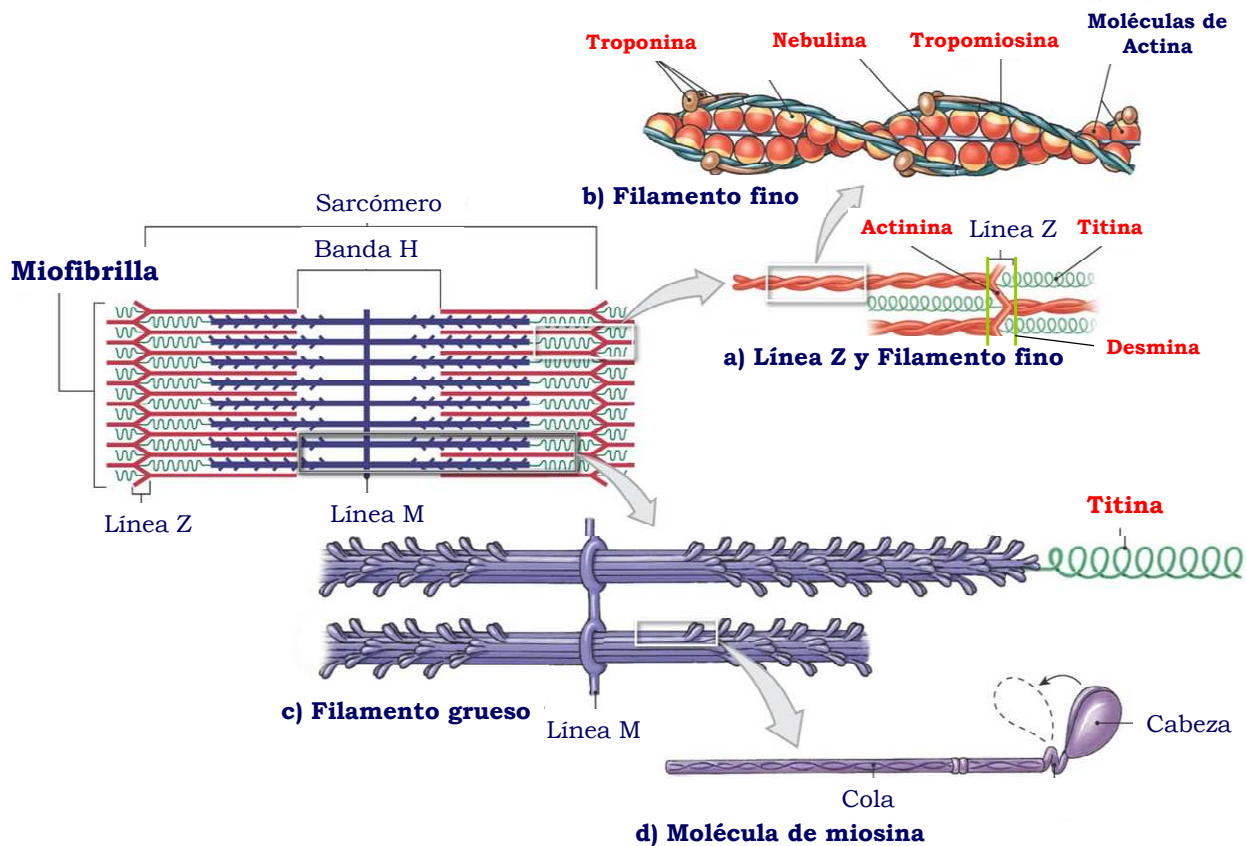


Figura 7: Principales proteínas implicadas en la estructura miofibrilar.

La miosina y actina son las proteínas más abundantes de las miofibras del músculo esquelético y contribuyen notablemente a mantener la estructura y fuerza tensil del músculo. Se pensaba que ninguna de ellas sufría degradación *post-mortem*, sin embargo gracias a las nuevas tecnologías de proteómica, Lametsch y cols. (2002) consiguieron separar en carne de cerdo hasta 11 fragmentos distintos de actina, que variaban en pesos de 4 a 26 kDa y pH de 4,52 a 5,5, mostrando, claramente, que la actina es objeto de degradación *post-mortem*. Más tarde se demostró también degradación *post-mortem* de la miosina y parece ser que ésta puede ser llevada a cabo por μ -calpaína (Lametsch y cols., 2004). Esto tiene mucha importancia, ya que cualquier modificación, por pequeña que sea, a nivel de los complejos de actomiosina puede afectar a la accesibilidad de las proteasas a sus sustratos (Weaver y cols., 2007) e influir notablemente en la solubilidad de estas proteínas y en la oposición al corte de las fibras y ha de ser tenido en cuenta por su posible contribución a la calidad de la carne.

La troponina es una proteína globular presente a nivel de los filamentos finos del músculo, y compuesta por tres subunidades globulares: troponina T, que proporciona un punto de unión entre la tropomiosina y la troponina, troponina C, que es la responsable de la fijación del calcio necesario en el proceso de la contracción muscular, y la troponina I que tiene una función inhibidora de la ATPasa de los complejos de actomiosina. Existen suficientes evidencias de que la degradación de la troponina T con la maduración (que parece ser llevada a cabo por la μ -calpaína) y la subsiguiente aparición de fragmentos de aproximadamente 30kDa está altamente correlacionada con la terneza de la carne (Olson y Parrish., 1977; Rowe y cols., 2004a). Esta degradación puede conducir a una desestabilización de la estructura sarcomérica a nivel de los filamentos finos.

Además, se ha descrito también degradación de diversas proteínas accesorias que mantienen la alineación entre filamentos finos y gruesos. Entre ellas destacan la titina (la tercera en abundancia en el músculo), una megaproteína de 3MDa cuya función es mantener el alineamiento sarcomérico de la miofibrilla durante la contracción, y la nebulina, también una mega-proteína (600-900kDa) que se asocia con los filamentos finos de actina, constituyendo una asociación que puede anclar los filamentos finos a la línea Z del sarcómero. La degradación de ambas produciría debilitamiento de la estructura sarcomérica y por tanto de la estructura muscular. Degradación de titina en carne se ha observado en numerosos estudios (Zeece y cols., 1986; Melody y cols., 2004, Rowe y cols., 2004a) produciéndose un fragmento denominado T2, de aproximadamente 2400kDa, y otro de aproximadamente 1200kDa. Este último aparece más tempranamente en carne con menor dureza instrumental y mejores valores de terneza sensorial (Huff- Lonergan y cols., 1995, 1996b). Igualmente, la degradación de nebulina se correlaciona con la tenderización *post-mortem* de la carne en diversos trabajos (Huff- Lonergan y cols., 1995; Melody y cols., 2004), así como la de desmina, proteína de los filamentos intermedios localizada en la periferia de la línea Z. Los filamentos intermedios conectan miofibrillas adyacentes al nivel de la línea Z y también miofibrillas a otras estructuras celulares como el sarcolema, por lo que son muy importantes manteniendo la integridad estructural de las células musculares (Robson y cols., 1989, 1995). Se ha descrito que la desmina es más rápidamente degradada en la carne de menor dureza y mayor capacidad de retención de agua (Huff-Lonergan y Lonergan., 1999; Zhang y cols., 2006).

El interés económico que despiertan estos procesos hace que numerosos investigadores centren sus estudios en ellos, y en particular, en la búsqueda de marcadores biológicos que

consigan detectar la calidad del producto, así como su estado de maduración. Durante los últimos años, se han hecho grandes avances en el estudio de la proteómica, es decir, en el análisis del contenido proteico celular o proteoma del músculo, y su evolución a lo largo de la maduración, con el fin de analizar su relación con la evolución de la calidad de la carne, así como identificar fragmentos proteicos que puedan funcionar como marcadores de calidad (Lametsch y cols., 2004; Bernard y cols., 2007; Hollung y cols., 2009). Siguiendo esta metodología, Bouley y cols. (2004) consiguieron identificar en el músculo de terneros añojos de raza Charolais un amplio número de proteínas, con función metabólica (25,5%), estructural (17%), de defensa celular (16%) y del aparato contráctil (14,5%), además de identificar distintas isoformas de la troponina T y pudieron diferenciar proteínas fosforiladas, lo que permite aplicar este método en el estudio de la fisiología del músculo de animales con distinto manejo o genética. En este sentido, un año más tarde los mismos autores (Bouley y cols., 2005) analizaron el proteoma de animales con el gen de la hipertrofia muscular, encontrando diferencias como consecuencia de la mutación en varias proteínas del aparato contráctil, entre ellas troponina T, y también en proteínas metabólicas como la fosfoglucomutasa (PGM) y la proteína de unión de ácidos grasos cardíaca (H-FABP).

La identificación de marcadores en la carne durante las primeras horas *post-mortem* es de gran interés científico, pero además tiene una aplicación directa en el sector, ya que podría transferirse a las empresas para ser utilizados como herramienta para discriminar, desde los primeros pasos de la cadena, la calidad de distintos canales y tomar decisiones sobre su destino o incluso sobre el método de conservación más adecuado para cada una. No obstante, hay que ser conscientes de que conlleva la utilización de técnicas analíticas de alto coste y que requieren un tiempo de espera relativamente alto, por lo que es preciso orientar las investigaciones hacia el desarrollo de métodos de predicción rápidos y no destructivos que permitan controlar los parámetros de calidad citados.

1.4.4 Desarrollo de métodos on-line para el control y trazabilidad de los productos: Aplicación de la tecnología NIRS.

La mayor parte de los métodos analíticos que se utilizan para analizar las características y calidad de la carne tienen una aplicación práctica muy limitada al ámbito de la investigación, ya que en su mayoría se trata de métodos destructivos (requieren, como mínimo, el despiece de la canal y el picado de la carne), laboriosos (precisan varias horas o días para la obtención del resultado) y requieren la asistencia de personal técnico especializado y métodos analíticos costosos. Para evitar estos problemas, en los últimos años se ha enfocado la investigación

científica hacia el desarrollo de técnicas analíticas rápidas y no destructivas que puedan utilizarse en los primeros pasos de la cadena de procesado y permitan la predicción de la calidad final del producto.

La espectroscopia en el infrarrojo cercano (Near Infrared Spectroscopy: NIRS) es una tecnología basada en la absorción de radiación en la región del espectro electromagnético situado entre 700 y 2500 nm, que permite obtener información bastante completa de la composición química de la matriz analizada. Esta metodología surgió en la década de los 60, como herramienta de análisis de productos agroalimentarios, fundamentalmente piensos y forrajes. En la actualidad, la espectroscopia en el infrarrojo cercano ha demostrado ser una técnica analítica de una gran versatilidad, rapidez, eficacia, y con un bajo coste de mantenimiento (Prevolnik y cols., 2004), lo cual ha contribuido a que durante la última década se haya extendido su aplicación a campos de índole tan diversa como el diagnóstico clínico (Quaresima y cols., 2003), la industria farmacéutica (Reich, 2005), la industria bioquímica (Chen y cols., 2005), y la industria alimentaria, utilizándose en este último caso para el análisis de productos tan diversos como la leche (Sivakesava y Irudayaraj, 2002), el pescado (Cozzolino y cols., 2005) o la carne (Alomar y cols., 2003; Liu y cols., 2003; Prieto y cols., 2008a).

La técnica NIRS consiste esencialmente en la emisión de un haz de luz sobre una muestra, la cual, en función de su composición, es decir, de la naturaleza de los enlaces presentes en sus moléculas, absorberá una determinada cantidad de energía al ser irradiada. La absorción de energía por la muestra hace que los enlaces entre C-H, O-H y N-H, componentes principales de la estructura básica de las sustancias orgánicas, vibren de distintas formas. La manera más usual de cuantificar esta absorción en el infrarrojo cercano es a través de la medida de la energía (radiación electromagnética), bien sea la reflejada por la muestra a diferentes longitudes de onda (reflectancia "R"), en cuyo caso se habla de espectroscopia NIR, o bien la transmitida a través de la muestra (transmitancia "T") o espectroscopia NIT. La aplicación de la tecnología NIRS para el análisis cuantitativo se basa en el desarrollo de ecuaciones de calibración que establezcan la relación entre los valores espectrales ($\log 1/R$ o $\log 1/T$) y los del método analítico de referencia. No obstante, debido a la complejidad de la información espectral, el análisis de los datos espectroscópicos precisa la utilización de herramientas quimiométricas complejas, generalmente métodos de análisis multivariante, que permitan estimar características de la muestra a partir de múltiples variables espectrales simultáneamente. Para ello se utilizan programas informáticos específicos, que permiten elaborar estos cálculos complejos e incluso mejorar la selectividad de la

información espectral, mediante la aplicación de tratamientos matemáticos, como la corrección “scattering”, que permite corregir errores debidos a la dispersión de la radiación por fenómenos físicos como la textura, el tamaño y la geometría de las partículas, o el tratamiento de derivadas, aplicado para reducir problemas debidos a la superposición de los picos de absorción. Para información mas detallada sobre el fundamento de la espectroscopia en el infrarrojo cercano, así como una descripción exhaustiva de los diferentes tratamientos matemáticos y estadísticos que se llevan a cabo para obtener ecuaciones de predicción, referimos al lector a trabajos de Shenk y Hoover (1976), Osborne y cols., (1993) y Williams y Norris (2001).

Desde que en 1968 Ben-Gera y Norris desarrollaron un espectrofotómetro NIRS computerizado para el análisis de la carne, se han realizado numerosas investigaciones para la aplicación de esta tecnología en carne y productos cárnicos. Sin embargo, hasta hace poco tiempo su aplicación estaba limitada al ámbito del laboratorio, debido a los requisitos ambientales (temperatura, limpieza, quietud, muestras patrón) que precisan los equipos NIRS de investigación. Además, en el caso particular de la carne, la obtención de espectros NIRS requería un homogeneizado previo de la muestra, que debía presentarse picada, con lo que no podía aplicarse en el estudio de piezas o músculos intactos. Actualmente esto está cambiando, gracias al desarrollo de equipamientos NIRS portables con tecnología post-dispersiva, que pueden utilizarse en cualquier lugar, junto con la fabricación de sondas de superficie que permiten la obtención de espectros directamente sobre el músculo o la canal, lo que está permitiendo el desarrollo de ecuaciones NIRS de aplicación “*on-line*” real, que pueden ser utilizadas por las empresas cárnicas para el control de calidad de los productos en mataderos, salas de despique, almacenes o lineales de carnicería (Pérez-Marin y cols., 2009).

La metodología NIRS permite predecir con precisión la composición química del producto, es decir, su contenido de humedad, proteína, grasa y carbohidratos (Alomar y cols., 2003; Prieto y cols., 2006; Ripoll y cols., 2008), además de otras características físico-químicas y sensoriales de gran interés como son el pH (Cozzolino y Murray, 2002; Andrés y cols., 2008), la capacidad de retención de agua (Brondum y cols. 2000; Geesink y cols., 2003), la dureza y aceptabilidad (Hildrum, 1994; Venel y cols., 2001; Prieto y cols., 2009) y el contenido de pigmentos hemínicos y color (Oliván y cols., 2001c; Prieto y cols., 2006; Andrés y cols., 2008).

Por otro lado, la metodología NIRS también presenta muchas opciones para el desarrollo de modelos de clasificación o autenticación de los productos según distintas pautas de

producción o de manejo (raza de origen, sistema de alimentación, tiempo de maduración, composición, etc). Esto se consigue gracias a la obtención de un modelo óptico característico de cada muestra estudiada, que puede funcionar como su “huella dactilar”, permitiendo identificar a qué población de muestras conocida pertenece una muestra desconocida. Este método abre numerosas alternativas para el control de calidad de los productos, no sólo de cara al consumidor sino también para el control de las materias primas en las empresas de elaboración de productos cárnicos. Así, se ha demostrado que la tecnología NIRS permite detectar si una carne es fresca o ha sufrido congelación y descongelación (Downey y Beauchêne, 1997). También puede aplicarse para identificar con qué especies animales se ha elaborado una hamburguesa (Ding y cols., 1999) o para detectar adulteración en la carne picada (Ding y Xu, 2000).

Aspectos tan de actualidad como la autenticación de la carne en función de una raza, edad o sistema productivo también pueden abarcarse con la técnica NIRS. Oliván y cols. (2003c) en un estudio con carne de tres razas bovinas españolas (AV, AM y Pirenaica) demostraron que el análisis quimiométrico del espectro NIT permite clasificar adecuadamente en su grupo racial un 85,9% de las muestras. Prieto y cols. (2008b) consiguieron discriminar el 100% de muestras de carne bovina con respecto a la edad y estado fisiológico (terneros jóvenes enteros frente a adultos castrados) amparados por la marca de calidad “Valles del Esla”. En cuanto a la discriminación según el tipo o sistema de alimentación, los espectros NIRS han permitido discriminar de forma aceptable la carne proveniente de terneros alimentados con pasto o con silo de maíz (Cozzolino y Murray, 2002), en el caso de pollos, discriminar los de producción industrial y los camperos (Fumière y cols., 2000), en corderos ha permitido una correcta discriminación de animales alimentados a base de pasto o a base de concentrados (Dian y cols., 2007) y diferenciar en conejos entre producción orgánica y convencional (Pla y cols., 2007). En porcino, se ha comprobado que la espectroscopia en el infrarrojo cercano resulta viable no sólo para predecir el perfil de ácidos grasos, sino también para clasificar las canales, pudiéndose utilizar incluso para determinar el tipo de alimentación (bellota, recebo, pienso) que ha recibido el animal (García Olmo y cols., 2001). Liu y cols. (2003) evaluaron la capacidad de clasificación de la carne según su grado de ternura mediante tecnología VIS-NIRS (que utiliza no solo la región del infrarrojo sino la del rango visible) consiguiendo clasificar correctamente muestras de filetes de novillos de las razas Angus o Hereford como duras o tiernas. En un estudio posterior, Price y cols. (2008) consiguieron una clasificación correcta (92% aciertos) de muestras de carne en tres categorías (tierna, dura o intermedia) según sus valores de dureza instrumental.

En base a todo lo expuesto en esta introducción, se propone la presente Tesis Doctoral, que abordará el estudio del efecto de la raza y el gen de la hipertrofia muscular sobre la calidad de la carne de vacuno de machos añejos de las razas bovinas asturianas cebados en intensivo, así como la evolución *post-mortem* de los parámetros de calidad y las posibilidades de aplicación de la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS) para una detección rápida y precisa de la calidad de los productos.

Objetivos

1. Objetivos.

El **objetivo general** planteado en esta Tesis Doctoral es:

Estudiar la evolución *post-mortem* de indicadores de calidad en la carne de vacuno de machos añejos cebados en intensivo procedentes de distintos biotipos de las razas autóctonas “Asturiana de los Valles” y “Asturiana de la Montaña”, según la raza y el gen de la hipertrofia muscular, amparados por la IGP “Ternera Asturiana”, así como desarrollar herramientas analíticas que permitan una predicción “*on-line*” de la calidad de los productos.

Dicho **Objetivo general** se desglosó en los siguientes **Objetivos parciales**:

- 1) Analizar el efecto de la raza y el gen de la hipertrofia muscular sobre la actividad de enzimas proteolíticos (catepsinas y calpaínas) a lo largo de la maduración de la carne y su influencia en el proceso de tenderización y en la conversión del músculo en carne.
- 2) Identificar cambios en el perfil proteico de distintas fracciones celulares del tejido muscular (sarcoplásmica, miofibrilar) y establecer posibles relaciones con el patrón de tenderización del músculo en los distintos biotipos estudiados.
- 3) Analizar el efecto de la raza y el gen de la hipertrofia muscular sobre la calidad físico-química y sensorial de la carne y establecer el tiempo óptimo de maduración de los productos procedentes de los distintos biotipos.
- 4) Evaluar el potencial de la espectroscopia en el infrarrojo cercano, más concretamente, la espectroscopia por transmitancia (NIT) para predecir parámetros indicativos de calidad de la carne de los diferentes biotipos estudiados.
- 5) Proponer nuevas estrategias para el estudio de la tenderización de la carne, indagando en el conocimiento de los distintos procesos de muerte celular y sus marcadores asociados para explicar el proceso de conversión del músculo en carne.

2. Publicaciones Generadas.

Los resultados obtenidos en esta Tesis han dado lugar a la redacción de 5 artículos científicos que constituyen la presente Memoria de Tesis Doctoral. Dichos artículos recogen la información obtenida a partir de los objetivos propuestos anteriormente, según la siguiente distribución:

Objetivos 1 y 2:

Caballero B., Sierra V., Oliván M., Vega-Naredo I., Tomás-Zapico C., Álvarez-García O., Tolivia D., Hardeland R., Rodríguez-Colunga M.J., Coto-Montes A. (2007). Activity of cathepsin isoforms along beef aging related with mutations in myostatin gene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 192-199.

Sierra V., Fernández-Suárez V., Castro P., Osoro K., Rodríguez-Colunga M. J., Vega-Naredo I., García-Macía M., Coto-Montes A., Oliván M. Post-mortem evolution of calpains and proteolytic profile in meat from different biotypes included in the PGI “Ternera Asturiana” showing distinct tenderization pattern. *Meat Science*. En Evaluación. MEATSCI-D-10-00520.

Objetivo 3:

Sierra V., Guerrero L., Fernández-Suárez V., Martínez A., Castro P., Osoro K., Rodríguez-Colunga M. J., Coto-Montes A., Oliván M. (2010). Eating quality of beef from biotypes included in the PGI “Ternera de Asturias” showing distinct physicochemical characteristics and tenderization pattern. *Meat Science*, 86, 343-351.

Objetivo 4:

Sierra V., Aldai N., Castro P., Osoro K., Coto-Montes A., Oliván M. (2008). Prediction of the fatty acid composition of beef by near infrared transmittance spectroscopy. *Meat Science*, 78, 248-255.

Objetivo 5:

Sierra V., Vega-Naredo I., Coto-Montes A., Oliván M. Cell death processes and markers: a novel approach to deal with meat quality. *Journal of Food Science*. En Evaluación. JSF-2010-0348.

Discusión

Asturias es una región que se distingue por la producción de carne de calidad amparada por la IGP “Ternera Asturiana”, que engloba distintos productos de las razas autóctonas “Asturiana de los Valles”, “Asturiana de la Montaña” y sus cruces. Las marcas de calidad pretenden garantizar el origen, el sistema productivo y las características de los productos, de modo que su éxito en el mercado dependerá del grado en que puedan satisfacer las expectativas del consumidor, siendo la falta de homogeneidad en la calidad de los productos uno de los principales retos de la industria cárnica para ganarse la confianza del consumidor.

De los distintos factores que pueden influir sobre la calidad de la carne, en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio de los efectos de la raza y el gen de la hipertrofia muscular sobre determinados parámetros bioquímicos, físico-químicos y sensoriales y sus cambios a lo largo de la maduración *post-mortem*, con especial referencia a los procesos de tenderización de la carne y la aplicación predictiva de la tecnología NIRS. Sin embargo, los distintos proyectos que han dado lugar al desarrollo de esta Tesis han abordado objetivos más amplios, incluyendo el estudio de otras variables bioquímicas e histológicas, así como las relaciones existentes entre ellas, lo que ha permitido obtener una información multidisciplinar sobre los procesos de transformación que ocurren en el músculo tras el sacrificio y a lo largo de la maduración *post-mortem* de la carne, por lo que se cuenta con información adicional que será considerada en esta discusión, con el fin de tener una visión general que permita una interpretación global de los resultados.

Variables Físico-químicas

De las distintas variables físico-químicas estudiadas, conviene destacar, por su relevancia sobre la calidad del producto, las siguientes:

La tasa de descenso del pH en las primeras 24 h *post-mortem*, que tiene gran influencia sobre los procesos de maduración de la carne, y que mostró diferencias significativas entre los distintos biotipos estudiados. En general, la carne de los animales de raza AV con presencia de la mutación en el gen de la miostatina, presentó pHs más bajos que la de biotipos normales de la misma raza (AV) o de la raza rústica (AM) (Figura 8a), lo que puede deberse al efecto conocido de la mutación sobre la composición de las fibras musculares, habiéndose asociado el gen con una mayor proporción de fibras de contracción rápida y glicolítica, así como con un metabolismo más glicolítico en general (Gagnière y cols., 1997, Gil y cols., 2001; Oliván y cols., 2004a). Estas diferencias se detectaron desde los primeros momentos tras el sacrificio del animal (2h *post-*

mortem), cuando el pH ya era significativamente más bajo en el músculo de los animales homocigotos culones (*mb/mb*), lo que corrobora la existencia de un metabolismo más glicolítico, que puede influir sobre la actividad de determinados enzimas proteolíticos, como se comentará más adelante, y además tener influencia sobre parámetros de calidad fundamentales como la capacidad de retención de agua de la carne, debido a una mayor desnaturalización de las proteínas (Offer y Knight, 1988; Bertram y cols., 2003; Bee y cols., 2007).

La composición de la carne se vió afectada por la raza y el gen de la hipertrofia muscular, de modo que, en general, la carne de los animales de raza AM presentó mayor contenido graso, menor contenido acuoso y proteico y mayor contenido de pigmentos hemínicos (mioglobina), coincidiendo estos resultados con los obtenidos en estudios previos realizados no sólo en la raza AM (Gil y cols., 2001; Oliván y cols., 2004a; Aldai y cols., 2006) sino también en otras razas rústicas españolas como Morucha, Avileña o Retinta (Campo y cols., 1999; Gil y cols., 2001; Vieira y cols., 2009). Del mismo modo, el bajo contenido en grasa intramuscular de la carne de los animales AV (*mb/mb*) ha sido referido en otras razas con presencia de hipertrofia muscular como la Piamontesa o la Azul Belga (Cliquart y cols., 1997; Fiems y cols., 1998, De Smet y cols., 2000).

También **la capacidad de retención de agua** depende del biotipo, de modo que la hipertrofia muscular se asocia con una menor capacidad de retención de agua, tanto en la raza AV, en la que se ha descrito que la carne de los animales culones (*mb/mb*) tiene una capacidad de retención de agua significativamente menor que la del resto de biotipos, incluso que la de los animales heterocigotos (*mb/+*) (Oliván y cols., 2004a; Aldai y cols., 2006), como en otras razas con hipertrofia muscular, como la Azul Belga (Uyterhaegen y cols., 1994; De Smet y cols., 2000). Esto puede estar relacionado con el bajo grado de engrasamiento (hay que recordar que la grasa tiene un efecto aislante), el metabolismo más glicolítico asociado a la hipertrofia muscular, las diferencias en la estructura de colágeno, así como con una mayor o más rápida actividad proteolítica en el músculo de este biotipo, que podría provocar una desestabilización de la estructura miofibrilar y mayores pérdidas de agua.

La **dureza instrumental** de la carne de los distintos biotipos incluídos en este estudio presentó variaciones a lo largo de los distintos años estudiados. Es ampliamente conocida la gran variabilidad, que permanece aún sin explicación, ligada a los procesos de adquisición de la ternera de la carne, que es patente incluso en situaciones en las que se controlan minuciosamente las condiciones de manejo animal pre y post-sacrificio (Johnston y cols., 2001; Purchas y cols., 2002;

Purslow y cols., 2008), y que puede estar asociada con la variabilidad individual del animal, así como a parámetros ligados al momento del sacrificio, en particular cuando se abarcan estudios realizados a lo largo de distintos años.

A pesar de estas variaciones, los datos mostrados en esta Tesis apuntan que, en general, la carne de los terneros con hipertrofia muscular (*mb/mb* y *mb/+*) mostró tasas de tenderización más rápidas que la de los animales de genotipo normal (+/+) AV o AM y el cruce AVxAM, si bien a tiempos más largos de tenderización se igualaron los valores finales de dureza de la carne entre biotipos, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Estos resultados coinciden con los de Sañudo y cols. (2004) quienes apuntaban que el tiempo de maduración tiende a reducir las diferencias en textura de la carne, independientemente de la raza.

Actividad de los principales sistemas proteolíticos

Entre las distintas proteasas, la μ -calpaína es el enzima al que se le atribuyen los mayores efectos sobre la tenderización de la carne (Koohmaraie y Geesink, 2006). En nuestros estudios, si consideramos de forma conjunta la actividad detectada de las dos formas (nativa y autolisada) de μ -calpaína, se observó una disminución de la actividad enzimática a lo largo del tiempo de maduración *post-mortem* de la carne (Figura 8b), ocurriendo este descenso más tempranamente y de forma más acusada (entre las 24 y las 48 horas) en el músculo de los animales AV (*mb/mb*) que en el resto de biotipos. Esto puede estar relacionado con el metabolismo más glicolítico y el descenso más rápido de pH en el músculo de este biotipo, como se ha comentado anteriormente (Figura 8a).

Otros autores han descrito que un descenso más temprano del pH, acompañado por una mayor concentración de calcio citoplasmático, debido a una desregulación de los canales iónicos, puede provocar una activación más temprana del enzima (Rhee y cols., 2006), aunque también puede acelerar la autólisis que sufre el enzima en presencia del calcio, lo que finalmente resultaría en detrimento de su actividad (Melody y cols., 2004; Pomponio y cols., 2010). Esto podría explicar los bajos niveles de actividad de μ -calpaína encontrados en el músculo del biotipo AV (*mb/mb*) comparado con otros biotipos.

La carne del biotipo heterocigoto AV (*mb/+*) presentó niveles intermedios de actividad de la μ -calpaína, siendo la carne de los animales normales (+/+) de ambas razas (AV y AM) la que mostró niveles más elevados de actividad enzimática y un descenso más tardío, igualando sus niveles con los de los biotipos (*mb/mb* y *mb/+*) a los 7 y 14 días *post-mortem*.

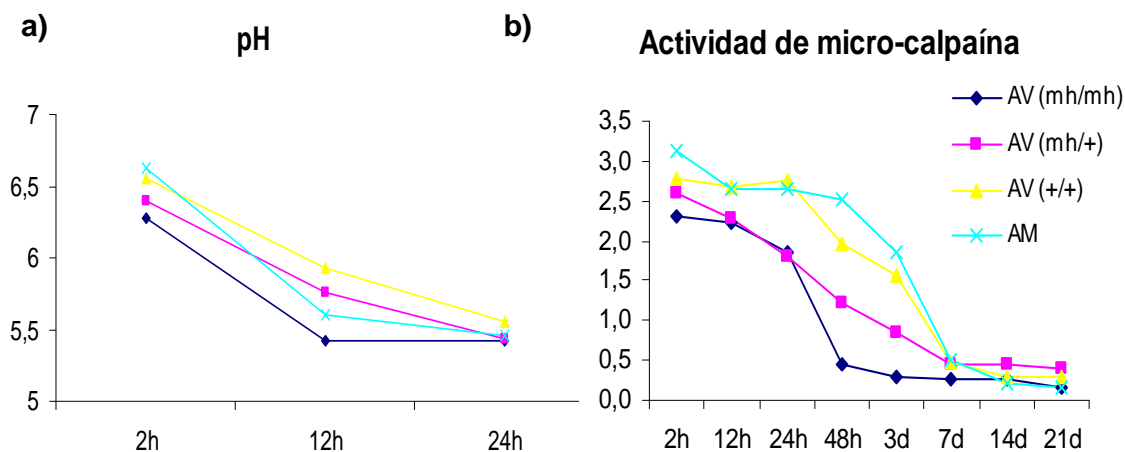


Figura 8: Descenso del pH (a) y la actividad microcalpaína (nativa y autolisada) (b) a lo largo de la maduración *post-mortem* en los distintos biotipos estudiados.

En general, el patrón de actividad de la μ -calpaína con niveles más altos en el *post-mortem* temprano y reduciéndose con la maduración fue similar en el músculo de los distintos biotipos estudiados, aunque mostró una evolución más acelerada en la carne de los animales culones. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio de la actividad de catepsinas, lo que corrobora la relación entre la tenderización de la carne y la hipertrofia muscular. Así, en nuestro estudio, las actividades de catepsinas B, B+L, H y D analizadas en dos extractos celulares (lisosoma y citosol) fueron más elevadas en tiempos tempranos de maduración (3-7 días) en la carne procedente de animales con presencia del gen de la hipertrofia muscular (*mh/mh* y *mh/+*) que en la de los normales de ambas razas, presentando diferencias significativas sólo en el extracto citosólico y ocurriendo un descenso de la actividad a los 14 días en el caso de terneros AV (*mh/mh*) y 21 días en la carne de AV(*mh/+*), manteniéndose la actividad en la carne de los animales normales (+/+) de ambas razas hasta los 14 y 21 días *post-mortem*. Estas diferencias pudieron también estar relacionadas con el pH último de la carne, que fue más bajo en los terneros culones, lo que podría haber activado una ruptura más temprana de la membrana lisosomal, y por tanto, una liberación más temprana de las catepsinas lisosomales al citosol, además de que éstos animales alcanzarían antes un pH citosólico más óptimo para estos sistemas enzimáticos, que requieren ambientes ácidos.

El análisis multivariante de estos cambios, junto con las principales variables físico-químicas relacionadas con los procesos de tenderización (pH, pérdidas de jugo, dureza instrumental) permitió definir dos grupos de variables (Oliván y cols., 2004b) tal y como muestra la Figura 9.

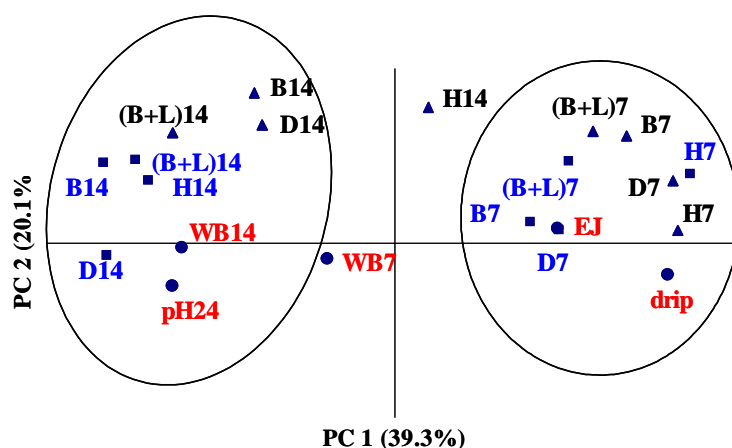


Figura 9. Análisis de Componentes Principales de características físico-químicas (●, letras en rojo) y actividades enzimáticas (■: en lisosomas, ▲: en citosol) a los 7 y 14 días *post-mortem*.

El primer grupo incluye pérdidas de jugo (*drip loss* y pérdidas de jugo por presión o *expressible juice* “EJ”) y alta actividad de las catepsinas (H, D, B y B+L), tanto en el citosol como en los lisosomas, a los 7 días *post-mortem*. Esto implica que la carne con alta actividad proteolítica a los 7 días de maduración muestra mayores pérdidas de jugo. Este grupo de variables aparece negativamente correlacionado con otro grupo compuesto por dureza instrumental (WB) a los 14 días *post-mortem* y alta actividad enzimática de catepsinas en los lisosomas (B, B+L, H y D) y en el citosol (B, B+L y D) a los 14 días, es decir, con las variables que identifican las carnes de tenderización más lenta, que muestran mayores valores de dureza y mayor actividad de catepsinas, tanto en el lisosoma, como en el citosol a tiempos largos de maduración.

En general, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apoyan la idea de que las calpaínas serían las responsables de los cambios que ocurren en el *post-mortem* temprano, mientras que las catepsinas cobrarían mayor relevancia en tiempos más avanzados de la maduración de la carne (Calkins y Seideman, 1988; Zeece y cols., 1992). Sin embargo, quizás no se debería subestimar el papel de las catepsinas en tiempos tempranos de maduración, ya que se han encontrado correlaciones significativas entre la actividad de catepsinas libres y la ternura de la carne desde las 24h *post-mortem* hasta el final del período de maduración (Calkins y Seideman, 1988; Johnson y cols., 1990; O’Halloran y cols., 1997). Además, diversos autores (Chambers y cols., 1994; O’Halloran y cols., 1997) han encontrado mayor actividad de catepsinas B, L y D en la fracción soluble que en la lisosomal a tiempos muy tempranos de maduración (0 y 3h *post-mortem*). De forma análoga, en otros estudios realizados en nuestro laboratorio hemos encontrado mayor actividad de catepsinas (B y D) en el extracto citosólico que en el lisosomal en el *LD*

bovino en tiempos muy tempranos (2h) *post-mortem* (García-Macía, 2009). Esto podría ir ligado a procesos de muerte celular programada, en los que se produce una traslocación temprana de las catepsinas B y D del lisosoma al citosol. En base a estos resultados se puede deducir que la actividad de catepsinas puede ser determinante en el proceso de tenderización, no solo en el *post-mortem* más tardío, como se creía hasta ahora (Sentandreu y cols., 2002), sino desde el inicio del proceso de conversión de músculo en carne.

Cambios post-mortem en la arquitectura muscular:

Los principales **cambios estructurales** que se producen en el proceso de conversión del músculo en carne son el acortamiento sarcomérico y la proteólisis y ambos tendrán importantes efectos en la tenderización (Weaver y cols., 2009). Wheeler y Koohmaraie (1994) mostraron que el acortamiento sarcomérico es responsable de los valores de dureza en el *post-mortem* temprano (antes de las 24h), mientras que variaciones en proteólisis (vía calpaínas u otros sistemas enzimáticos) son responsables de las diferencias encontradas en terneza a lo largo de la maduración.

Nuestros resultados al comparar la **longitud de los sarcómeros** entre biotipos, medida a las 24 h *post-mortem*, mostraron diferencias significativas, siendo mayor en el músculo de terneros culones AV (*mh/mh*) que en los terneros normales (+/+) de ambas razas, alcanzando los individuos heterocigotos valores intermedios (Tabla 1, Sierra y cols., 2006).

Tabla 1. Longitud de los sarcómeros (μm) de las fibras musculares a las 24h *post-mortem*.

	AV(<i>mh/mh</i>)	AV(<i>mh/+</i>)	AV(+/+)	AM(+/+)
N	6	6	5	7
Mínimo	1,58	1,31	1,1	1,13
Máximo	1,8	1,78	1,68	1,62
Rango	0,22	0,47	0,58	0,49
Media	1,72a	1,63a,b	1,5b	1,47b
C.V.	4,65	9,82	17,33	12,93

C.V.: coeficiente de variación. Letras diferentes en cada línea indican diferencias significativas para ($p < 0.05$).

En este estudio, además, el genotipo culón presentó un rango de medidas (diferencia entre los valores máximos y mínimos registrados) inferior a todos los demás y un menor coeficiente de variación, es decir, fue el grupo más homogéneo, en contraposición a los animales normales de ambas razas, que presentaron mayor heterogeneidad entre individuos, con coeficientes de variación del 17% y 13%, respectivamente.

Estos resultados muestran un menor acortamiento sarcomérico en los biotipos con tenderización más temprana de la carne. En principio, una disposición más relajada de los filamentos finos y gruesos que coexisten en aquellos sarcómeros de mayor longitud, podría favorecer la disponibilidad de las miofibrillas a la acción de las proteasas celulares, mientras que en el caso del músculo de los biotipos normales (+/+) de ambas razas, que presentan un mayor grado de acortamiento sarcomérico, estas proteasas se verían incapacitadas por problemas estéricos para acceder a sus proteínas diana.

Por otro lado, las diferencias detectadas en las actividades proteolíticas entre biotipos conllevan diferencias en la **aparición de fragmentos proteolíticos** derivados de proteínas miofibrilares. Los resultados obtenidos en esta Tesis han mostrado una desaparición progresiva de troponina T y la subsiguiente aparición de un fragmento de degradación de dicha proteína, de 30kDa, que ocurren a tiempos más tempranos en el músculo de terneros culones AV (*mb/mb*) que en heterocigotos AV (*mb/+*), y a su vez, en éstos antes que en los biotipos normales (+/+) de ambas razas (AV y AM). De modo similar, se observaron cambios en las bandas correspondientes a la troponina I, que también ocurren más tempranamente en animales AV (*mb/mb*). Además, los resultados muestran que estos cambios se correlacionan con la dureza instrumental y con la actividad de las calpaínas, corroborando teorías previas que asociaban la mejora en la tenderización de la carne durante la maduración *post-mortem* con la degradación de proteínas miofibrilares claves mediada por calpaínas (Christensen y cols., 2004; Rhee y cols., 2006; Xiong y cols., 2007).

Weaver y cols. (2008) demostraron, además, que la longitud de los sarcómeros contribuye a las diferencias en el grado de proteólisis de la troponina T en el músculo *semitendinosus* bovino, hipotetizando que estas diferencias pueden ser el resultado de la diferente disponibilidad de sustrato dependiendo de la longitud sarcomérica. De acuerdo con esta hipótesis, más tarde estos autores (Weaver y cols., 2009) señalaron que la proteólisis de troponina-T mediada por μ -calpaína, ocurría en mayor grado en aquellas muestras de sarcómeros más largos, apuntando que la proteólisis podría estar dificultada cuando hay un mayor solapamiento entre los fragmentos finos y gruesos, lo que impediría el acceso de las proteasas a sus sustratos intrasarcoméricos. Nuestros resultados corroboran estos datos, mostrando que la carne procedente de categorías genéticas (*mb/mb* y *mb/+*) de maduración más rápida (más tiernas por tanto a tiempos cortos), presentaron sarcómeros más largos. Esto, junto con el hecho de que el músculo de terneros con hipertrofia muscular tiene una acidificación más temprana y una desregulación más rápida del

Ca⁺² parece indicar una mejor accesibilidad y condiciones más óptimas de actuación de los enzimas proteolíticos sobre las fibras musculares, que por lo tanto mostraron patrones de activación adelantados en el tiempo, produciendo alteraciones *post-mortem* más tempranas en determinadas proteínas estructurales (troponina T, troponina I).

Además de las diferencias en las proteínas miofibrilares, que estarán más estrechamente ligadas a cambios en la estructura celular, se conocen cambios a nivel de las proteínas sarcoplásmicas, que han sido relacionados con cambios en atributos indicativos de calidad como el descenso del pH, el color o la capacidad de retención de agua (Lametsch y cols., 2002; Sayd y cols., 2006). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han mostrado diferencias significativas en algunas proteínas sarcoplásmicas entre la carne procedente de los biotipos con presencia del gen de la hipertrofia muscular y los normales, principalmente en enzimas implicadas en el metabolismo energético celular como creatinina kinasa, G3PDH o piruvato kinasa, encontrando correlaciones significativas entre algunas de éstas y la dureza instrumental, la actividad de calpaínas o los cambios observados en el perfil miofibrilar, lo que parece indicar que todos estos procesos son interdependientes.

Fenómenos de Oxidación y Defensa Antioxidante:

Uno de los cambios a nivel celular que más influye en la transformación muscular *post-mortem*, además del pH y el cambio en la fuerza iónica, son los procesos de oxidación y nitrosilación de biomoléculas. La oxidación lipídica va aumentando a lo largo del tiempo de maduración debido a la oxidación de ácidos grasos y pigmentos, lo cual va produciendo, lenta pero continuamente, H₂O₂ que dará lugar a OH[•], el radical libre más tóxico y nocivo para cualquier macromolécula biológica.

El índice TBARS permite medir la formación de productos secundarios en respuesta a la degradación de hidroperóxidos como consecuencia del daño oxidativo. Dicha analítica mide la cantidad de sustancias reactivas (principalmente malonaldehído) al ácido tiobarbitúrico, y puede detectar los productos resultantes, tanto de daños en lípidos como en proteínas, y presenta gran correlación con la calidad sensorial de la carne. En nuestro estudio, los índices de TBARS obtenidos para cada biotipo mostraron que, al igual que en el caso de la proteólisis, la carne de los genotipos con hipertrofia muscular (*mb/mb* y *mb/+*) mostró un patrón más acelerado en los índices de oxidación que la carne de otros biotipos, lo cual pudo estar relacionado con su mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Aldai y cols., 2006), que son más susceptibles a los

fenómenos oxidativos. Además, nuestros resultados apuntan a que los sistemas antioxidantes, en particular la Superóxido Dismutasa (SOD) y la Catalasa (CAT), actúan de modo más temprano en el músculo de los animales de biotipo culón (*mb/mb*) (Caballero y cols., 2006), produciéndose un agotamiento enzimático más temprano lo que puede explicar el mayor nivel oxidativo encontrado en la carne de estos biotipos.

Por otro lado, numerosos estudios apuntan el hecho de que la maduración *post-mortem* incrementa la oxidación de proteínas miofibrilares (Martinaud y cols., 1997; Rowe y cols., 2004a, 2004b). Las calpaínas son enzimas que contienen residuos de histidina y residuos de cisterna con grupos SH en su centro activo, los cuales son particularmente susceptibles a la inactivación como consecuencia de la oxidación (Lametsch y cols., 2008). Huff-Lonergan y cols., en una revisión publicada recientemente (2010) apuntaron la posibilidad de que existan diferencias genéticas en la susceptibilidad a la oxidación, por lo que hipotetizaron que diferencias en los sistemas de defensa antioxidante entre animales y/o músculos, podrían influir en la actividad de calpaínas en la proteólisis y, por lo tanto, en la tenderización de la carne. Esto coincide con los patrones proteolíticos obtenidos en esta Tesis, que muestran cambios más tempranos en los biotipos con hipertrofia muscular relacionados con una evolución más temprana de la tenderización.

Estos datos parecen sostener la hipótesis de que los enzimas antioxidantes tienen una acción sinérgica con los enzimas proteolíticos implicados en los procesos de tenderización de la carne, al evitar que los radicales libres inactiven los enzimas proteolíticos, ya que ambos grupos enzimáticos mostraron una evolución similar a lo largo de la maduración en todos los genotipos estudiados.

¿Cómo afectan estas diferencias a la percepción de calidad por el consumidor?

En general, los resultados obtenidos de calidad sensorial muestran que el biotipo afectó significativamente a la mayoría de los atributos sensoriales estudiados (jugosidad, terneza y aceptabilidad global), principalmente en tiempos de maduración largos (14 y 21 días). Conviene destacar que la carne procedente de los biotipos con hipertrofia muscular presentaron valores de aceptabilidad a tiempos cortos (3 días) más bajos que el resto, probablemente debido al efecto negativo que tiene la baja composición grasa en la calidad de la carne. Sin embargo, y probablemente debido al proceso de tenderización más temprano, la carne de estos biotipos (*mb/mb* y *mb/+*) de la raza AV mostró las notas más altas de flavor, terneza y aceptabilidad global.

a los 7-14 días *post-mortem*, mientras que la de otros genotipos alcanzó los valores más altos de calidad sensorial a los 14 (AVxAM) y 21 días (AV (+/+) y AM) de maduración. Estos resultados muestran que la carne de terneros con hipertrofia muscular requiere períodos más cortos de maduración para obtener su máxima calidad sensorial, debido por un lado a un metabolismo proteolítico más rápido, que le confiere niveles de terneza adecuados, así como fenómenos oxidativos (TBARS) más tempranos que mejoran la calidad sensorial a tiempos más cortos *post-mortem*, dado que cierto nivel oxidativo es necesario para un desarrollo apropiado del flavor en la carne.

El estudio multivariante de los resultados ha permitido distinguir entre los distintos biotipos incluidos en la IGP “Ternera Asturiana” (animales de las dos razas bovinas asturianas AV y AM, con distinto grado de presencia de la hipertrofia muscular) dos grupos de calidad, en base a las características físico-químicas de la carne, así como por su calidad sensorial:

- a) Carne procedente de los biotipos con presencia de la mutación en el gen de la miostatina, que produce hipertrofia muscular, de la raza AV (*mb/mb* y *mb/+*), caracterizada por mayores pérdidas de jugo, mayor luminosidad (L^*) y menor engrasamiento intramuscular que los otros biotipos, que alcanza una mayor aceptabilidad sensorial en tiempos de maduración intermedios (7 a 14 días *post-mortem*).
- b) Carne de los biotipos libres de hipertrofia muscular (+/+), tanto de la raza AV como de la rústica AM y su cruce (AV x AM), con mayor engrasamiento muscular, mayor contenido de pigmentos hemínicos y mayor dureza instrumental, que requiere tiempos más largos de maduración *post-mortem* (21 días) para alcanzar su óptimo de calidad.

Por otro lado, este estudio permitió detectar dos grupos diferentes de consumidores. Por un lado, gente muy joven (<25 años), y con mayor frecuencia de consumo de carne de vacuno (más de dos veces a la semana), que prefirieron la carne que alcanzó un nivel apropiado de tenderización a tiempos de maduración intermedios (3-14 días) independientemente del biotipo, mientras que se encontró otro grupo de consumidores, de mayor edad (entre 26-45 años) que optaron por carne de maduración más tardía, con valoraciones altas de jugosidad y aceptabilidad a los 21 días *post-mortem*. Esta información puede ser muy útil para el desarrollo de estrategias de mercado apropiadas orientadas a segmentos específicos de la población.

Los resultados dejan también en evidencia que es preciso establecer una combinación adecuada de biotipo y tiempo de maduración para obtener la máxima calidad de los distintos productos estudiados. Esto permitiría a la marca de calidad garantizar la máxima calidad sensorial de cada producto distribuido en el mercado. No obstante, es preciso señalar que en este estudio la carne se maduró en cámara refrigerada (4°C), una vez fileteada, envasada al vacío. Estas condiciones facilitan el estudio pero difieren notablemente de las condiciones utilizadas en el mercado. Probablemente, un procedimiento distinto de maduración (en canal o en grandes piezas) puede influir sobre la evolución *post-mortem* de la temperatura y pH de la carne, así como sobre la actividad de los enzimas proteolíticos y oxidativos del músculo, con lo cual la evolución de la calidad sensorial de la carne a lo largo de la maduración podría diferir de los resultados obtenidos en este estudio.

Aplicación de la tecnología NIRS como método “on-line” de control de calidad

Numerosos estudios han confirmado la capacidad de la espectroscopia NIRS para predecir el contenido de los principales componentes químicos de la carne de vacuno, tales como proteína, grasa y humedad (Prieto y cols., 2009). El análisis de los espectros NIRS recogidos en forma de transmitancia (NIT) en carne picada ha permitido demostrar que esta tecnología puede utilizarse para el análisis cuantitativo de parámetros indicativos de la calidad de la carne a lo largo de la maduración post-mortem, obteniéndose ecuaciones de predicción satisfactorias no sólo para las variables de composición habituales (humedad, grasa, proteína, pigmentos, todas ellas con un coeficiente de determinación R^2 superior a 0,9) (Tabla 2), sino incluso para determinar el perfil lipídico de la grasa intramuscular (SFA, $R_{vc}^2=0,837$; BFA, $R_{vc}^2=0,704$; MUFA, $R_{vc}^2=0,852$), en particular el contenido de algunos de los ácidos grasos individuales más importantes como son C14:0, C16:0, C16:1 cis9, C17:0, C18:1cis9, C18:1cis11 y también de algunos minoritarios como C13:0, C15:0, C17:1cis9, C18:1cis13, mostrando para todos ellos coeficientes de determinación superiores a $R_{vc}^2 > 0.76$ y $RPD < 2$.

Tabla 2. Estadísticos de calibración NIT para la composición química de la carne.

	ETC	Rc^2	ETVC	Rvc^2
Humedad	0,297	0,912	0,308	0,904
Grasa	0,241	0,919	0,25	0,914
Proteína	0,192	0,888	0,22	0,852
Mioglobina	0,316	0,906	0,373	0,87

ETC y ETVC: error típico de calibración y validación cruzada, Rc^2 y Rvc^2 : coeficiente de calibración y validación cruzada.

Además, se calcularon ecuaciones de predicción NIT para otros parámetros indicativos de calidad, tales como pH, CRA, dureza instrumental, SOD, CAT, GR, TBARS y calidad sensorial (sabor, jugosidad, terneza y aceptabilidad). De éstos, los que dieron mejores índices de calibración fueron la dureza instrumental ($R_{VC}^2=0,449$) y las pérdidas por goteo (drip loss) ($R_{VC}^2=0,393$), así como la aceptabilidad global ($R_{VC}^2=0,561$) aunque en ningún caso se alcanzaron los requerimientos necesarios para que estas ecuaciones pudiesen ser aplicadas con fines analíticos ($RPD < 2$).

Estos resultados coinciden con los de otros autores, que no obtuvieron ecuaciones de predicción satisfactorias para el pH y la capacidad de retención de agua de la carne (Prieto y cols., 2009). En cuanto a la dureza instrumental, a pesar de estar estrechamente ligada a la composición de las muestras, es uno de los parámetros de calidad más difíciles de predecir por espectroscopia en el infrarrojo cercano (Venel y cols., 2001; Leoy y cols. 2003, Andrés y cols., 2008; Ripoll y cols., 2008; Prieto y cols., 2008a), debido fundamentalmente al modo de presentación de la muestra, que requiere generalmente una preparación distinta de la carne para el análisis de dureza (fileteado, cocinado) y la obtención del espectro NIRS (carne picada cruda). Además, conviene recordar que la dureza de la carne no sólo depende de su composición química sino también en gran medida de la estructura muscular, la cual probablemente no es debidamente recogida en los espectros NIRS. En este Trabajo, se ha podido comprobar que los espectros NIT pueden, en cierta medida, utilizarse para el seguimiento del proceso de tenderización *post-mortem* de la carne, ya que curiosamente permitieron predecir la actividad de algunos enzimas proteolíticos relevantes en los procesos de tenderización. Así, el análisis del espectro bruto NIT tomado a las 48h *post-mortem* permitió una buena predicción de la actividad citosólica de las catepsinas B ($R_{VC}^2= 0,857$) y D ($R_{VC}^2= 0,898$) a los 7 días de maduración ($RPD > 2,5$), estando ambas actividades relacionadas positivamente con la terneza final de la carne. Este resultado, en cierta medida sorprendente, pudo deberse al distinto patrón de tenderización y de actividad enzimática en los distintos biotipos animales estudiados (terneros de las dos razas asturianas AV y AM, con distinta presencia de hipertrofia muscular), ya que cuanto más variabilidad exista en la población de calibración, mejor resultará ésta. Además, los distintos patrones de tenderización estudiados se encuentran correlacionados con diferencias en la composición química de la carne, con lo que diferencias de composición pudieron influir indirectamente en las predicciones.

Una de las aplicaciones más novedosas e interesantes de la espectroscopia en el infrarrojo cercano es su aplicación para la clasificación de los productos en base a su información espectral.

El análisis de los espectros NIT ha demostrado esta capacidad como herramienta para la clasificación y autenticación de los distintos productos incluidos en este estudio. Nuestros estudios han mostrado que los espectros NIT permiten clasificar adecuadamente un 75% de la carne según su tiempo de maduración: 48 horas, 7 días o 14 días.

Tabla 3. Porcentaje de muestras clasificadas en cada tiempo de maduración

	48h	7d	14d
48h	93%	5%	3%
7d	7%	61%	26%
14d	0%	34%	71%
Total	100%	100%	100%

El grado de discriminación de los grupos de carne, según el espectro NIT, fue superior (93%) para la carne recogida en el *post-mortem* temprano (48h), existiendo mayor solapamiento entre las carnes tomadas a los 7 y 14 días de maduración (Tabla 3), debido a que los cambios significativos de composición y textura de la carne ocurren entre las 48 horas y los 7 días de maduración.

También se comprobó la capacidad de la tecnología NIRS para discriminar la carne según el biotipo del animal. Dicho análisis permitió clasificar correctamente el 65,5 % de las muestras en su genotipo correspondiente (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de muestras clasificadas en cada categoría genética a las 48h *post-mortem*.

	AV(mh/mh)	AV(mh/+)	AV(+/+)	AM(+/+)
AV(mh/mh)	87%	27%	7,5%	0%
AV(mh/+)	6,5%	47%	31%	20%
AV(+/+)	6,5%	13%	54%	7%
AM(+/+)	0%	13%	7.5%	73%
Total	100%	100%	100%	100%

Estos resultados mostraron que los genotipos extremos, en cuanto a las características de la carne, no presentaban solapamiento, es decir, nunca hubo confusión entre los espectros de muestras de carne pertenecientes al genotipo culón (*mh/mh*) de la raza AV (de menor engrasamiento, menor contenido en pigmentos y procesos de tenderización y oxidación más acelerados) con los de la raza AM. Coincidiendo con estos resultados, Oliván y cols, (2003c) consiguieron una categorización aceptable de distintos tipos de carne según la raza.

Los resultados derivados de esta Tesis Doctoral indican que la presencia de la mutación del gen de la miostatina en los biotipos de las razas autóctonas asturianas acorta los tiempos de maduración requeridos para alcanzar valores óptimos de calidad de la carne. Una correcta combinación “biotipo x tiempo de maduración” resulta primordial para asegurar la homogeneidad de cada tipo de producto amparado por la IGP “Ternera Asturiana”. Además, se ha comprobado que la utilización de la tecnología NIRS y la detección temprana de biomarcadores (fragmentos peptídicos) pueden resultar de gran utilidad como herramientas “*on-line*” para el control de calidad de los productos.

Sin embargo, a pesar del conocimiento acumulado sobre los procesos de conversión del músculo en carne, no se ha conseguido explicar de forma definitiva la variabilidad en la tenderización y la adquisición de la calidad final. Por ello, se propone el estudio de la muerte celular programada y los procesos asociados como nuevo campo de investigación aplicado a la calidad de la carne.

Conclusiones

En esta Memoria de Tesis hemos estudiado la evolución *post-mortem* de parámetros indicativos de calidad en la carne de terneros añejos procedentes de los distintos biotipos incluidos en la IGP “Ternera Asturiana” y los efectos de la raza y el gen de la hipertrofia muscular. De los resultados obtenidos y su discusión subsecuente hemos podido concluir que:

1. La carne obtenida de los distintos biotipos presentes en las razas bovinas autóctonas asturianas, puede dividirse en dos grupos de calidad, en base a sus características físico-químicas y la aceptabilidad sensorial:
 - a. Carne de los biotipos con presencia de hipertrofia muscular (*mb/mb* y *mb/+*) de la raza Asturiana de los Valles, caracterizada por altas pérdidas de jugo, mayor luminosidad (L^*) y menor engrasamiento intramuscular, con alta aceptabilidad sensorial en tiempos de maduración intermedios (7 a 14 días *post-mortem*).
 - b. Carne de los biotipos libres de hipertrofia muscular (*+/+*), tanto de la raza Asturiana de los Valles como de la rústica Asturiana de la Montaña y su cruce (AV x AM), con mayor engrasamiento muscular, mayor contenido de pigmentos hemínicos y mayor dureza instrumental, que requiere tiempos más largos de maduración *post-mortem* (21 días) para alcanzar su óptimo de calidad.
2. Se precisa una combinación adecuada “biotipo x tiempo de maduración” para asegurar una calidad sensorial óptima de la carne de las razas asturianas.
3. La presencia del gen de la hipertrofia muscular produce cambios significativos en la evolución *post-mortem* de la calidad de la carne, al promover una actividad más temprana de enzimas proteolíticos (catepsinas, calpaínas) y de los procesos de desestructuración muscular, mostrando un ritmo de tenderización más temprano.
4. La evolución de determinados fragmentos peptídicos del extracto miofibrilar (troponina T y troponina I) y sarcoplásmico (creatina kinasa y gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa) del músculo muestra paralelismo con la reducción de la dureza de la carne a lo largo de la maduración, por lo que podrían servir como biomarcadores de calidad.
5. Las ecuaciones de predicción desarrolladas mediante la tecnología NIRS muestran un alto potencial predictor de la grasa intramuscular de la carne.

Referencias

- Albertí, P., Panea, B., Sañudo, C., Olleta, J.L., Ripoll, G., Ertbjerg, P., Christensen, M., Gigli, S., Failla, S., Concetti, S., Hocquette, J.F., Jailler, R., Rudel, S., Renand, G., Nute, G.R., Richardson, R.I., Williams, J.L. (2008). Live weight, body size and carcass characteristics of young bulls of fifteen European breeds. *Livestock Science*, 114, 19-30.
- Albertí, P., Ripoll, G., Goyache, F., Lahoz, F., Olleta, J.L., Panea, B., Sañudo, C. (2005). Carcass characterisation of seven Spanish beef breeds slaughtered at two commercial weights. *Meat Science*, 71, 514-521.
- Aldai, N., Murray, B.E., Oliván, M., Martínez, A., Troy, D.J., Osoro, K., Nájera, A.I. (2006). The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physicochemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. *Meat Science*, 72, 486-495.
- Aldai, N., Nájera, A.I., Martínez, A., Celaya, R., Osoro, K. (2007). Correlation between carcass conformation and fat cover degree, and muscle fatty acid profile of yearling bulls depending on breed and mh-genotype. *Livestock Science*, 107, 199-212.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- Alomar, D., Gallo, C., Castañeda, M., Fuschslocher, R. (2003). Chemical and discriminant analysis in bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science*, 63, 441-450.
- Alzón M., Mendizabal J.A., Arana A., Albertí P., Purroy A. (2007). Adipocyte cellularity in different adipose depots in bulls of seven Spanish breeds slaughtered at two body weights. *Animal*, 1, 261-267.
- Andersen, H.J., Oksbjerg, N., Young, J.F., & Therkildsen, M. (2005). Feeding and meat quality – a future approach. *Review Meat Science*, 70, 543-554.
- Andersson, M., Sjostrand, J., Petersen, A., Honarvar, A.K., Karlsson, J.O. (2000). Caspase and proteasome activity during staurosporin- induced apoptosis in lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41, 2623-2632.
- Andrés, S., Silva, A., Soares-Pereira, A.L., Martins, C., Bruno-Soares, A.M., Murray, I. (2008). The use of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict beef *M. Longissimus thoracis et lumborum* quality attributes. *Meat Science*, 78, 217-224.
- Ansay, M. (1976). Developpement anatomique du muscle de foetus bovin. Etude particulefe de l'effect 'culard'. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, et Biophysique*, 16, 655-73.
- Apple, J.K., Kegley, E.B., Galloway, D.L., Wistuba, T.J., Rakes, L.K. (2005). Duration of restraint and isolation stress as a model to study the dark-cutting condition in cattle. *Journal of Animal Science*, 83, 1202-1214.
- Archile-Contreras, A.C., Mandell, I.B., Purslow; P.P. (2010). Disparity of dietary effects on collagen characteristics and toughness between two beef muscles. *Meat Science*, 86, 491-497.
- Arthington, J.D., Eichert, S.D., Kunkle, W.E., Martin, F.G. (2003). Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *Journal of Animal Science*, 81, 1120-1125.
- Arthur, P.F. (1995). Double muscling in cattle: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46, 1493-1515.

- Attaix, D., Combaret, L., Pouch, M.N., Taillandier, D. (2001). Regulation of proteolysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care*, 4, 45-49.
- Attaix, D., Taillandier, D. (1998). The critical role of the ubiquitin proteasome pathway in muscle wasting in comparison to lysosomal and Ca²⁺- dependent systems. *Advances in Molecular Cell Biology*, 27, 235-266.
- Bailey, A.J., Enser, M.B., Dransfield, E., Restall, D.J., Avery, N.C. (1982). Muscle and adipose tissue from normal and double muscled cattle: collagen types, muscle fibre diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties. En: J.W.B. King, F. Ménéssier (Eds.) *Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production* (pp. 178-203). Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands.
- Bailey, A.J. (1985). The role of collagen in the development of muscle and its relationship to eating quality. *Journal of Animal Science*, 60, 1580-1587.
- Balcerzak, D., Querengesser, L., Dixon, W.T., Baracos, V.E. (2001). Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 79, 94-107.
- Barlocco, N., Vadell, A., Ballesteros, F., Galieta, G., Cozzolino, D. (2006). Predicting intramuscular fat, moisture and Warner–Bratzler shear force in pork muscle using near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Science*, 82, 111-116.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (1998). *Handbook of proteolytic enzymes*. London: Academic Press.
- Baz, A., Henry, L., Caravano, R., Scherrer, K., Bureau, J.P. (1997). Changes in the subunit distribution of prosomes (MCP-proteasomes) during the differentiation of human leukemic cells. *International Journal of Cancer*, 72, 467-476.
- Bee, G., Anderson, A.L., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E. (2007). Rate and extent of pH decline affect proteolysis of cytoskeletal proteins and water-holding capacity in pork. *Meat Science*, 76, 359-365.
- Bee, G., Biolley, C., Guex, G., Herzog, W., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E. (2006). Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles. *Journal of Animal Science*, 84, 191-203.
- Beere, H. (2001). Apoptosis hots up from the cold. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 278-280.
- Ben-Gera, I., Norris, K.H. (1968). Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *Journal of Food Science*, 33, 64-67.
- Bennet, L.L., Hammond, A.C., Williams, M.J., Kunkle, W.E., Johnson, D.D., Preston, R.L., Miller, M.F. (1995). Performance, carcass yield, and carcass quality characteristics of steers finished on rhizoma peanut-tropical grass pasture or concentrate. *Journal of Animal Science*, 73, 1881-1887.
- Beriáin, M.J., Lizaso, G. (1998). Calidad de la carne de vacuno. En: *Vacuno de Carne: Aspectos Claves*. Cood. Buxadé, C. (pp. 495-510). Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., Le Cunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G., Hocquette, J.F. (2007). New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 5529-5537.

- Bertram, H.C., Whittaker, A.K., Andersen, H.J., Karlsson, A.H. (2003). pH dependence of the progression in NMR T-2 relaxation times in post-mortem muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4072-4078.
- Boccard, R., Buchter, L., Casteels, M., Cosentino, E., Dransfield, E., Hood, D.E., Joseph, R.L., MacDougall, D.B., Rhodes, D.N., Schoèn, L., Tinbergen, B.J., Touraille, C. (1981). Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments. Report of a working group in the Commission of the European Communities' (CEC) beef production research programme. *Livestock Production Science*, 8, 385-397.
- Boissy, A. (1995). Fear and fearfulness in animals. *Quarterly Review of Biology*, 70, 165-191.
- Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. (2004). Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4, 1811-1824.
- Bouley, J., Meunier, B., Chambon, C., De Smet, S., Hocquette, J.F., Picard, B. (2005). Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics*, 5, 490-500.
- Brix, K., Dunkhorsta, A., Mayera, K., Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, 90, 194-207.
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A.E., Giaccone, G. (2005). Cell death independent of Caspases: A review. *Clin Cancer Res.*, 11, 3155-3162.
- Brondrum, J., Munck, L., Henckel, P., Karlsson, A., Tornberg, E., Engelsen, S. (2000). Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Science*, 55, 177-185.
- Caballero, B., Sierra, V., Vega-Naredo, I., Tomás-Zapico, C., Rodríguez-Colunga, M.J., Tolivia, D., Oliván, M., Coto-Montes, A. (2006). Evolución de los enzimas antioxidantes en la maduración de carne procedente de dos cabañas autóctonas asturianas: Asturiana de los Valles y Asturiana de la Montaña. *ITEA. A*, 102 n°3, 228-303.
- Calkins, C.R., Seidman, S.C. (1988). Relationship among calcium-dependent protease, cathepsin B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging. *Journal of Animal Science*, 66, 1186-1193.
- Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D., Richardson, R.I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72, 303-311.
- Campo, M.M., Sañudo, C., Panea, B., Albertí, P., Santolaria, P. (1999). Breed type and ageing time effects on sensory characteristics of beef strip loin steaks. *Meat Science*, 51, 383-390.
- Carballo, B.M., López de Torre, G. (1991) *Manual de bioquímica y tecnología de la carne*. Madrid: Ediciones A. Vicente.
- Chen, Z.; Yi-yu, C., Hai-bin, Q. (2005). A new approach to the fast measurement of content of amino acids in *Cordyceps sinensis* by ANN-NIR. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 24: 50-53.
- Christensen, M., Young, R.D., Lawson, M.A., Larsen, L.M., Purslow, P.P. (2004). Effect of added l-calpain and post-mortem storage on the mechanical properties of bovine single muscle fibers extended to fracture. *Meat Science*, 66, 105-112.
- Chrystall, B.B., Devine, C.E. (1985). Electrical stimulation: its early development in New Zeland. *Advances in Meat Research*, 1, 73-119.

- Church, P.N., Wood, J.M. (1992). *The manual of manufacturing meat quality* (3rd ed.). Elsevier Science Publishers Ltd., Inc.
- CIE (1978). *International Commission on Illumination, recommendations on uniform color spaces, color, difference equations, psychometric color terms*. CIE publication. Bureau Central de la CIE, Paris, France.
- Clinquart, A., Van Eenaeme, C., Van Vooren, T., Van Hoof, J., Hornick, J.L., Istasse, L. (1994). Meat quality in relation to breed (Belgian Blue vs Holstein) and conformation (double muscled vs dual purpose type). *Sciences des Aliments*, 14, 403-409.
- Cong, J.Y., Goll, D.E., Peterson, A.M., Kapprell, H.P. (1989). The role of autolysis in activity of the Ca-2+-dependent proteinases (μ -Calpain and m-Calpain). *Journal of Biological Chemistry*, 264, 10096-10103.
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. (1996). Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 801-847.
- Cozzolino, D., Murray, I. (2002). Effect of sample presentation and animal muscle species on the analysis of meat by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10, 37-44.
- Cozzolino, D., Chree, A.J., Scaife, R., Murray, I. (2005). Usefulness of near-infrared reflectance (NIR) spectroscopy and chemometrics to discriminate fishmeal batches made with different fish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4459- 4463.
- Creagh, E.M., Martin, S.J. (2001). Caspases: cellular demolition experts. *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 696-701.
- De Smet, S., Claeys, E., Balcaen, A., van den Brink, D., Seynaeve, M., Demeyer, D. (2000). Effect of the double-muscling genotype on carcass and meat quality in Belgian Blue slaughter bulls. En: *Proceedings of the 46th International Congress of Meat Science and Technology, (ICoMST)*. (pp. 70-71). Buenos Aires, Argentina.
- De Smet, S., Claeys, E., Buysse, G., Lenaerts, C., Demeyer, D. (1998). Tenderness measurements in four muscles of Belgian Blue normal and double-muscled bulls. En *Proceedings of the 44th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)* (pp. 288–289), Barcelona, España.
- Delgado, C., Rosegrant, M., Steinfeld, H., Ehui, S., Courbois, C. (1999). *Livestock to 2020. The next food revolution*. International Food Policy Research Institute, Washington D.C.
- Delgado, E.F., Geesink, G.H., Marchello, J.A., Goll, D.E., Koohmaraie, M. (2001). The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *Journal of Animal Science*, 79, 398-412.
- Descalzo, A.M., Rossetti, L., Grigioni, G., Irurueta, M., Sancho, A.M., Carrete, J., y cols. (2007). Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Science*, 75, 299-307.
- Descalzo, A.M., Insani, E.M., Biolatto, A., Sancho, A.M., García, P.T., Pensel, N.A., y cols (2005). Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science*, 70, 35-44.
- Dian, P.H.M., Andueza, D., Barbosa, C.P., Amoureux, S., Jestin, M., Carvalho, P.C.F., Prado I. N., Prache S. (2007). Methodological developments in the use of visible reflectance

- spectroscopy for discriminating pasture-fed from concentrate-fed lamb carcasses. *Animal*, 1, 1198-1208.
- Dikeman, M.E., Reddy, G.B., Arthaud, V.H., Tuma, H.J., Koch, R.M., Mandigo, R.W., Axe, J.B. (1986). Longissimus muscle quality, palatability and connective tissue histological characteristics of bulls and steers fed different energy levels and slaughtered at four ages. *Journal of Animal Science*, 63, 92-101.
- Ding, H.B., Xu, R.J. (2000). Near-infrared spectroscopic technique for detection of beef hamburger adulteration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 2193-2198.
- Ding, H.B., Xu, R.J. (1999). Differentiation of beef and kangaroo meat by visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Science*, 64, 814-817.
- Ding, H.B., Xu, R.J., Chan, D.K.O. (1999). Identification of broiler chicken meat using a visible/near-infrared spectroscopic technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1382-1388.
- Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Comisión Europea. (2009). En: http://ec.europa.eu/agriculture/publi/caprep/prospects2008/fullrep_en.pdf
- Doumit, M.E., Koochmaraie, M. (1999). Immunoblot analysis of calpastatin degradation: Evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle. *Journal of Animal Science*, 77, 1467-1473.
- Downey, G., Beauchêne, D. (1997). Discrimination between Fresh and Frozen-then-thawed Beef m. Longissimus dorsi by combined visible-near infrared reflectance spectroscopy: a feasibility study. *Meat Science*, 45, 353-363.
- Dunne, P.G., O'Mara, F.P., Monahan, F.J., Moloney, A.P. (2006). Changes in colour characteristics and pigmentation of subcutaneous adipose tissue and M. longissimus dorsi of heifers fed grass, grass silage or concentrate-based diets. *Meat Science*, 74, 231-241.
- Dupont-Versteegden, E.E. (2005). Apoptosis in muscle atrophy: Relevante to sarcopenia. *Exp. Gerontol.*, 40, 473-481.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 383-424.
- Ebeler, S.E. (2004). Sensory análisis and analytical flavour chemistry: Missing links. En: K.D. Deibler y J. Delwiche (Eds.), *Handbook of flavor characterization* (pp.41-50). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Failla, S., Gigli, S., Gaddini, A., Signorelli, F., Sañudo, C., Panea, B., Olleta, J.L., Monsón, F., Hocquette, J.F., Jailler, R., Albertí, P., Ertbjerg, P., Christiansen, M., Nute, G.R., Williams, J.L. (2004). Physical quality of several European beef breeds: preliminary results. En: *Proceedings of the 50th International Congress of Meat Science and Technology*, Helsinki, Finland.
- FAO. (2002). *Agriculture: Towards 2015/30*. En: <http://fao.org/WAICENT/019/000704-e.htm>
- Farmer, L.J. (1994). The role of nutrients in meat flavour formation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 327-333.
- Ferguson, D.M., Warner, R.D. (2008). Review Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants?. *Meat Science*, 80, 12-19.

- Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., Megeny, L.A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 11025-11030.
- Field, R.A. (1971). Effect of castration on meat quality and quantity. *Journal of Animal Science*, 32, 849-858.
- Fiems, L.O., De Campeneere, S., Bogaerts, D.F., Cottyn, B.G., Boucque', Ch.V. (1998). The influence of dietary energy and protein levels on performance, carcass and meat quality of Belgian White-blue double-musled finishing bulls. *Animal Science*, 66, 319-327.
- Fiems, L.O., De Campeneere, S., De Smet, S., Van de Voorde, G., Boucqué, Ch.V. (2000). Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness. *Meat Science*, 56, 41-47.
- Fiems, L.O., Van Hoof, J., Uytterhaegen, L., Boucqué, Ch.V., Demeyer, D.I. (1995). Comparative quality of meat from double-musled and normal beef cattle. En: A. Ouali, D.I. Demeyer y F.J.M., Smulders. *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality* (pp. 381-393). Utrecht: Ecceamst.
- Fiems, L.O., De Campeneere, S., Van Caelenbergh, W., De Boever, J.L., Vanacker, J.M. (2003). Carcass and meat quality in double- musled Belgian Blue bulls and cows. *Meat Science*, 63, 345-352.
- Font i Furnols, M., Realini, C.E., Guerrero, L., Oliver, M.A., Sañudo, C., Campo, M.M., Nute, G.R., Cañeque, V., Álvarez, I. San Julián, R. Luzardo, S., Brito, G., Montossi, F. (2009). Acceptability of lamb fed on pasture, concentrate or combinations of both systems by European consumers. *Meat Science*, 81, 196-202.
- Franco, J. (1997). Características productivas de la calidad de la canal y calidad instrumental de la carne de siete razas bovinas españolas. Zaragoza, Spain: Máster, CIHEAM.
- Fraterman, S., Zeiger, U., Khurana, T.S., Wilm, M., Rubinstein, N.A. (2007). Quantitative proteomics profiling of sarcomere associated proteins in limb and extraocular muscle allotypes. *Mol. Cell Proteomics*, 6, 728-737.
- Fraterman, S., Zeiger, U., Khurana, T.S., Wilm, M., Rubinstein, N.A. (2007) Quantitative proteomics profiling of sarcomere associated proteins in limb and extraocular muscle allotypes. *Mol Cell Proteomics*, 6, 728-737.
- French, P., O'Riordan, E.G., Monahan, F.J., Caffrey, P.J., Mooney, M.T., Troy, D.J., Moloney, A.P. (2001). The eating quality of meat of steers fed grass and/or concentrates. *Meat Science*, 57(4), 379-386.
- Frisdal, E., Teiger, E., Lefaucheur, J.P., Adnot, S., Planus, E., Lafuma, C., D'ortho, M.P. (2000). Increased expression of gelatinases and alteration of basement membrane in rat soleus muscle following femoral artery ligation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 26, 11-21.
- Fuentes-Prior, P, Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem. J.*, 384, 201-232.
- Fumière, O., Sinnaeve, G., Dardenne, P. (2000). Attempted authentication of cut pieces of chicken meat from certified production using near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectroscopy*, 8, 27-34.

- Gagnière, H., Picard, B., Jurie, C., Geay, Y. (1997). Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-musled cattle. *Meat Science*, 45, 145-152.
- García-Macía, M. (2009). Búsqueda de marcadores de calidad durante la maduración de carne de vacuno de las razas autóctonas asturianas: Asturiana de los Valles y Asturiana de la Montaña. [Tesina de Licenciatura]. Oviedo, Asturias: Universidad de Oviedo.
- García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., De Pedro, E. (2001). The transfer of fatty acid calibration equations using four sets of unsealed liquid standardisation samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9, 49-62.
- Gardner, G.E., Thompson, J.M. (2003). Muscle glycogen repletion in 3 breeds of young cattle is not affected by energy intake. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*, 12(Suppl.), S38.
- Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J.F., Culioli, J. (2001). Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 1-26.
- Geesink, G.H., Koohmaraie, M. (1999). Postmortem proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended postmortem storage. *Journal of Animal Science*, 77, 1490-1501.
- Geesink, G.H., Kuchay, S., Chishti, A.H., Koohmaraie, M. (2006). μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *Journal of Animal Science*, 84, 2834-2840.
- Geesink, G.H., Schreutelkamp, F.H., Frankhuizen, R., Vedder, H.W., Faber, N.M., Kranen, R.W., y cols (2003). Prediction of pork quality attributes from near infrared reflectance spectra. *Meat Science*, 65, 661-668.
- Gerrard, D.E., Jones, S.J., Aberle, E.D., Lemenager, R.P., Diekman, M.A., Judge, M.D. (1987). Collagen stability, testosterone secretion and meat tenderness in growing bulls and steers. *Journal of Animal Science*, 65, 1236-1242.
- Gil, M., Serra, X., Gispert, M., Angels Oliver, M., Sañudo, C., Panea, B., Olleta, J.L., Campo, M.M., Oliván, M., Osoro, K., García-Cachán, M.D., Cruz-Sagredo, R., Izquierdo, M., Espejo, M., Martín, M., Piedrafita, J. (2001). The effect of breed production systems on the myosin heavy chain 1, the biochemical characteristics and the colour variables of longissimus thoracis from seven Spanish beef cattle breeds. *Meat Science*, 58, 181-188.
- Goll, D.E., Neti, G., Mares, S.W., Thompson, V.F. (2008). Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains. *Journal of Animal Science*, 86, 19-35.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*, 83, 731-801.
- Green, D.R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, 121, 671-674.
- Gregory, N.G. (2003). *Animal welfare and meat science*. (pp. 64–92). USA: CABI Publishing.
- Grobet, L., Royo-Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., y cols (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17, 71-74.
- Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K.J.A. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal*, 11, 526-534.

- Guerrero, L., Guardia, M.D. (1998). Evaluación de la fiabilidad de un panel de cata. III Jornadas de Análisis sensorial, Valdediós, Villaviciosa, Asturias.
- Gullet, E.A., Battenham, S., Hore, T. (1996). Effect of age and cut on consistency of tenderness and leanness of beef. *Food Qual.Pref.*, 7, 37-45.
- Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A. (2003). Mechanisms of apoptosis in the heart. *Journal of Clinical Immunology*, 23, 447-459.
- Hambrecht, E., Eissen, J.J., Newman, D.J., Smits, C.H., Verstegen, M.W., Den Hartog, L.A. (2005). Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *Journal of Animal Science*, 83, 900-907.
- Hamm, R. (1986) Funcional properties of the miofibrillar system and their measurements. En: *Muscle as food*. (pp135-199) (Bechtel, P. J.), Academic Press, Orlando.
- Hemsworth, P.H., Barnett, J.L. (2001). Human–animal interactions and animal stress. En: G.P. Moberg & J.A. Mench (Eds.), *The biology of animal stress – Basic principles and implications for animal welfare* (pp. 309–336). Oxon, UK CABI Publishing.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776.
- Herrera-Méndez, C.H., Becila, S., Boudjellal, A., Ouali, A. (2006). Meat aging: Reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci Tech.*, 17, 394-405.
- Hildrum, K.I., Nilsen, B.N., Westad, F., Wahlgren, N.M. (2004). In-line analysis of ground beef using a diode array near infrared instrument on a conveyor belt. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 12, 367-376.
- Hiner, R.L., Hankins, O.G. (1950). The tenderness of beef in relation to different muscles and age in the animal. *Journal of Animal Science*, 9, 347-373.
- Hocquette, J.F., Renand, G., Levéziel, H., Picard, B., Cassar-Malek, I. (2005). Genetic effects on beef meat quality. En: *The Science of Beet Quality*. 8th Annual Langford. Food Industry Conference. Proceedings of the British Society of Animal Science. (pp. 13-20). Langford, Bristol, UK.
- Hoffman, D.E., Spire, M.F., Schwenke, J.R., Unruh, J.A. (1998). Effect of source of cattle and distance transported to a commercial slaughter facility on carcass bruises in mature beef cows. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 212, 668-672.
- Hollung, K., Grove, H., Faergestad, E.M., Sidhu, M.S., Berg, P. (2009). Comparison of muscle proteome profiles in pure breeds of Norwegian Landrace and Duroc at three different ages. *Meat Science*, 81, 487-492.
- Honikel, K.O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447-457.
- Hopkins, D.L., Thompson, J.M. (2002). The relationship between post-mortem calcium concentration or pH and indicators of proteolysis in ovine muscle. *Meat Science*, 61, 411-14.
- Hopkins, D.L. (2000). The relationship between actomyosin, proteolysis and tenderisation examined using protease inhibitors. PhD thesis, University of New England, Australia.
- Houbak, M.B., Ertbjerg, P., Therkildsen, M. (2008). In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and microcalpain. *Meat Science*, 79, 77-85.

- Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M. (1999). Postmortem mechanisms of meat tenderization: The roles of the structural proteins and the calpain system. En: Y. L. Xiong, C.-T. Ho y F. Shahidi (eds.) Quality attributes of muscle foods. (pp 229-251). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Beekman, D.D., Parrish, F.C., Olson, D.G., Robson, R.M. (1996a). Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in post-mortem bovine muscle. *Journal of Animal Science*, 74, 993-1008.
- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Parrish, F.C., Robson, R.M. (1996b). Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting comparisons of purified myofibrils and whole muscle preparations for evaluating titin and nebulin in postmortem bovine muscle. *Journal of Animal Science*, 74, 779-785.
- Huff-Lonergan, E., Parrish, F.C., Robson, R.M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 73, 1064-1073.
- Huff-Lonergan, E.H., Zhang, W., Lonergan, S.M., (2010). Biochemistry of Postmortem Muscle – Lessons on Mechanisms of Meat Tenderization. *Meat Science*, 86, 184-195.
- Ilian, M.A., Morton, J.D., Kent, M.P., Le Couteur, C.E., Hickford, J., Cowley, R., Bickerstaffe, R. (2000). Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *Journal of Animal Science*, 79, 122-132.
- Immonen, K., Poulanne, E. (2000). Variation of residual glycogen-glucose concentration at ultimate pH values below 5.75. *Meat Science*, 55, 279-283.
- Insausti, K., Beriain, M.J., Alzueta, M.J., Carr, T.R., Purroy, A. (2004). Lipid composition of the intramuscular fat of beef from Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. *Meat Science*, 66, 639-646.
- Jia, X.H., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K.I., Bendixen, E. (2006). Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M-longissimus dorsi and M-semitendinosus. *Proteomics*, 6(3), 936-944.
- Johnson, M.H., Calkins, C.R., Huffman, R.D., Johnson, D.D., Hargrove, D.D. (1990). Differences in cathepsin B+L and calcium-dependent protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness. *Journal of Animal Science*, 68, 2371-2379.
- Johnston, D.J., Reverter, A., Robinson, D.L., Ferguson, D.M. (2001). Sources of variation in mechanical shear force measures of tenderness in beef from tropically adapted genotypes, effects of data editing and their implications for genetic parameter estimation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41, 991-996.
- Jouliá-Ekaza, D., Cabello, G. (2006). Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental Cell Research*, 312, 2401-2414.
- Jurie, C., Martin, J.F., Listrat, A., Jailler, R., Culioli, J., Picard, B. (2005). Effects of age and breed of beef bulls on growth parameters, carcass and muscle characteristics. *Animal Science*, 80, 257-263.

- Jurie, C., Picard, B., Gigli, S., Alberti, P., Sañudo, C., Levéziel, H., Williams, J. Hocquette, J.F. (2004). Metabolic and contractile characteristics of longissimus thoracis muscle of young bulls from 8 European breeds. *Rencontres Recherches Ruminants*, 11, 121.
- Kemp, C.M., Parr, T. (2008). The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle. *Animal*, 2, 1254-1264.
- Kemp, C.M., Bardsley, R.G., Parr, T. (2006). Changes in caspase activity during the post-mortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 84, 2841-2846.
- Kemp, C.M., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P.J., Parr, T. (2010) Tenderness-An enzymatic view. *Meat Science*, 84, 248-256.
- King, D.A., Shuehle Pfeiffer, C.E., Randel, R.D., Welsh, T.H.Jr., Oliphint, R.A., Baird, B.E., y cols (2006). Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, 74, 546-556.
- Kirschke, H., Barrett, A.J., Rawlings, N.D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile*, 2, 1581-1643.
- Kolczak, T., Pospiech, E., Palka, K., Lacki, J. (2003). Changes of miofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of psoas major and minor and semitendinosus muscles from calves, heifers and cows during post-mortem ageing. *Meat Science*, 64, 69-75.
- Koohmaraie, M., Geesink, G.H. (2006). Contribution of post-mortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*, 74, 34-43.
- Koohmaraie, M. (1992). Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with mu-calpains. *Journal of Animal Science*, 70, 3697-3708.
- Koohmaraie, M., Kent, M., Shackelford, S., Veiseth, E., Wheeler, T. (2002). Meat tenderness and muscle growth: Is there any relationship?. *Meat Science*, 62(3), 345-352.
- Koohmaraie, M., Seidman, S.C., Schollmeyer, J.E., Dutson, T.R., Crouse, J.D. (1987). Effects of post-mortem storage on Ca⁺⁺- dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Science*, 19, 187-196.
- Koohmaraie, M., Seidman, S.C., Schollmeyer, J.E., Dutson, T.R., Babiker, A.S. (1988). Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. *Journal of Animal Science*, 67, 934-942.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D.H., Crouse, J.D., Mersmann, H.J. (1991). Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 69, 617-624.
- Kos, J., Lah, T.T. (1998). Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer. *Oncology Report*, 5, 1349-1361.
- Kramer, R., Workman, J.Jr., Reeves, J.B. (2004). Qualitative analysis. In: Roberts CA, Workman J Jr, Reeves JB III, editors. *Near-infrared spectroscopy in agriculture*. Madison, Wis.: American Society of Agronomy Inc.; Crop Science Society of America Inc.; and Soil Science Society of America Inc. Publishers. (pp 175-206).

- Kreikemeier, K.K., Unruh, J.A., Eck, T.P. (1998). Factors affecting the occurrence of dark-cutting beef and selected carcass traits in finished beef cattle. *Journal of Animal Science*, 76, 388-395.
- Kumamoto, T., Ueyama, H., Sugihara, R., Kominami, E., Goll, D.E., Tsuda, T. (1997). Calpain and cathepsins in the skeletal muscle of inflammatory myopathies. *European Neurology*, 37, 176-181.
- Lamare, M., Taylor, R.G., Farout, L., Briand, Y., Briand, M. (2002). Changes in proteasome activity during post-mortem aging of bovine muscle. *Meat Science*, 61, 199-204.
- Lametsch, R., Lonergan, S., Huff-Lonergan, E. (2008). Disulfide bond within J-calpain active site inhibits activity and autolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Proteins Proteomics*, 1784, 1215-1221.
- Lametsch, R., Roepstorff, P., Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5508-5512.
- Lametsch, R., Roepstorff, P., Moller, H.S., Bendixen, E. (2004). Identification of myofibrillar substrates for mu-calpain, *Meat Science* 68, 515-521.
- Lazzaroni, C., Biagini, D. (2008). Effect of pre- and post-pubertal castration on Piemontese male cattle. II: Carcass measures and meat yield. *Meat Science*, 80, 442-448.
- Lecker, S.H., Solomon, V., Price, S.R., Kwon, Y.T., Mitch, W.E., Goldberg, A.L. (1999). Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 1411-1420.
- Lefaucheur, L. (2010). A second look into fibre typing - Relation to meat quality. *Meat Science*, 84, 257-270.
- Liu, Y., Lyon, B.G., Windham, W.R., Realini, C.E., Pringle, T.D.D., Duckett, S. (2003). Prediction of color, texture, and sensory characteristics of beef steaks by visible and near infrared reflectance spectroscopy. A feasibility study. *Meat Science*, 65, 1107-1115.
- Lloyd, J.B., Mason, R.W. (1996). Biology of the lysosome. En: *Subcellular biochemistry* (vol. 27). New York: Plenum Press.
- Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E., Rowe, L.J., Kuhlers, D.L. Jungst, S.B. (2001). Selection for lean growth efficiency in duroc pigs influences pork quality. *Journal of Animal Science*, 79, 2075-2085.
- López-Vázquez, R., Vanaclocha, A. (2004). Envasado de la carne con modificación de la atmósfera. (2004). En: *Tecnología de Mataderos. Colección tecnología de Alimentos*. Ediciones Mundi-Prensa. (pp186).
- Mach, N., Bach, A., Velarde, A., Devant, M. (2008). Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. *Meat Science*, 78, 232-238.
- Maher, S.C., Mullen, A.M., Buckley, D.J., Kerry, J.P., Moloney, A.P. (2005). The influence of biochemical differences on the variation in tenderness of *M. longissimus dorsi* of Belgian Blue steers managed homogenously pre and postslaughter. *Meat Science*, 69, 215-224.
- Majino, G., Jons, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, 146, 3-15.
- Mancini, R.A., Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 100-121.

- Mandell, I.B., Buchanan-Smith, J.G., Campbell, C.P. (1998). Effects of forage vs grain feeding on carcass characteristics, fatty acid composition, and beef quality in Limousincross steers when time on feed is controlled. *Journal of Animal Science*, 76(10), 2619-2630.
- Mandell, I.B., Gullett, E.A., Wilton, J.W., Kemp, R.A., Allen, O.B. (1997). Effects of gender and breed on carcass traits, chemical composition and palatability attributes in Hereford and Simmental bulls and steers. *Livestock Production Science*, 49, 235-248.
- Marino, R., Albenzio, M., Braghieri, A., Muscio, A., Sevi, A. (2006). Organic farming: effects of forage to concentrate ratio and ageing time on meat quality of Podolian young bulls. *Livestock Science*, 102, 42-50.
- MARM, 2008. [http://aplicaciones.mapa.es/documentos_cuotas/MEMORIA VACUNO CARNE 2008.pdf](http://aplicaciones.mapa.es/documentos_cuotas/MEMORIA_VACUNO_CARNE_2008.pdf)
- Marsh, B.B. (1954). Rigor mortis in beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 5, 70-75.
- Martinaud, A., Mercier, Y., Marinova, P., Tassy, C., Gatellier, P., Renerre, M. (1997). Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2481-2487.
- McCormick, R.J., (2009). Collagen, Applied muscle biology and meat science. Du, M., R.J. McCormick, CRC Press, Boca Raton, FL, 129-148.
- Mcpherron, A.C., Lee, S. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94*, 12457-12461.
- Ménissier, F. (1982) Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production. Eds. King, J.W.B. & Ménissier, F. (pp. 387- 428). Nijhoff, The Hague, The Netherlands.
- Medeiros, L.C., Field, R.A., Menkhaus, D.J., Russell, W.C. (1987). Evaluation of range-grazed and concentrate-fed beef by a trained sensory panel, a household panel and a laboratory test market group. *Journal of Sensory Studies*, 2, 259-272.
- Melody, J.L., Lonergan, S.M., Rowe, L.J., Huiatt, T.W., Mayes, M.S., Huff-Lonergan, E. (2004). Early post-mortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *Journal of Animal Science*, 82, 1195-1205.
- Meyers, S.N., Beever, J.E. (2008). Investigating the genetic basis of pork tenderness: Genomic analysis of porcine CAST. *Animal Genetics*, 39, 531-543.
- Mikami, M., Whiting, A.H., Taylor, M.A.J., Maciewicz, R.A., Etherington, D.J. (1987). Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin l and lysosomal lysates. *Meat Science*, 21, 81-97.
- Miller, M.F., Cross, H.R., Crouse, J.D., Jenkins, T.G. (1987). Effect of feed energy-intake on collagen characteristics and muscle quality of mature cows. *Meat Science*, 21(4), 287-294.
- Moldoveanu, T., Hosfield, C.M., Lim, D., Elce, J.S., Jia, Z., Davies, P.L. (2002). A Ca²⁺ Switch Aligns the Active Site of Calpain. *Cell*, 108, 649-660.
- Monsón, F., Sañudo, C., Sierra, I. (2005) Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat Science*, 71, 471-479.
- Morita, S., Cooper, C.C., Cassens, R.G., Kastenschmidt, L.L. (1970). A histological study of myoglobin in developing muscle of the pig. *Journal of Animal Science*, 31, 664-670.

- Mounier, L., Dubroeuq, H., Andanson, S., Veissier, I. (2006). Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. *Journal of Animal Science*, 84, 1567-1576.
- Napolitano, F., Carlucci, A., Braghieri, A., Cifuni, G.F., Riviezzi, A.M., Monteleone, E., Girolami, A. (2001). Influenza della lunghezza del periodo di frollatura su alcune caratteristiche sensoriali della carne di vitelloni Podolici. *Zootec. Nutr. Anim.*, 27, 85- 89.
- Neti, G., Novak, S.M., Thompson, V.F., Goll, D.E. (2009). Properties of easily releasable myofilaments: Are they the first step in myofibrillar protein turnover?, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296, C1383-C1390.
- Nishimura, T., Liu, A., Hattori, A., Takahashi, K.. (1998). Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during post-mortem ageing of beef. *Journal of Animal Science*, 76, 528-532.
- Nockels, C.F., Odde, K.G., Craig, A.M. (1996). Vitamin E supplementation and stress affect tissue alpha-tocopherol content of beef heifers. *Journal of Animal Science*, 74, 672-677.
- O'Sullivan, A., Galvin, K., Moloney, A.P., Troy, D.J., O'Sullivan, K., Kerry, J.P. (2003). Effect of pre-slaughter rations of forage and/or concentrates on the composition and quality of retail packaged beef. *Meat Science*, 63, 279-286.
- Offer, G., Trinick, J. (1983). On the mechanism of water-holding in meat: The swelling and shrinkage of myofibrils. *Meat Science*, 8, 245-281.
- O'Halloran, G.R., Troy, D.J., Buckley, D.J., Reville, W.J. (1997). The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolising muscle. *Meat Science*, 47, 187-210.
- Oliván M., Martínez-Cerezo, S., De La Roza, B., Osoro, K., Albertí, P., Mocha, M., Martínez, M.J., Panea, B., Olleta, J.L., Sañudo C. (2003b). Aplicación del análisis instrumental y la espectroscopía en el infrarrojo cercano para identificar la raza de origen de la carne. *ITEA*, 24, 67-69.
- Oliván, M., Mocha, M., Martínez, M.J., Montes, A., García, P., Martínez, A., Osoro, K. (2001a). Efecto de la raza y la castración sobre la calidad físico-química y sensorial de la carne de terneros asturianos sometidos a cebo intensivo. *ITEA*, 22, 538- 540.
- Oliván, M., Osoro, K., Guerrero, L. (2001b). Characteristics of beef affecting consumer acceptance. 4th Pangborn Sensory Science Symposium, Book of abstracts (pp 148). Dijon, Francia.
- Oliván, M., Sierra, V., Castro, P., Martínez, A., Celaya, R., Osoro, K. (2009) Carcass and meat quality from yearling bulls manager under organic or convencional systems. 60th Annual meeting of the European Federation of Animal Science- EAAP. Barcelona, Spain, Septiembre.
- Oliván, M., Coto-Montes, A., Caballero, B., Sierra, V., Aldai, N., Rodríguez-Colunga, M.J., Osoro, K. (2004b). Meat tenderization by acidic lisosomal proteinases associated with genotype in beef. En: 50th International Congress of Meat Science and Technology, Helsinki, Finland.
- Oliván, M., De la Roza, B., Martínez, M.J., Mocha, M. (2001c). Predicción de la composición química y el contenido de pigmentos de la carne de vacuno por transmitancia en el infrarrojo cercano. *ITEA*, 22, 601-603.

- Oliván, M., García, P., Martínez, M.J., Mocha, M., Martínez, A., Castro, P., Osoro, K. (2005). The effect of post-weaning management on the physico-chemical and textural quality of beef from bulls and steers. XX International Grassland Congress. Dublin. Congress Proc. (pp.190). Eds. O'Mara, F.P., Wilkins, R.J., Mannetje, L. Lovett, D.K., Rogers, P.A.M., Boland, T.M.
- Oliván, M., Martínez, A., Osoro, K., Sañudo, C., Panea, P., Olleta, J.L., Campo, M.M., Olivér, M.A., Serra, X., Gil, M., Piedrafita, J. (2004a). Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Science*, 68, 567-575.
- Oliván, M., Martínez-Cerezo, S., De La Roza, B., Osoro, K., Albertí, P., Mocha, M., Martínez, M.J., Panea, B., Olleta, J.L., Sañudo, C. (2003c). Aplicación del análisis instrumental y la espectroscopía en el infrarrojo cercano para identificar la raza de origen de la carne. *ITEA*, 24, 67-69.
- Oliván, M., Mocha, M., Martínez, A., Castro, P., Osoro, K. (2003b). Evolución post-mortem de la dureza instrumental de la carne de distintos genotipos de las razas bovinas asturianas. *ITEA*, 24, 43-45.
- Oliván, M., Osoro K, Mocha, M., García, P., Martínez, M.J., Martínez, A., Aldai, N., Guerrero, L. (2002) Effect of breed, castration and finishing period on the sensory quality of beef from extensive systems. 48th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), (pp720-721). Roma, Italia. Congress proceedings.
- Olson, D.G. Parrish, F.C. (1977). Relationship of myofibril fragmentation index to measures of beefsteak tenderness. *Journal of Food Science*, 42, 506-509.
- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H. (1993). Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. Essex, UK: Longman Scientific & Technical.
- Osoro, K., Martínez, A., García, M.J., Oliván, M., Castro, P. (2001). Efecto de la raza, la castración y el acabado en los crecimientos, características de la canal y calidad sensorial de la carne de añejos cebados en pastoreo. *ITEA*, 22, 535-537.
- Otsuka, Y., Goll, D.E. (1987). Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5839-5851.
- Ouali, A., Herrera-Méndez, C.H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., Sentandreu, M.A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci*, 74, 44-58.
- Ouali, A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251-265.
- Ouali, A., Talmant, A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28, 331-348.
- Page, J.K., Wulf, D.M., Schwotzer, T.R. (2001). A survey of beef muscle color and pH. *Journal of Animal Science*, 79, 678-687.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B. (1996). Tejido muscular. En: *Citología e Histología Vegetal y Animal. Biología de la células y tejidos animales y vegetales*. (pp. 464-481). Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, España.

- Parr, T., Sensky, P.L., Scothern, G.P., Bardsley, R.G., Buttery, P.J., Wood, J.D., Warkup, C. (1999). Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Sciences*, 77, 661-668.
- Pasquini, L.A., Marta, C.B., Adamo, A.M., Pasquini, J.M., Soto, E.F. (2000). Relationship between the ubiquitin-dependent pathway and apoptosis in different cells of the central nervous system: effect of thyroid hormones. *Neurochemical Research*, 25, 627-635.
- Pérez-Marín, D., De Pedro Sanz, E., Guerrero-Ginel, J.E., Garrido-Varo, A. (2009). A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, 83, 627-633.
- Peters, J.M., Franke, W.W., Kleinschmidt, J.A. (1994). Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 7709-7718.
- Piedrafita, J., Quintanilla, R., Sañudo, C., Olleta, J.L., Campo, M.M., Panea, B., Renand, G., Turin, F., Jabet, S., Osoro, K., Oliván, M., Noval, G., García, P., García, M.D., y cols. (2003). Carcass quality of ten beef cattle breeds of the south-west of Europe. *Livestock Production Science*, 82, 1-13.
- Pla, M., Hernández, P., Ariño, B., Ramírez, J.A., Díaz, I. (2007). Prediction of fatty acid content in rabbit meat and discrimination between conventional and organic production systems by NIRS methodology. *Food Chemistry*, 100, 165-170.
- Pomponio, L., Ertbjerg, P., Karlsson, A.H., Costa, L.N., Lametsch, R. (2010). Influence of early pH decline on calpain activity in porcine muscle. *Meat Science*, 85, 110-114.
- Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., Sinell, H.J. (1994). *Tecnología e higiene de la carne*. (pp. 370 -378). España, Acribia..
- Prates, J.A.M., Ribeiro, A.M.R., Dias Correia, A.A. (2001). Role of cysteine endopeptidases (EC 3.4.22) in rabbit meat tenderisation and some related changes. *Meat Science*, 57, 283-290.
- Prevolnik, M., Candek-Potokar, M., Škorjanc, D. (2004). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality: a review. *Czechoslovak Journal of Animal Science*, 49, 500-510.
- Price, D.M., Hilton, G.G., VanOverbeke, D.L., Morgan, J.B. (2008). Using the near-infrared system to sort various beef middle and end muscle cuts into tenderness categories. *Journal of Animal Science*, 86, 413-418.
- Prieto, N., Andrés, S., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Lavín, P. (2008a). Ability of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to estimate physical parameters of adult steers (oxen) and young cattle meat samples. *Meat Science*, 79, 692-699.
- Prieto, N., Andrés, S., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Lavín, P. (2008b). Discrimination of adult steers (oxen) and young cattle ground meat samples by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science*, 79, 198-201.
- Prieto, N., Andrés, S., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Lavín, P. (2006). Potential use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of chemical composition of oxen meat samples. *Meat Science*, 74, 487-496.
- Prieto, N., Roche, R., Lavín, P., Batten, G., Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83, 96-103.

- Priolo, A., Micol, D., Agabriel, J. (2001). Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour: a review. *Animal Research*, 50, 185-200.
- Purchas, R.W., Burnham, D.L., Morris, S.T. (2002). Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. *Journal of Animal Science*, 80, 3211-3221.
- Purintrapiban, J., Wang, M.C., Forsberg, N.E. (2003). Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells, *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry & Molecular Biology*, 136, 393-401.
- Purslow, P.P., Mandel, I.B., Widowski, T.M., Brown, J., deLange, C.F.M., Robinson, J.A.B., Squires, E.J., Cha, M.C., VanderVoor, G.(2008). Modelling quality variations in commercial Ontario pork production. *Meat Science*, 80, 123-131.
- Quaresima, V., Lepanto, R., Ferrari, M. (2003). The use of near infrared spectroscopy in sports medicine. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 43, 1-13.
- Raes, K., de Smet, S., Demeyer, D. (2001). Effect of double-muscling in Belgian Blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids. *Animal Science*, 73, 253-260.
- Real Decreto 2129/2008
- Realini, C.E., Duckett, S.K., Windham, W.R. (2004). Effect of vitamin C addition to ground beef from grass-fed or grain-fed sources on color and lipid stability, and prediction of fatty acid composition by near-infrared reflectance analysis. *Meat Science*, 68, 35-43.
- Reich, G. (2005). Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1109-1143.
- Renerre, M., Poncet, K., Mercier, Y., Gatellier, P., Metro, B. (1999). Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscles of turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 237-244.
- Rhee, M.S., Ryu, Y.C., Kim, B.C. (2006). Post-mortem metabolic rate and calpain system activities on beef Longissimus tenderness classifications. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70(5), 1166-1172.
- Riggs, J.K., Conrad, B.E., Marion, P.T., Allen, J.H. (1967). Young bulls, steers and heifers for slaughter beef production. *Journal of Animal Science*, 26, 211.
- Ripoll, G., Albertí, P., Panea, B., Olleta, J.L., Sañudo, C. (2008). Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting chemical, instrumental and sensory quality of beef. *Meat Science*, 80, 697-702.
- Robert, N., Briand, M., Taylor, R., Briand, Y. (1999). The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Science*, 51(2), 149-153.
- Robson, R.M. (1989) Intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology*, 1, 36-43.
- Robson, R.M., Huff-Lonergan, E., Parrish, F.C., Ho, C.T., Stromer, M.H., Huiatt, T.W., Bellin, R. M., Sernett, S.W. (1995). Postmortem changes in the myofibrillar and other cytoskeletal proteins in muscle. En: 50th Annual Reciprocal Meat Conference, (pp 43-52). Ames, Iowa, USA.
- Ross, M.H., Pawlina, W. (2007). Tejido muscular. En: *Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. (pp 304-315). Eds. Editorial medica panamericana.

- Rowe, L.J., Maddock, K.R., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E. (2004a). Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *Journal of Animal Science*, 82, 785-793.
- Rowe, L.J., Maddock, K.R., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E. (2004b). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of l-calpain. *Journal of Animal Science*, 82, 3254-3266.
- SADEI, 2009. En:
<http://www.sadei.es/datos/cuadros%20tematicos/capitulo%20K/2/K26202SSSSSa.xls>
- Sandri, M., El Meslemani, A.H., Sandri, C., Schjerling, P., Vissing, K., Andersen, J.L., Rossini, K., Carraro, U., Angelini, C. (2001). Caspase 3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment?. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60, 302-312.
- Santolaria, P. (1993). Influencia de factores genéticos y ambientales sobre los parámetros sensoriales que definen la calidad de la carne de añejo. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. España.
- Sañudo, C., Macie, E.S., Olleta, J.L., Villarroel, M., Panea, B., Albertí, P. (2004). The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science*, 66, 925-932.
- Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., LeRoy, P., Monin, G., Chérel, P., Laville, E. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig Semimembranosus muscle: Implications on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2732-2737.
- Schaefer, A.L., Jones, S.D., Stanley, R.W. (1997). The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. *Journal of Animal Science*, 75, 258-265.
- Schreurs, N.M., Garcia, F., Jurie, C., Agabriel, J., Micol, D., Bauchart, D., Listrat, A., Picard, B. (2008). Meta-analysis of the effect of animal maturity on muscle characteristics in different muscles, breeds, and sexes of cattle. *Journal of Animal Science*, 86, 2872-2887.
- Schroeder, J.W., Cramer, D.A., Bowling, R.A., Cook, C.W. (1980). Palatability, shelf-life and chemical differences between forage- and grain-finished beef. *Journal of Animal Science*, 50, 852-859.
- Seideman, S.C., Cross, H.R., Oltjen, R.R., Schanbacher, B.D. (1982). Utilization of the intact male for red meat production: A review. *Journal of Animal Science*, 55, 826-840.
- Sekikawa, M., Yamamoto, M., Fukushima, M., Shimada, K., Ishikawa, T., Mikami, M. (2001). Effect of proteasome inhibitor on sarcoplasmic protein of bovine skeletal muscle during storage. *Food Chemistry*, 73, 17-21.
- Sentandreu, M.A., Coulis, G., Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13(12), 400-421.
- Serra, X., Guerrero, L., Guàrdia, M.D., Gil, M., Sañudo, C., Panea, B., Campo, M.M., Olleta, J.L., García-Cachán, M.D., Piedrafita, J., Oliver, M.A. (2008). Eating quality of young bulls from three Spanish beef breed-production systems and its relationships with chemical and instrumental meat quality. *Meat Science*, 79, 98-104.

- Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Wheeler, T.L., Cundiff, L.V., Dikeman, M.E. (1994). Effect of biological type of cattle on the incidence of the dark, firm, and dry condition in the Longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 72, 337-343.
- Shenk, J.S., Hoover, M.R. (1976). Infrared reflectance spectrocomputer design and application. In: *Advances in Automated Analysis*, (pp.122-125). Technicon, Tarrytown, New York, USA.
- Shorthose, W.R., Harris, P.V. (1990). Effect of animal age on the tenderness of selected beef muscles. *Journal of Food Science*, 55, 1-8.
- Sierra, V., Caballero, B., Rodríguez-Colunga, M.J., Mocha, M., Castro, P., Coto-Montes, A., Oliván, M. (2006). Relación entre la longitud de los sarcómeros y el proceso de tenderización de las razas Asturiana de los Valles y Asturiana de la Montaña. II Congreso Nacional de Carne de Vacuno. Gijón, España.
- Silva, J.A., Patarata, L., Martins, C. (1999). Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Science*, 52, 453-459.
- Sivakesava, S., Irudayaraj, J. (2002). Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 85, 487-493.
- Smith, G.C. (2001). Global sources of, and markets for, beef (and perhaps, for buffalo meat); factors affecting palatability of beef and of meat from the water buffalo. En: *Proceedings VI World Buffalo Congress. The búffalo. An alternative for Animal Agriculture in the Third Millennium* (Eds. Huerta-Leidenz, N.; Vergara, L.J. Rodas-González, A., (pp. 172- 201). Astro data S.A., Maracaibo, Venezuela.
- Smith, R.F., Dobson, H. (1990). Effect of pre-slaughter experience on behaviour, plasma cortisol and muscle pH in farmed red deer. *Veterinary Research*, 126, 155-158.
- Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., Suzuki, K. (1989). Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 20106-20111.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., De Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow: environmental issues and options*. LEAD/FAO, Roma.
- Stoltze, L., Nussbaum, A.K., Sijts, A., Emmerich, N.P., Kloetzel, P.M., Schild, H. (2000). The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunology Today*, 21, 317-319.
- Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y., Imahori, K. (1981). Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *Journal of Biochemistry*, 90, 275-278.
- Swatland, H.J., Kieffer, N.M. (1974). Fetal development of the double muscled condition in cattle. *Journal of Animal Science*, 38, 752-57.
- Sylvestre, M.N., Balcerzak, D., Feidt, C., Baracos, V.E., Brun Bellut, J. (2002). Elevated rate of collagen solubilization and postmortem degradation in muscles of lambs with high growth rates: Possible relationship with activity of matrix metalloproteinases. *Journal of Animal Science*, 80, 1871-1878
- Szczenesniak, A.S. (1963). Objective measurements of food textura. *Journal of Animal Science*, 28, 410.

- Taillandier, D., Combaret, L., Pouch, M.N., Samuels, S.E., Bechet, D., Attaix, D. (2004). The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 357-361.
- Taylor, R.G., Tassy, C., Briand, M., Robert, N., Briand, Y., Ouali, A. (1995). Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Molecular Biology Report*, 21, 71-73.
- Tews, D.S. (2005). Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle and Nerve*, 32, 443-458.
- Thomas, A.R, Gondoza, H., Hoffman, L.C., Oosthuizen, V., Naudé, R.J. (2004). The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. *Meat Science*, 67, 113-120.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 40235-40243.
- Touraille, T., Girard, J.P. (1985). *Bull. Tech. C. R. Z. V. Theix, INRA*, 60, 83-97.
- Tuma, H.J., Henrickson R.L., Stephens D.F., Moore R. (1962). Influence of marbling and animal age on factors associated with beef quality. *Journal of Animal Science*, 21, 848-851.
- Turk, B., Turk, D., Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica Biophysica Acta*, 1477, 98-111.
- Underwood, K.R., Means, W.J., Du, M. (2008). Caspase 3 is not likely involved in the post-mortem tenderization of beef muscle. *Journal of Animal Science*, 86, 960-966.
- Uytterhaegen, L., Claeys, E. Demeyer, D. (1994). Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *Journal of Animal Science*, 72, 1209-1223.
- Varela, A., Oliete, B., Moreno, T., Portela, C., Carballo, J.A., Sánchez, L., Monserrat, L. (2003). Calidad de la carne de machos enteros y castrados de raza Rubia Gallega sacrificados con 24 meses. *Archivos de Zootecnia*, 52, 347-358.
- Venel, C., Mullen, A.M., Downey, G., Troy, D.J. (2001). Prediction of tenderness and other quality attributes of beef by near infrared reflectance spectroscopy between 750 and 1100 nm, further studies. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9, 185-198.
- Vieira, C., Diaz, M.T., Martínez, B., García-Cachán, M.D. (2009). Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbiological and sensory quality of rustic crossbred beef at different states of ageing. *Meat Science*, 83, 398-404.
- Vieira, C., Domínguez, M., García-Cachán, M.D. (2002). Carcass characteristics and effect of ageing time in yearling beef of the rustic genotype and of a genotype improved by crossbreeding with the Charolais breed. En: *Proceedings of 48th International Congress of Meat Science and Technology*. (pp. 364-365). Rome, Italy.
- Viljoen, H.F., De Kock, H.L., Webb, E.C. (2002). Consumer acceptability of dark firm and dry (DFD) and normal pH beef steaks. *Meat Science*, 61, 181-185.
- Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: Can you tell the difference? *Trends Neurosci.*, 23, 20-26.
- Warner, R.D., Bond, J.J., Kerr, M.G. (2000). Meat quality traits in lamb M. Longissimus thoracis et lumborum: The effect of pre-slaughter stress and electrical stimulation. En: *46th*

- international congress of meat science and technology (pp. 154–155). Argentina: Buenos Aires.
- Warner, R.D., Ferguson, D.M., McDonagh, M.B., Channon, H.A., Cottrell, J.J., Dunshea, F.R. (2005). Acute exercise stress and electrical stimulation influence the consumer perception of sheep meat eating quality and objective quality traits. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45, 553-560.
- Warner, R.D., Greenwood, P.L., Pethick, D.W., Ferguson, D.M. (2010) Genetic and environmental effects on meat quality, *Meat Science*, 86, 171-183.
- Warren, H.E., Scollan, N.D., Enser, M., Hughes, S.I., Richardson, R.I., Wood, J.D. (2008). Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition. *Meat Science*, 78, 256-269.
- Warriss, P.D. (2003). Optimal lairage times and conditions for slaughter pigs: A review. *Veterinary Research*, 153, 170-176.
- Weaver, A.D., Bowker, B.C., Gerrard, D.E. (2009). Sarcomere length influences μ -calpain-mediated proteolysis of bovine myofibrils. *Journal of Animal Science*, 87, 2096-2103.
- Weaver, A.D., Bowker, B.C., Gerrard, D.E. (2008). Sarcomere length influences post-mortem proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. *Journal of Animal Science*, 86, 1925-1932.
- Weaver, A.D., Jouault, L., Bowker, B.C., Grant, A.L., Gerrard, D.E. (2007). Sarcomeric thick and thin filament overlap influences postmortem proteolysis. *Journal of Animal Science*, 85, 81-91.
- Wheeler, T.L., Cundiff, L.V., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M. (2005). Characterization of biological types of cattle (Cycle VII): Carcass, yield, and longissimus palatability traits. *Journal of Animal Science*, 83, 196-207.
- Wheeler, T.L., Koohmaraie, M. (1994). Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 72, 1232-1238.
- Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Casas, E., Cundiff, L.V., Koohmaraie, M. (2001). The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *Journal of Animal Science*, 79, 3069-3074.
- Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M.E., Crouse, J.D., Hunt, M.C., Klemm, R.D. (1990). Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 68, 2716-2728.
- Wiener, P., Woolliams, J.A, Frank-Lawale, A., Ryan, M., Richardson, R.I., Nute, G.R., Wood, J.D., Homer, D., Williams, J.L. (2009). The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. *Meat Science*, 83, 127-134.
- Williams, P., Norris, K. (2001). *Near- Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. Second Edition. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P. R., Enser, M. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Science*, 66, 21-32.

- Wulf, D.M., Emmett, R.S., Leheska, J.M., Moeller, S.J. (2002). Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. *Journal of Animal Science*, 80, 1895-1903.
- Xiong, Y.L., Mullins, O.E., Stika, J.F., Chen, J., Blanchard, S.P., Moody, W.P. (2007). Tenderness and oxidative stability of post-mortem muscles from mature cows of various ages. *Meat Science*, 77, 105-113.
- Yamada, H., Saito, F., Fukuta-Ohi, H., Zhong, D., Hase, A., Arai, K., Okuyama, A., Maekawa, R., Shimizu, T., Matsumura, K. (2001). Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Human Molecular Genetics*, 10, 1563-1569.
- Yang, A., Lanari, M.C., Brewster, M., Tume, R.K. (2002). Lipid stability and meat colour of beef from pasture- and grain-fed cattle with or without vitamin E supplement. *Meat Science*, 60, 41-50.
- Zeece, M.G., Robson, R.M., Lusby, M.L., Parrish, F.C. (1986). Effect of calcium activated protease (CAF) on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature, *Journal of Food Science*, 51, 797-803.
- Zeece, M.G., Woods, T.L., Keen, M.A., Reville, W.J. (1992). Role of proteinases and inhibitors in post-mortem muscle protein degradation. *Proceedings of the Reciprocal Meat Conference, Colorado State University*, 45, 51-61.
- Zhang, S.X., Farouk, M.M., Young, O.A., Wieliczko, K.J., Podmore, C. (2005). Functional stability of frozen normal and high pH beef. *Meat Science*, 69, 765-772.
- Zhang, W.G., Lonergan, S.M., Gardner, M.A., Huff-Lonergan, E. (2006) Contribution of postmortem changes of integrin, desmin and mu-calpain to variation in water holding capacity of pork. *Meat Science*, 74, 578-585.