

## ESTUDIO DE LA MADURACIÓN *POST MORTEM* DE LA CARNE DE VACUNO MEDIANTE EL ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA FRACCIÓN MIOFIBRILAR

Beldarrain, L.R.<sup>1,2</sup>, Aldai, N.<sup>2</sup>, Navarro, J.L.<sup>1</sup>, y Sentandreu, M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). 46980 Paterna (Valencia).

<sup>2</sup> Centro de investigación Lascaray (UPV-EHU), Dpto. Farmacia y Ciencias de los Alimentos. Avda. Miguel de Unamuno 3.01006 Vitoria- Gasteiz.

\*ciesen@iata.csic.es

### INTRODUCCIÓN

La terneza está considerada una de las características organolépticas de la carne más valoradas por el consumidor (Shackelford *et al.*, 2001). Por ello es importante estudiar el proceso de maduración después del sacrificio, que es responsable de los cambios estructurales y bioquímicos que tiene como resultado la tenderización o ablandamiento de la carne (Ouali *et al.*, 2013). El detallado conocimiento del proceso puede contribuir a un mejor rendimiento en la producción por parte de la industria cárnica y a una mayor satisfacción del consumidor. Junto con otros factores tanto extrínsecos (agentes estresantes, transporte) como intrínsecos (raza, edad, características de la fibra muscular, cantidad y solubilidad de colágeno), la hidrólisis de las proteínas miofibrilares es fundamental en el desarrollo de la terneza (Koohmaraie y Geesink, 2006). El objetivo del presente trabajo es estudiar la evolución de la fracción proteica miofibrilar en el músculo de ternera durante el proceso de maduración a diferentes tiempos *post mortem*, tratando de identificar las proteínas y momentos clave de variación en el perfil proteico.

### MATERIAL Y MÉTODOS

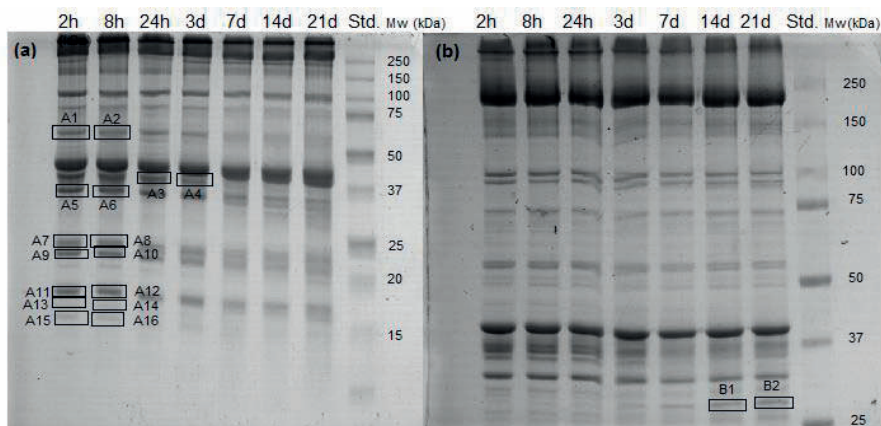
Se tomaron muestras por triplicado del músculo *Longissimus thoracis* (LT) de un ternero macho de la raza Charolaise inmediatamente después del sacrificio. Dichas muestras se conservaron a 4°C, extrayéndose porciones de 100 g de las mismas a 7 tiempos distintos de maduración (2 h, 8 h, 24 h, 3 d, 7 d, 14 d, y 21 d) y congelándolas a -80°C hasta posterior análisis. Con objeto de extraer la fracción miofibrilar, cada muestra de músculo fue homogeneizada en 5 ml de tampón Tris 50 mM, pH 8.0 empleando un politrón, y centrifugada a 10000 g durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado se redisolvió en 5 ml del mismo tampón y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriormente citadas. El precipitado obtenido se redisolvió en 5 ml de tampón Tris 50 mM, pH 8.0 que contenía urea 6 M y tiourea 1 M, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante obtenido fue filtrado con lana de vidrio y almacenado a -80 °C. Con las fracciones obtenidas se realizó una electroforesis SDS-PAGE en geles del 15 y 8 % de poliacrilamida con el objetivo de estudiar el intervalo de masas moleculares de 10 a 250 kDa. Los geles obtenidos fueron teñidos con Coomassie coloidal (Candiano *et al.*, 2004). La intensidad de las bandas se analizó por densitometría empleando el software Un Scan It v6.1. Se seleccionaron y recortaron aquellas bandas que variaban significativamente en intensidad en función del tiempo de maduración ( $P < 0.01$ ), para posteriormente digerirlas con tripsina y caracterizarlas mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-MS/MS). Para la interpretación de los espectros de fragmentación (MS/MS) se empleó el motor de búsqueda MASCOT y las bases de datos Uniprot KB y NCBIInr.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lo más destacado de los geles que se muestra en la Figura 1a es la desaparición o disminución significativa de la intensidad de las proteínas identificadas (Tabla 1). Entre las proteínas implicadas en la contracción muscular, la actina, constituyente de los filamentos delgados, muestra una degradación que según nuestros resultados comienza a las 24 h *post mortem* y es significativa a partir del tercer día (bandas A5 y A6). Tradicionalmente sin embargo, la evolución de la actina *post mortem* ha sido considerada menor, aunque otros estudios han documentado un patrón de degradación (Lametsch *et al.*, 2002), y han subrayado la importancia de estudiar más a fondo la proteólisis de la actina miofibrilar porque incluso una mínima proteólisis de la misma podría alterar la unión actina-miosina (Huff Lonengal *et al.* 2010). Además, el fragmento identificado de actina de 31 kDa (Tabla 1) es de gran interés, ya que ha sido sugerido como marcador apoptótico (Yang *et al.*, 1998). Dicho fragmento, ha sido detectado en estudios llevados a cabo en bovino a partir del día 5

*post mortem*, incrementando su presencia significativamente hasta el día 21 (Laville *et al.*, 2009). En nuestro caso, es identificado a partir del día 7 (Figura 1b, bandas B1 y B2).

La miosina es, junto a la actina, la principal proteína integrante de las miofibrillas, siendo la más abundante en las mismas, por lo que su contribución a la estructura del músculo no se puede obviar. En las bandas A7 y A8 identificamos la cadena ligera de miosina 1, sobre la que otros estudios han identificado una diferencia de tendencia (aumento o disminución) en el proceso de maduración dependiendo de la raza (Marino *et al.*, 2014). En la literatura, han sido citados diversos resultados en cuanto a la relación de la cadena ligera de miosina 1 y la terneza, puesto que se han descrito correlaciones positivas (Anderson *et al.*, 2012) y negativas (Bjarnadottir *et al.*, 2012) entre la terneza y su abundancia. De aquí se confirma que se trata de una proteína cuyo comportamiento es dependiente de la raza y/o músculo analizado, y en nuestro caso observamos degradación a partir de las 24 h. En las bandas A11 y A12 identificamos la cadena ligera de miosina 2, donde se observa un descenso significativo en abundancia a partir del tercer día. En otros estudios se ha descrito un descenso en su abundancia entre el día 10 y 17 del proceso, a la vez que la aparición y aumento de agregados supramoleculares por causa de especies reactivas de oxígeno (Lana *et al.*, 2016; Longo *et al.*, 2015), que en nuestro estudio no se han identificado. Por último, la cadena ligera de miosina 3 es identificada en las bandas A15 y A16 y su descenso significativo en abundancia ocurre a partir de las 24 h. Las cadenas ligeras de miosina, por tanto, servirían de marcador para evaluar el proceso de ablandamiento de la carne, ya que numerosos estudios han establecido relaciones entre su abundancia y la terneza, aunque habría que profundizar en su comportamiento dependiendo de la raza.



**Figura 1.** Gel SDS-PAGE del extracto miofibrilar de proteínas de bovino en diferentes momentos de la maduración (2 h, 8 h, 24 h, 3 d, 7 d, 14 d, 22 d) en geles del a) 15 %, y b) 8 % de acrilamida. Std: Estándar de peso molecular.

La desmina, identificada en las bandas A1 y A2, presenta una disminución de intensidad que se pronuncia al llegar al día 3 *post mortem* aunque sin llegar a desaparecer por completo. Esta proteína es una subunidad del filamento intermedio, y su proteólisis tiene un impacto directo en la terneza (Chen *et al.*, 2014). Varios trabajos han descrito que la degradación de la desmina en el LT es evidente a los 3 d *post mortem*, hasta su casi completa degradación a los 7 d, existiendo ligeras diferencias entre razas y músculos estudiados (Muroya *et al.*, 2010). Nuestros resultados confirman esta tendencia, sin haberse identificado productos de su degradación.

La troponina (TNN), complejo heterotrimérico compuesto por las subunidades TNN I, T y C, forma parte del complejo de regulación de actina, y ha sido empleada como marcador de proteólisis en toro y cerdo (Iwanoska *et al.*, 2010), ya que existe una gran correlación entre su degradación y el proceso de tenderización. Especialmente, la TNN T, (bandas A3 y A4), ha sido estudiada en otras razas bovinas, y su degradación ha sido descrita a partir del día 5 *post mortem*, junto con la aparición de un fragmento de degradación de 30 kDa (Muroya *et al.*, 2004) que en nuestro estudio ha sido identificado en las bandas B1 y B2 (Figura 1b).

Según nuestros resultados sin embargo, la degradación de la troponina T se evidencia a las 24 h, aunque la aparición del fragmento coincide con lo descrito en la literatura alrededor del día 7 *post mortem*. La degradación de la TNN I se puede observar en las bandas A9 y A10, acentuada a partir del día 7 *post mortem*, confirmando resultados obtenidos en otros estudios de bovino (Sierra *et al.*, 2011). La tropomiosina, que junto a la troponina regula el complejo de actomiosina, ha sido identificada junto a la TNN T en las bandas A3 y A4.

**Tabla 1.** Identificación de las proteínas miofibrilares seleccionadas en los geles (Figura 1) de SDS-PAGE por LC-ESI-MS/MS.

BANDAS	PROTEINA(S) IDENTIFICADA(S)	TENDENCIA	PUNTO SIGNIFICATIVO
A1 y A2	Desmina	(↓) Disminuye	3 d <i>p.m.</i>
A3 y A4	Cadena alfa 1 de tropomiosina y troponina T	(↓) Disminuye	24 h <i>p.m.</i>
A5 y A6	Actina	(↓) Disminuye	3 d <i>p.m.</i>
A7 y A8	Cadena ligera de miosina 1	(↓) Disminuye	24 h <i>p.m.</i>
A9 y A10	Troponina I	(↓) Disminuye	7 d <i>p.m.</i>
A11 y A12	Cadena ligera reguladora de miosina 2	(↓) Disminuye	3 d <i>p.m.</i>
A13 y A14	Mioglobina	(↓) Disminuye	24 h <i>p.m.</i>
A15 y A16	Cadena ligera de miosina 3	(↓) Disminuye	24 h <i>p.m.</i>
B1 y B2	Actina (fragmento) y Troponina T (fragmento)	(↑) Aumenta	7 d <i>p.m.</i>

*p.m.*: *post mortem*.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, M.J. *et al.*, 2012. Meat Sci. 90: 345-351.
- Bjarnadottir, S.G. *et al.*, 2012. J.Anim.Sci. 90: 2035-2043.
- Candiano, G. *et al.*, 2004. Electrophoresis 25: 1327-1333.
- Chen, Q. *et al.*, 2014. Food Chem. 150: 220-226.
- Huff Lonergan, E. *et al.*, 2010. Meat Sci. 86: 184-195.
- Iwanowska, A. *et al.*, 2010. Anim. Sci. Pap. Rep. 28: 13-25.
- Koohmaraie, M. *et al.*, 2006. Meat Sci. 74: 34-43.
- Lametsch, R. *et al.*, 2002. J. Agric. Food. Chem. 50: 5508-5512.
- Lana, A. *et al.*, 2016. J. Proteomics 147:85-97.
- Laville, E. *et al.*, 2009. J. Agric.Food.Chem. 57: 10755-10764.
- Longo V. *et al.*, 2015. J. Proteomics 125: 29-40.
- Marino, R. *et al.*, 2014. Meat Sci. 98: 178-186.
- Muroya, S. *et al.*, 2004. Meat Sci. 67: 19-24.
- Muroya, S. *et al.*, 2010. Meat Sci. 86: 764-769.
- Ouali A. *et al.*, 2013. Meat Sci. 95: 854-870.
- Shackelford, S.D. *et al.*, 2001. J. Anim. Sci. 79: 2605-2614.
- Sierra, V. *et al.*, 2012. J. Sci. Food. Agric. 92: 2727-2740.
- Yang, F. *et al.*, 1998. Am. J. Pathol. 152: 379-389.

**Agradecimientos:** Al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del proyecto AGL 2012-32146; al MINECO y a la UPV/EHU por el contrato Ramón y Cajal (RYC-2011-08593) de N. Aldai, y al Departamento de desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco por la beca de L.R. Beldarrain.

#### STUDY OF POST MORTEM BEEF AGING BY THE ANALYSIS OF THE MIOFIBRILLAR PROTEOME FRACTION

**ABSTRACT:** This study was designed to evaluate the changes of the myofibrillar proteome of *Longissimus thoracis* muscle from Charolaise breed over 7 different time points during meat aging up to 22 days *post mortem*. Protein extraction, SDS-PAGE electrophoresis and LC-ESI-MS/MS identification of the most significant bands was performed. 18 bands were analyzed and the results obtained were compared with published studies performed in other muscles and/or breeds, revealing some differences in the aging process. Actin and troponin T degradation was reported, together with the appearance of their corresponding 30 kDa degradation products. The hydrolysis of desmin, tropomyosin alpha 1 chain, myosin light chain 1, 2 and 3, troponin I, and myoglobin was also observed.

**Keywords:** aging, proteolysis, tenderness, *Longissimus thoracis*