



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y DE TEXTURA DEL MÚSCULO**  
***BRACHIOCEPHALICUS* DE BOVINO MARINADO CON CLORURO DE**  
**CALCIO.**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRO EN ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
Roberto González Tenorio

Comité:

Dr. Alfonso Totosaus Sánchez, Director, CICYTA, UAEH  
Dra. María de Lourdes Pérez Chabela, Co-Director, UAM-Iztapalapa  
Dr. Javier Mateo Oyagüe, Asesor, Universidad de León, España

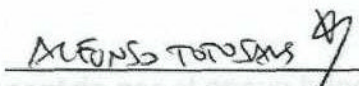
Tulancingo, Hidalgo, Agosto de 2003


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS


Tulancingo, Hidalgo, agosto del 2003

Los que suscriben hacemos constar que el trabajo de tesis de la Maestría en Alimentos titulado "**Propiedades fisicoquímicas y de textura del músculo *brachiocephalicus* de bovino, marinado con cloruro de calcio**", realizada por *Roberto González Tenorio*, ha sido revisada minuciosamente y haciéndose las correcciones pertinentes manifestamos nuestra aprobación para que el mencionado trabajo se imprima.

Atentamente

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alfonso Totosaus Sánchez  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María de Lourdes Pérez Chabela  
Co-directora

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Javier Mateo Oyagüe  
Asesor

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mi director de tesis **Dr. Alfonso Totosaus Sánchez** por el gran apoyo brindado durante la realización de esta tesis, por su amistad, comprensión, transmisión de conocimientos y dedicación para la conclusión de este trabajo.

A la **Dra. María de Lourdes Pérez Chabela** por su total apoyo en todo momento, su amistad y confianza brindada.

Al **Dr. Javier Mateo Oyagüe** por todo el apoyo incondicional brindado durante algunos años, pero sobre todo por su amistad.

A **mis compañeros profesores** por compartir sus conocimientos.

A **mis compañeros de maestría** por el apoyo brindado en determinado momento.

.A **mi familia** por estar siempre a mi lado.

A **mis amigos** donde quiera que estén.

*Para mi hermano Arturo.*

---

**ÍNDICE GENERAL**

0.	RESUMEN.....	ix
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	JUSTIFICACIÓN .....	3
3.	ANTECEDENTES .....	4
3.1	Estructura y composición del músculo .....	5
3.2	Valor nutritivo de la carne .....	8
3.2.1	Proteínas miofibrilares .....	9
3.2.2	Proteínas sarcoplásmicas .....	12
3.2.3	Tejido conectivo .....	12
3.3	Conversión de músculo a carne .....	14
3.4	Rigor.....	15
3.5	Ablandamiento postmortem .....	16
3.6	Maduración.....	18
3.6.1	Catepsinas .....	19
3.6.2	Calpainas .....	21
3.6.3	Relación calpainas/catepsinas.....	22
3.7	Degradación de proteínas miofibrilares.....	23
3.7.1	Enzimas exógenas.....	24
3.7.2	Enzimas bacterianas.....	25
3.8	Marinado.....	25
3.8.1	Fuerza iónica .....	27
3.9	Bacterias lácticas.....	27
3.9.1	Producción de metaboitos.....	28
3.9.2	Ácidos orgánicos.....	29
3.9.3	Aplicación de BAL en carne y productos cárnicos .....	29
3.10	Acidulantes .....	30
3.11	Parámetros de calidad de la carne.....	31
3.11.1	Capacidad de retención de humedad.....	31
3.11.2	pH.....	32
3.11.3	Textura .....	33
3.11.3.1	Fuerza de corte .....	

---

.....	34
4. OBJETIVOS .....	38
4.1 Objetivo general .....	38
4.2 Objetivos específicos .....	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
5.1 Diseño experimental.....	39
5.2 Primera parte: reducción de tiempo de marinado.....	39
5.3 Segunda parte: efecto del acidulante y bacterias lácticas.....	41
5.3.1 Inoculación de BAL o adición de GDL .....	41
5.3.1.1 Inoculación con BAL.....	42
5.3.1.2 Adición de GDL.....	42
5.3.2 Análisis de textura .....	43
5.3.3 Concentración de calcio .....	44
5.3.4 Capacidad de retención de agua .....	45
5.3.5 pH.....	46
5.3.6 Análisis microbiológicos .....	46
5.3.6.1 Población de coliformes totales.....	46
5.3.6.2 Población de BAL.....	46
5.3.7 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes .....	47
5.3.7.1 Obtención de las muestras .....	47
5.3.7.2 Electroforesis en gel (SDS PAGE).....	47
5.3.8 índice de fragmentación miofibrilar .....	48
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	50
6.1 Primera parte (ensayo preliminar) .....	50
6.1.1 Fuerza al Corte .....	50
6.1.2 Concentración de Calcio.....	52
6.2 Segunda parte (ensayo con BAL o GDL).....	55
6.2.1 Análisis fisicoquímicos .....	55
6.2.1.1 Análisis estadístico .....	55
6.2.1.2 pH.....	57
6.2.1.3 CRA .....	59
6.2.1.4 Fuerza al corte .....	60
6.2.2 Análisis Microbiológicos .....	

	64	
6.2.3	Degradación de proteínas miofibrilares.....	67
6.2.3.1	índice de fragmentación miofibrilar .....	67
6.2.3.2	Electroforesis (SDS PAGE).....	70
7.	CONCLUSIONES.....	74
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Proteínas miofibrilares del músculo esquelético de vertebrados.....	11
Tabla 2.	Cantidad de tejido conectivo y elastina en diferentes tejidos.....	13
Tabla 3.	Propiedades funcionales de las catepsinas in Vitro .....	20
Tabla 4.	Propiedades funcionales de las calpainas in Vitro .....	22
Tabla 5.	Clasificación de músculos de acuerdo a su blandura .....	35
Tabla 6.	Diseño de tratamientos para reducir tiempo de marinado.....	40
Tabla 8.	Significancia y coeficiente de correlación para las variables WB y Ca .....	50
Tabla 9.	Análisis de medias de Duncan para las variables WB y Ca .....	50
Tabla 10.	Significancia y coeficiente de correlación de las variables analizadas pH, CRA, y fuerza al corte en las muestras marinadas con BAL o GDL.....	55
Tabla 11.	Significancia para las variables tiempo de maduración, tratamiento y la interacción tiempo - tratamiento en las muestras marinadas.....	56
Tabla 12.	Análisis de medias de Duncan en las muestras maduras a diferente tiempo.....	56
Tabla 13.	Análisis de medias de Duncan en los diferentes tratamientos utilizados. ..	57
Tabla 14.	Significancia , coeficiente de correlación, tiempo, tratamiento e interacción entretiempo y tratamiento del IFM .....	68
Tabla 15.	Análisis de medias de Duncan del IFM durante el tiempo de almacenamiento y el tratamiento utilizado .....	68
Tabla 16.	Perfil electroforético de las muestras testigo, marinadas con BAL y GDL.	72

---

 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización del músculo esquelético.....	7
Figura 2. Microfotografía electrónica en el que se aprecian porciones de dos miofibrillas y un sarcómero, así como un diagrama correspondiente a un sarcómero en el que se muestran las distintas bandas, zonas y líneas .....	8
Figura 3. Masajeadora al vacío útil para el marinado de la carne .....	27
Figura 4. Analizador de textura y gráfico en la evaluación de textura de la carne .....	44
Figura 5. Fuerza al corte de los diferentes tratamientos medido con la navaja Warner-Bratzler en el ensayo preliminar .....	52
Figura 6. Concentración de calcio de las muestras tratadas a diferentes GPM .....	53
Figura 7. Valores de pH para las muestras testigo, marinadas con BAL ó GDL .....	58
Figura 8. Valores de CRA para las muestras testigo, marinadas con BAL o GDL.....	60
Figura 9. Valores de fuerza al corte en muestras crudas .....	61
Figura 10. Valores de Fuerza al corte en muestras cocidas.....	62
Figura 11. Presencia de BAL y coliformes totales en muestras testigo .....	65
Figura 12. Presencia de BAL y coliformes en muestras tratadas.....	66
Figura 13. Índice de fragmentación miofibrilar en muestras testigo, BAL y GDL almacenadas durante 1, 5, 10 ó 15 días.....	68
Figura 14. Electrofogramas de las muestras testigo (T), marinadas con bacterias ácido lácticas (L) y glucono-lactona (G) a los 1, 5, 10 y 15 días. La M es el marcador de pesos moleculares.....	73



## 0. RESUMEN

La blandura de la carne es uno de los atributos de calidad más importantes para el consumidor, y depende de un gran número de factores pre y post sacrificio. Para la industria cárnica, el marinado puede ser una de las formas más benéficas de conservar y proporcionar valor agregado a cortes de carne fresca muy duros, ya que es posible la utilización de cortes con bajo valor comercial, y poca aceptación. El objetivo de esta investigación fue determinar la posibilidad de reducir la dureza del músculo *Braquiocephalicus* de Bovino, marinado en una solución de cloruro de calcio 150 mM, para activar las calpainas mediante un sistema de masajeo al vacío. También se inocularon bacterias lácticas (*P. pentosaceus*) o bien se adicionó Glucono Delta Lactona para reducir el valor de pH y activar las catepsinas.

El estudio se diseñó en dos partes, en la **primera parte** se realizó un ensayo preliminar para determinar las condiciones óptimas de marinado mediante un sistema de masajeo al vacío, estableciendo cuatro niveles de masajeo (golpes por minuto, GPM): 1000, 2000, 3000 y 4000, el efecto de éstos, fue comparado con una muestra marinada por inmersión durante 48 h datos que ya se han reportado en la literatura. En la **segunda parte**, una vez establecidas las mejores condiciones de masajeo, la carne bien se inoculó con BAL (*Pediococcus pentosaceus*) o bien se añadió Glucono Delta Lactona (GDL). Los parámetros que se evaluaron fueron fisicoquímicos; concentración de calcio, pH, capacidad de retención de humedad (CRA), y textura. Microbiológicos; población de coliformes totales y bacterias lácticas. Y degradación de proteínas miofibrilares; índice de fragmentación miofibrilar (IFM), y SDS-PAGE. Los días de muestreo fueron 1, 5, 10, y 15. Todos los análisis se hicieron por duplicado.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando un diseño factorial completamente al azar, usando un análisis de varianza con los factores y la interacción entre ellos, las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. En el ensayo preliminar, - primera parte - los resultados indicaron que no hubo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en cuanto al número de revoluciones o GPM utilizados, pero si se encontró que las muestras tratadas con masajeo al vacío fueron más suaves (valores de fuerza menores) que las muestras marinadas 48h a 4° C. Esto implica un ahorro en los tiempos de proceso y una mejora considerable en las características mecánicas de cortes de bajo valor comercial.

En la segunda parte del experimento, se encontró que la acidez producida tanto por BAL o GDL, no disminuyó la dureza de la carne. El pH alcanzado en las muestras mediante la aplicación de GDL, mostró valores de fuerza mayores inclusive que en la muestra testigo. Por otra parte, se obtuvieron valores de fuerza menores mediante la inoculación con BAL, aunque estos no fueron estadísticamente significativos con respecto al testigo. La CRA fue menor en las muestras tratadas debido a la influencia del pH, al situar a las proteínas en su punto isoeléctrico donde éstas exhiben la mínima capacidad de retener su propia agua o el agua añadida. La fuerza al corte de las muestras marinadas con  $\text{CaCl}_2$  y BAL fueron más blandas que las tratadas con GDL al día 5, no variando con el paso de los días. El IFM también estuvo influenciado por el pH dado que hubo una menor fragmentación de las miofibrillas en las muestras tratadas, al exhibir valores de pH bajos con respecto al testigo. El análisis electroforético mostró un mayor número de bandas en la carne marinada con LAB al día 5, lo cual concuerda con los resultados antes descritos. La muestra con GDL mostró el menor número de bandas y se mantuvo constante hasta los 15 días. La marinación con  $\text{CaCl}_2$  puede ser una buena herramienta para producir carne blanda de cortes clasificados como duros.

## 1. INTRODUCCIÓN

De todas las características sensoriales que contribuyen a la calidad de la carne, la blandura es probablemente la más importante a la hora de su consumo, ya que la blandura de la carne es una parte fundamental en cuanto a la aceptabilidad ó rechazo por parte del consumidor. La dureza de la carne depende de un gran número de factores biológicos intrínsecos, tales como raza, edad, sexo, alimentación y tipo de músculo. Así como de factores de manejo de los animales antes de su sacrificio y de las condiciones *postmortem* de la carne y la canal (Thompson, 2002).

Uno de los problemas que se presentan en la obtención de este tipo de carne, es que las principales razas que se sacrifican en los rastros de México son de tipo cebuino, ganado que tiene características que hacen que produzca carne dura, algunas de estas características son la cantidad de tejido conectivo, grado de marmoleo, etcétera.

Una alternativa para conseguir un mayor ablandamiento de la carne y así incrementar la calidad sensorial, es la maduración de la misma, proceso natural donde las enzimas endógenas juegan un papel importante en la mejora de la textura. La maduración es un proceso que se lleva a cabo a temperatura arriba de congelación durante 1-2 semanas. En México, esta práctica no se lleva a cabo principalmente por los altos costos de almacenamiento de la carne y la energía requerida, además de que no hay un sistema de clasificación.

La maduración de la carne es atribuida a la acción de dos sistemas enzimáticos endógenos principales: las calpainas y las catepsinas (Jaarsveld y col., 1997), ambos tipos de enzimas son activadas después de la muerte del animal pero en vivo, su función es mínima y está dedicada al reciclaje de proteínas.

Las catepsinas son liberadas de los lisosomas debido al rompimiento de la membrana lipoproteínica, como consecuencia de valores bajos de pH alcanzados después del sacrificio del animal. De las dos calpainas encontradas en el citoplasma de la célula, solo la  $\gamma$ -calpaina es activada de forma natural (1-5  $\mu$ M CaCb) y la m-calpaina no es capaz de degradar proteínas al no disponer de un aporte de iones de calcio para su activación (80-120 mM). Dado que la mayoría del calcio del organismo está en los huesos y en los dientes, el contenido de éste en el músculo es mínimo, con valores aproximados al 0.1%, entre Ca, Mg, Fe, Co, Cu, Zn, Mn, Ni (Forrest y col., 1979).

Una de las alternativas tecnológicas de ablandamiento de la carne consiste en el marinado, además de permitir la conservación de la carne por más tiempo, se consiguen ciertos atributos de calidad importantes que permiten obtener un producto con mayor blandura, más jugosidad, sabor característico, y facilita su preparación.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se ha invertido mucho en investigación relativa al problema de falta de blandura de la carne (Morgan y col., 1991a; Kendall, 1993; Steen y col., 1997; Wheeler y col., 1997a; Pérez-Chabela y col., 1998; Aktas y Kaya, 2001; Berge y col., 2001; González y col., 2001). Sin duda se han conseguido avances en esta materia, no obstante, los resultados positivos se limitan a cierto tipo de músculos en particular y el problema de falta de blandura aún persiste en el mercado.

Dransfield (1997) reportó que en Inglaterra los consumidores prefieren pagar un precio más alto por productos de calidad, consecuentemente es esencial mejorar y desarrollar diferentes procesos *postmortem* para incrementar la blandura de la carne, particularmente en esos músculos que son tradicionalmente duros y que usualmente son castigados con precios bajos.

Para la industria cárnica, el marinado puede ser una de las formas más benéficas de conservar y proporcionar valor agregado a los cortes de carne fresca muy duros, ya que es posible la utilización de cortes con bajo valor comercial y poca aceptación por parte de los consumidores. Otro aspecto importante del marinado es el aumento de rendimiento de la materia prima, el cual, bien controlado, puede ofrecer beneficios al productor.

La marinación con calcio es un método para producir ablandamiento de la carne, sin embargo, requiere de largos periodos de proceso (48 horas) para obtener buenos resultados, debido a esto es importante encontrar un sistema que permita la reducción del tiempo de marinación.

### 3. ANTECEDENTES

La calidad de la carne viene definida por aspectos sensoriales, nutricionales, higiénicos y tecnológicos. La carne de bovino es considerada como una fuente alimenticia relativamente económica en comparación con otras especies, es un alimento completo debido a su alto valor biológico. Sus principales atributos de calidad sensorial son la apariencia, el aroma y la textura.

La textura se define como la composición y combinación de los elementos estructurales de la carne que da como resultado determinadas propiedades mecánicas y puede ser detectada sensorialmente (Tornberg, 1996).

La blandura se refiere a la fuerza de corte necesaria para trozar la carne, mientras que la textura implica la conformación del tejido conectivo. La blandura de la carne es la resultante de dos fuerzas, la relacionada con el tejido conectivo y la relacionada con el tejido miofibrilar. En términos prácticos se puede decir que la fuerza de las tres primeras mordidas se asocia con el tejido miofibrilar y lo que queda aún por destruir es debido al tejido conectivo (Velazco, 1996).

Se ha propuesto que el grado de entrecruzamiento del complejo actomiosina del sarcómero dentro de las miofibrillas, puede contribuir a la dureza de la carne *postmortem* (Smulders y col., 1990; Taylor y col., 1995).

Aún no es posible explicar de modo total los cambios que sufre la carne durante la maduración. No obstante, se han observado modificaciones en la estructura de las proteínas miofibrilares las cuales podrían ser responsables del aumento de la

blandura. Un conocimiento más profundo de los mecanismos que participan en estos procesos se debe al descubrimiento y aislamiento de enzimas proteolíticas que digieren algunas proteínas miofibrilares y producen muchos de los cambios observados durante el almacenamiento (Penny, 1984).

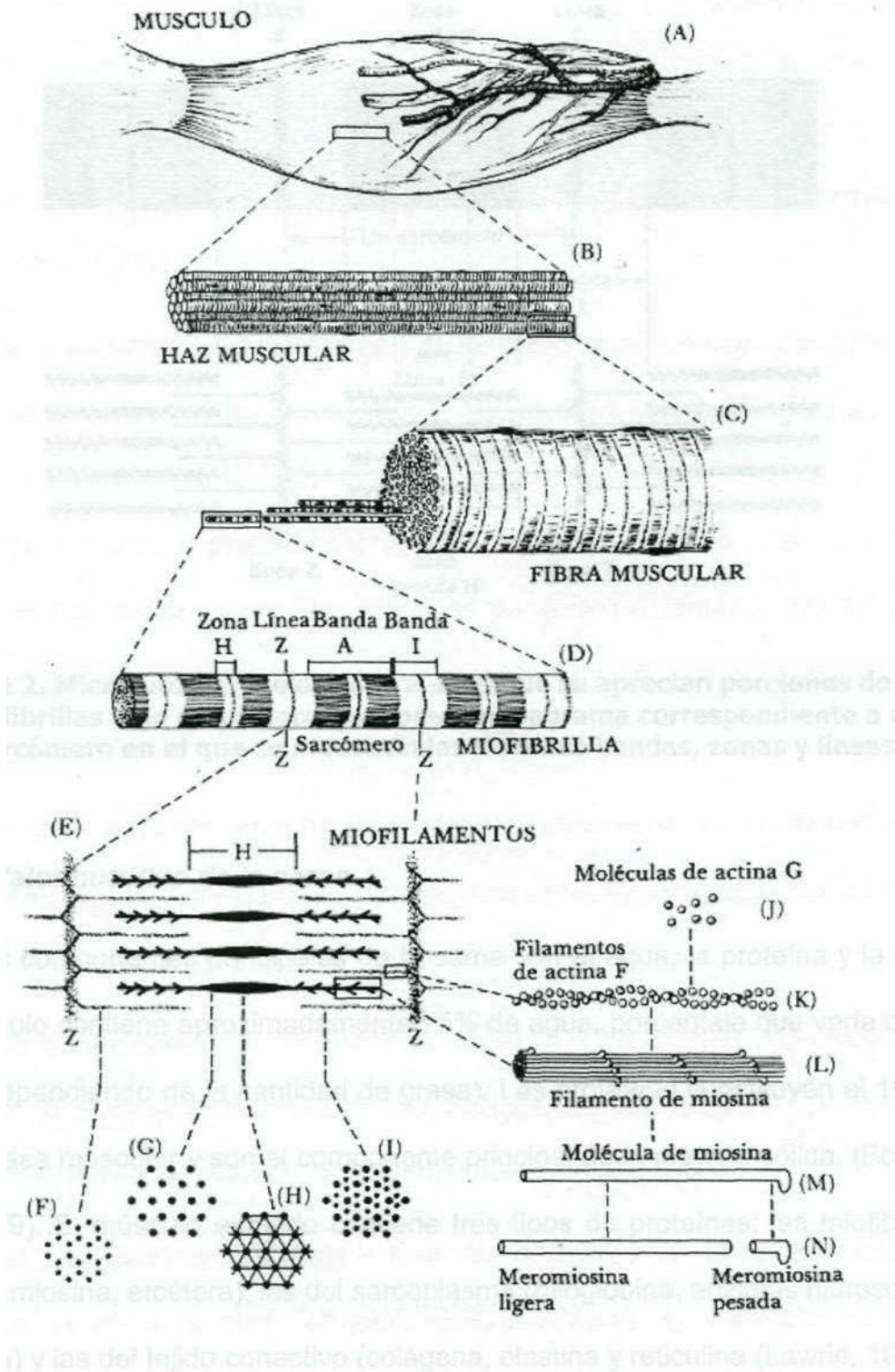
Se han estudiado varios métodos para lograr el ablandamiento de la carne: la adición de proteasas exógenas, (Fogle y col., 1982; Khouri y col., 1991), la infusión de iones de calcio (Koochmaraie y col., 1990; Wheeler y col., 1997a), la marinación, (Koochmaraie y col., 1990; Gault, 1991), la estimulación eléctrica en la canal después del sacrificio (Moribo y col., 1999; Morton y col., 1999), el acondicionamiento a altas temperaturas (Hildrum y col., 1999), y diversos métodos mecánicos como el molido, la inyección y el masajeo.

### **3.1 Estructura y composición del músculo.**

La unidad estructural del músculo esquelético es una célula muy especializada llamada fibra muscular, compuesta a la vez de miofibrillas, bastones largos y finos de aproximadamente uno a dos micrómetros de diámetro, su eje mayor es paralelo al de la fibra muscular, extendiéndose a todo lo largo de la fibra muscular (Forrest y col., 1979). Los cortes transversales de las miofibrillas presentan una serie de elementos estructurales de dos tipos distintos: los filamentos gruesos y delgados. Estos dan la apariencia de bandas claras y oscuras. La banda clara es monorefringente cuando se observa con luz polarizada, se describe como isotrópica y se llama banda I, contiene mayormente moléculas de actina. La amplia banda oscura presenta doble refringencia a la luz polarizada, es

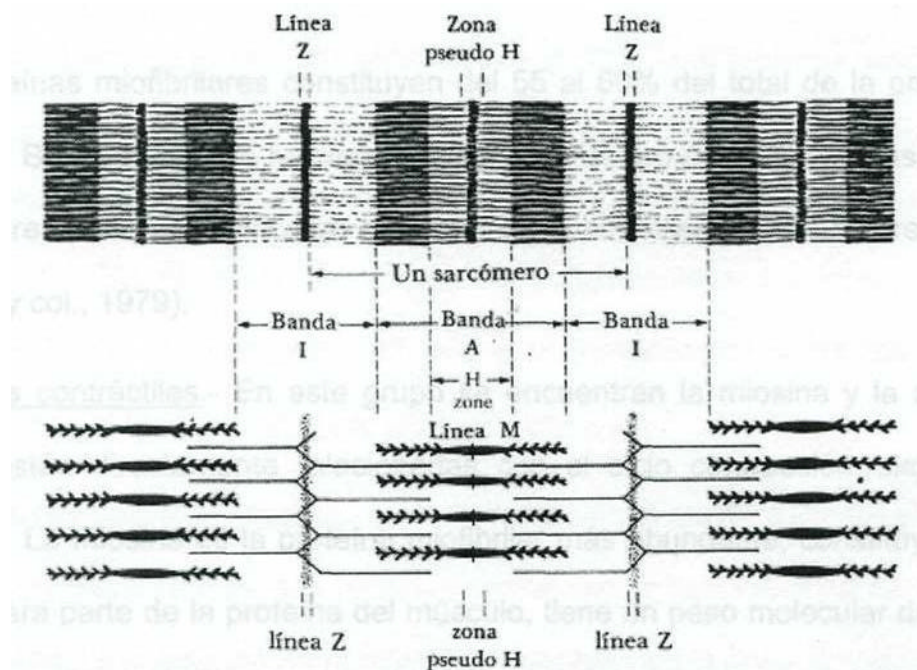
anisotrópica y se llama banda A, contiene moléculas de miosina (Murai y col., 1995). La banda I está dividida por una banda oscura estrecha llamada línea Z, que es una estructura densa tridimensional (Vigoreaux, 1994). La porción de miofibrilia comprendida entre dos líneas Z adyacentes se llama sarcómero, y comprende una banda A y dos medias bandas I que se localizan a cada lado de la banda A. El sarcómero es la unidad estructural repetitiva de la miofibrilia, así como la unidad básica en la que tiene lugar el ciclo de contracción-relajación muscular (Price y Schweigert, 1987). La longitud del sarcómero varía pero se puede admitir una longitud media de 2.5//m (Lawrie, 1985).

Las figuras 1 y 2 muestran un diagrama de la organización del músculo esquelético, desde estructura macroscópica a nivel molecular. (A) músculo esquelético, (B) un haz de las fibras musculares, (C) una fibra muscular en la que se aprecian las miofibrillas, (D) una miofibrilia que muestra el sarcómero y sus distintas bandas y líneas, (E) un sarcómero en la que se ve la posición de los miofilamentos de la miofibrilia, (F-I) secciones transversales que muestran la disposición de los miofilamentos en diversas partes del sarcómero, (J) moléculas de actina G, (K) un filamento de actina formado por dos cadenas de actina F enrolladas entre sí, (L) un filamento de miosina mostrando las relaciones de las cabezas con el filamento, (M) un filamento de miosina en el que se aprecian las regiones de cabeza y cola, y (N) meromiosina ligera (LNM) y meromiosina pesada (Forrestry col., 1979).



**Figura 1. Organización del músculo esquelético**





**Figura 2. Macrofotografía electrónica en el que se aprecian porciones de dos miofibrillas y un sarcómero, así como un diagrama correspondiente a un sarcómero en el que se muestran las distintas bandas, zonas y líneas.**

### 3.2 Valor nutritivo de la carne.

Los tres componentes principales de la carne son el agua, la proteína y la grasa. El músculo contiene aproximadamente 75% de agua, porcentaje que varía del 65-80% (dependiendo de la cantidad de grasa). Las proteínas constituyen el 16-22% de la masa muscular y son el componente principal de la materia sólida. (Forrest y col., 1979). El músculo estriado contiene tres tipos de proteínas: las miofibrilares (actina, miosina, etcétera), las del sarcoplasma (mioglobina, enzimas hidrosolubles etcétera) y las del tejido conectivo (colágena, elastina y reticulina (Lawrie, 1985).

### 3.2.1 Proteínas miofibrilares.

Las proteínas miofibrilares constituyen del 55 al 60% del total de la proteína del músculo. Basadas en sus funciones fisiológicas dentro del músculo, las proteínas miofibrilares pueden clasificarse en proteínas contráctiles y proteínas reguladoras (Forrester, 1979).

Proteínas contráctiles.- En este grupo se encuentran la miosina y la actina, las cuales están directamente relacionadas con el ciclo contracción-relajación del músculo. La miosina es la proteína miofibrilar más abundante, constituye más de una tercera parte de la proteína del músculo, tiene un peso molecular de 500 kDa y contiene dos cadenas pesadas idénticas de aproximadamente 220 kDa cada una y dos cadenas ligeras de aproximadamente 14 a 20 kDa dependiendo de la especie y tipo de músculo (Lawrie, 1985).

La actina es la segunda proteína miofibrilar más abundante comprendiendo un 20 % del total, su peso molecular es aproximadamente 42 kDa tiene una estructura globular con menos de un 30% de  $\alpha$  hélice (Price y Schweigert, 1987).

Proteínas reguladoras.- Estas proteínas juegan un papel muy importante en el ciclo de la contracción-relajación. Se dividen en dos grupos: las proteínas reguladoras mayores y las reguladoras menores (Lawrie, 1985).

Proteínas reguladoras mayores.- Son la tropomiosina y la troponina. La tropomiosina es la segunda proteína más abundante del filamento delgado y constituye aproximadamente el 7% de la proteína total de la miofibrilla, tiene un

peso molecular aproximado de 68 kDa. La troponina es una proteína globular con un contenido alto de prolina, constituye del 8 al 10% de la proteína miofibrilar. Los tres componentes de la troponina son: troponina I (PM 22 kDa) la cuál por sí misma inhibe la actomiosina ATP-asa en presencia o ausencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ; la troponina C (PM 18 kDa) que se fija reversiblemente a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y la troponina T (PM 37 kDa), que se une a la tropomiosina y fija los otros dos componentes al filamento delgado (Penny, 1984).

Proteínas reguladoras menores.- Cuantitativamente la mayor parte de ellas no son importantes, pero se cree que tienen conexión con la estructura de los filamentos miofibrilares. La  $\alpha$  actinina es el mayor componente de la línea Z y está estimado que esta proteína constituye menos del 20% del total de la proteína de la línea Z en el músculo esquelético. Una de las posibles funciones de la  $\alpha$ -actinina puede ser regular el ancho de los filamentos al igual que la titina y la nebulina (Vigoreaux, 1994). La Tabla 1 muestra las diferentes proteínas miofibrilares contenidas en el músculo, su peso molecular, contenido y su localización. (Maruyama y col., 1977).

**Tabla 1. Proteínas miofibrilares del músculo esquelético de vertebrados.**

<b>Proteínas</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Contenido %</b>	<b>Localización</b>
<u>Contráctiles</u>			
Miosina	500 kDa	43	Banda A
Actina	43 kDa	22	Banda I
<u>Reguladoras Mayores</u>			
Troponina	70 kDa	5	Banda I
Tropomiosina	(33 kDa) x 2	5	Banda I
<u>Reguladoras Menores</u>			
Proteína M	165 kDa	2	Banda A
Proteína C	135 kDa	2	Banda A
Proteína H	69 kDa	<1	Banda A
Proteína F	121 kDa	<1	Banda A
Proteína 1	50 kDa	<1	Banda A
Proteína X	152 kDa	<1	Banda A
/? actinina	35 kDa + 32 kDa	<1	Fin de la banda
y actinina	35 kDa	<1	Banda I (?)
<u>Filamentos Intermedios</u>			
Desmina	53 kDa	1	Periferia de
Vimentina	55 kDa	1	miofibrillas
			entre discos Z
Conectina	2x10 <sup>6</sup> kDa	10	Unión A-I
<u>Discos Z</u>			
a actinina	(95 kDa) x 2	2	Discos Z
Proteína Z	50 kDa	<1	Discos Z
Eu-actinina	43 kDa	<1	Discos Z
Proteína 34 K	34 kDa	<1	Discos Z
ABP (filamina)	(250 kDa) x 2	<1	Discos Z
<u>Otras proteínas</u>			
Vinculina	130 kDa	<1	Sarcolema
Nebulina	800 kDa	3	Banda I

### **3.2.2 Proteínas sarcoplásmicas.**

Las proteínas sarcoplásmicas son endocelulares e hidrosolubles. Constituyen la masa fluida que baña a las miofibrillas, proporcionándoles energía y capacidad de sintetizar proteína, y haciendo posible la eliminación de ciertos desechos metabólicos. Se encuentran en el fluido que se desprende de la carne (sarcoplasma) durante el proceso de descongelación (Olson y col., 1976).

Tiene pocas propiedades funcionales, pero son importantes por su actividad enzimática, de transporte y almacenamiento de oxígeno; desde el punto de vista de calidad de carne como alimento, la más importante es la mioglobina ya que está relacionada con el color de la misma.

### **3.2.3 Tejido conectivo.**

Las proteínas del tejido conectivo son: colágena, elastina y reticulina. A pesar de que las proteínas del tejido conectivo juegan un papel importante en la dureza de la carne son pocas las observaciones indicadoras de que se alteran durante la maduración. El tejido conectivo tiene tres funciones principales: proporcionar fuerza mecánica a los órganos, mejorar la estructura del movimiento y promover el crecimiento y proliferación celular, sus propiedades físicas están determinadas principalmente por su composición y organización macromolecular. La principal propiedad funcional de esta macromolécula es que es capaz de formar fibras, filamentos y redes con propiedades mecánicas indispensables en la estructura

organizacional de un organismo (Bailey y Light, 1989). La Tabla 2 muestra la cantidad de tejido conectivo en diferentes tejidos.

**Tabla 2. Cantidad de tejido conectivo y elastina en diferentes tejidos.**

Tejido	Colágeno (%)	Elastina (%)
Tendón	95	1
Piel	50	5
Sistema vascular	40	50
Hueso	25	-
Pulmón	15	20
Riñón	4	-
Hígado	2	-
Músculo	2	0.1

Se ha comprobado que la unidad fundamental del colágeno, el tropocolágeno, está formado por tres cadenas polipeptídicas en hélice, unidas por enlaces muy fuertes que aumentan con la edad del animal, de ahí que sea una proteína difícil de atacar por enzimas digestivas. Al calentarse se transforma en gelatina de bajo valor biológico. El colágeno contiene un 30% de glicina y un 25% de prolina e hidroxiprolina. Cuando más abundan estos aminoácidos, más rígido y resistente es el colágeno. La edad no influye en el contenido pero sí en la calidad debido a que aumenta el número de enlaces. El colágeno es la proteína más abundante de los mamíferos. Solo en los músculos forma el epimisio, endomisio y perimisio (Carballo y López de Torre, 1991).

Es necesario hacer una marcada distinción entre los músculos de soporte y los de locomoción, aquellos músculos que se utilizan para mover el peso de la canal, no solo estarán más ejercitados, sino que son el punto de convergencia de todas las capas de tejido conectivo (epimisio y endomisio). Mientras más distante esté el pedazo de carne de la canal, mayor será su dureza, los músculos que están cerca de la espina dorsal poseen funciones de soporte y por tanto son más suaves (Velazco, 1999). Se sabe además que la dureza de corte es siempre mayor cuando éste se hace transversalmente al eje de las fibras. Por tanto, las oportunidades de encontrar cortes duros son mayores en el cuarto delantero.

### **3.3 Conversión de músculo a carne.**

En el músculo vivo, los componentes activos de la estructura del cuerpo están bajo estricto control del sistema nervioso central y bien abastecidos con nutrientes y oxígeno por la sangre, después del sacrificio quedan como estructuras aisladas sin control y sin el abastecimiento de nutrientes y oxígeno (Bailey y Light, 1989).

Al momento sacrificar un animal, sus músculos aún contienen altos niveles de ATP, creatín fosfato (CF) y su pH es de 6,7 a 7,2. El músculo en estado de pre-rigor es extensible y se puede estirar de modo reversible hasta el 130-140 % de su longitud en reposo. En el músculo vivo el ATP está siendo constantemente resintetizado para mantener el metabolismo en reposo, pero cuando se yugula el suministro de sangre portadora de oxígeno, el músculo entra en anaerobiosis y no puede entonces mantener el nivel de ATP mediante fosforilación oxidativa. Al principio, el nivel de ATP muscular se mantiene por conversión de ADP en ATP a

expensas del CF, y cuando este último se agota, la concentración de ATP desciende. La pérdida de ATP también desencadena la conversión anaeróbica de glucógeno en lactato con el consiguiente descenso del pH de 7,2 a 5,5 pasadas 24 horas. Cuando los niveles de ATP descienden a valores inferiores a 0,1//mol/g, los filamentos de miosina de la miofibrilla forman enlace con los filamentos de actina que los solapan, el músculo pierde su extensibilidad y entra en fase de rigor (Penny, 1984).

### **3.4 Rigor.**

El músculo privado de ATP entra en un estado de contracción excesivo e incontrolado llamado *rigor mortis* (rigidez cadavérica). El músculo no permanece en este estado de rigidez, pero queda flácido debido a una serie de procesos enzimáticos degradativos sobre la integridad de la estructura. Este rompimiento y resolución del rigor es realizado por proteasas citoplasmáticas (neutro) y lisosomales (ácido). La caída del pH reduce importancia a las proteasas neutras y la de las proteasas acidas aumenta. Estas enzimas llamadas catepsinas son liberadas de los lisosomas y contribuyen al rompimiento parcial en la integridad de la estructura del complejo actomiosina, este proceso puede tener un efecto considerable sobre la capacidad de estiramiento de las fibras musculares y contribuir al menos en parte a la resolución del rigor. Las catepsinas también dañan el tejido conectivo alrededor de la célula muscular, pero se desconoce si pudiese afectar a la dureza generada por la actomiosina. El producto obtenido



después de la resolución del rigor es la carne, y el periodo de almacenamiento proporciona mayor blandura a la carne (Bailey y Light, 1989).

### **3.5 Ablandamiento *postmortem*.**

El almacenamiento de la carne a temperaturas por arriba de la congelación (0-5°C) por periodos de días cortos a varias semanas ha sido ampliamente usado para mejorar la palatabilidad de la carne. Sin embargo, este largo tiempo de almacenamiento de la carne, incrementa la merma de la canal y requiere de excesivo acondicionamiento antes de su preparación (Price y Schweigert, 1987).

Cuando se cuece un músculo en estado de pre-rigor ordinariamente es blando, pero su dureza aumenta a medida que el músculo entra en rigor y alcanza un máximo a las 24 horas *postmortem*. A medida que transcurre el estado *postmortem* la dureza disminuye. Esta reducción es rápida durante los primeros días de conservación y a continuación su velocidad desciende. Después de 10 días de almacenamiento a 1°C se alcanza aproximadamente un 80 % de la reducción total de la dureza inicial (Dransfield, 1994).

Este comportamiento puede verse alterado cuando las canales de vacuno se enfrían muy aprisa. Inmediatamente después del sacrificio se puede alcanzar en la musculatura superficial una temperatura de 15°C o menor, cuando todavía el músculo contiene un 25% del total de ATP. En estas circunstancias, el músculo se contrae y los sarcomeros experimentan un encogimiento de hasta un 40 % de su longitud en reposo. Este fenómeno, denominado acortamiento por frío, se acompaña de un endurecimiento considerable de la carne (Penny, 1984).

La blandura de la carne ocurre en dos pasos, una fase rápida y después una lenta, el rápido incremento en la blandura es debido principalmente al debilitamiento de las miofibrillas y el proceso lento sobre todo es causado por el debilitamiento del endomisio y perimisio (Takahashi, 1996).

Se han estudiado algunos métodos de ablandamiento de la carne: la estimulación eléctrica en la canal después del sacrificio (Moribo y col., 1999; Morton y col., 1999), el acondicionamiento a altas temperaturas (Hildrum y col., 1999), la suspensión pélvica de la canal (Thompson, 2002), y diversos métodos mecánicos como el molido, la inyección y el masajeo.

La primera prueba positiva de que la estructura miofibrilar se altera durante la maduración se realizó al observar que las miofibrillas obtenidas homogeneizando músculo madurado eran más cortas y tenían menos sarcomeros íntegros que las obtenidas a partir de músculo sin madurar. Cuando se observaron al microscopio estos fragmentos miofibrilares cortos, los discos Z se observaban pálidos (Penny, 1984).

Los músculos al entrar en estado de rigor no se pueden estirar debido a la unión de la actina con la miosina. Sin embargo, después de mantenerlos durante unos días a 0 - 4°C, los músculos pueden de nuevo estirarse a aproximadamente la misma longitud que tenían cuando estaban en pre-rigor, pero ahora el estiramiento ya no es reversible como lo era en el estado de pre-rigor. El examen mediante microscopio electrónico revela que el estiramiento del músculo separa los filamentos I de sus uniones con los discos Z, produciéndose grandes huecos.

Como consecuencia del debilitamiento de los discos Z, la carne madurada rinde al homogeneizarla una cantidad mayor de fragmentos más pequeños que la carne sin madurar.

El grado de fragmentación ha sido utilizado por diversos investigadores para medir la magnitud de la maduración, se ha observado que el número de las miofibrillas aumenta de 1-4 sarcómeros con el periodo de maduración. Sin embargo, otros investigadores utilizaron el cambio de turbidez a 540 nm para medir el grado de fragmentación, observando que la turbidez aumenta durante la maduración. El cambio del grado de fragmentación, si bien es una medida de la modificación estructural de las miofibrillas, se corresponde significativamente con el aumento de la blandura de la carne cocinada después de la maduración. Así pues el grado de debilitamiento de discos Z es un factor importante en la reducción de la dureza durante el periodo de maduración (Penny, 1984).

### **3.6 Maduración.**

El proceso que consiste en mantener a la carne fresca a una temperatura superior al punto de congelación se denomina maduración y durante éste, la carne se hace más blanda y aromática (Lawrie, 1985). La maduración *postmortem* es uno de los mejores métodos para producir carne blanda. La proteólisis del músculo parece ser uno de los factores que más contribuyen al proceso de ablandamiento durante la maduración (Koochmaraie, 1992).

Es un hecho demostrado que las proteasas del músculo son fundamentales en el desarrollo de la blandura y la calidad de la carne durante la maduración, algunos

estudios muestran que estas enzimas en forma individual, contribuyen al rompimiento de las miofibrillas y la estructura del tejido conectivo (Toldrá y Etherington, 1988). Existen 2 tipos de proteasas endógenas: las enzimas lisosomales, llamadas catepsinas y las enzimas neutras dependientes del calcio llamadas calpainas. Existen controversias sobre la acción precisa de estos dos sistemas proteolíticos, ya que algunos autores han propuesto que la maduración se atribuye al sistema dependiente del calcio, mientras que otros autores lo atribuyen al sistema lisosomal. A la vez otros han sugerido la acción cooperativa de estos dos sistemas proteolíticos.

### **3.6.1 Catepsinas.**

Zeece y col. (1992) reportaron que existen en todas las células organelos celulares denominados lisosomas que contienen enzimas con gran actividad proteolítica, entre ellas se encuentran las catepsinas, reconocidas por su participación en el ablandamiento *postmortem*. Los lisosomas tienen membranas lipoproteicas intactas a los niveles *in vivo* de pH pero que se rompen al descender el pH *postmortem* o cuando el tejido sufre una lesión grave, liberando enzimas proteolíticas (Lawrie, 1985).

Las enzimas de los lisosomas intervienen en la degradación de proteínas, polisacáridos y lípidos, además de otros compuestos ya que los lisosomas están relacionados con la digestión intracelular. Cuando los lisosomas se rompen se destruye la célula, debido a que las enzimas contenidas son capaces de degradar los componentes principales de esta (Novikoff y Hotlzman, 1978).

Estudios histoquímicos han reportado la localización de las catepsinas, y explicado su participación en el ablandamiento de la carne. Se ha encontrado que al cuarto día de maduración, las catepsinas están más difundidas en la fibra muscular, lo que permite deducir que una vez degradada la membrana de los lisosomas durante el descenso de pH *postmortem* la acción de las enzimas se incrementa con el tiempo de almacenamiento (Chambers y col., 1994). Se ha reportado que a temperaturas de almacenamiento a 37°C, aumenta el rompimiento de las membranas lisosomales (Sancho y col., 1997), causando una degradación extensiva de las proteínas miofibrilares. Las catepsinas tienen un pH óptimo ácido (Lawrie, 1985). De las 8 enzimas reportadas como existentes en los lisosomas de la célula del músculo, cuatro han sido las mejor caracterizadas (Koochmaraie y col., 1990). En la Tabla 3 se muestran algunas de estas proteasas, su forma de actuación (exo, atacando un extremo definido de la proteína sustrato; ó endo, atacando al azar cualquier enlace de la proteína), sus pesos moleculares, pH óptimos, puntos isoeléctricos y sustratos específicos.

**Tabla 3. Propiedades funcionales de las catepsinas in Vitro.**

(Carballo y López de Torre, 1991)

Catepsinas	Acción	PM kDa	PI	PH	Sustrato*
B	Exo Endo	25	5-5.2	4.6	A, M, C
D	Endo	42	5.5-6.5	3-5	A, M, TT, TI, IZ
H	Exo Endo	28	7.1	5.5-6.5	A y M
L	Endo	24	5.8-6.1	4-6.5	A, M, TT, TI, C

\* A: actina, M: miosina, TT: troponina, TI: troponina I, LZ: línea Z, C: colágeno

### 3.6.2 Calpainas.

El primer reporte documentado de la existencia de calpainas fue el realizado por Guroff (1964) quién demostró la existencia de proteasas dependientes del calcio en estudios realizados en cerebro de rata. El sistema proteolítico de las calpainas ha sido nombrado como factor activado por calcio (FAC), proteasas neutras activadas por calcio (PNAC), y proteasas dependientes del calcio (PDC).

Las calpainas son proteasas con dos sub-unidades (80 y 30 kDa) (Koochmaraie, 1992). El sistema proteolítico de las calpainas consta de dos tipos: de acuerdo a la concentración de calcio que requieren para activarse, la  $\mu$ -calpaina (1-5  $\mu$ M) y la m-calpaina (80-120 mM) también han sido llamadas calpaina I y II (Koochmaraie y col., 1988). La activación de calpainas se puede lograr mediante dos vías: inyección con una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M ó mediante el marinado por inmersión en una solución de CaCl<sub>2</sub> a 150 mM durante 48 h. a 4° C. (Uytterhaegen y col., 1994). El efecto principal de este grupo enzimático se da a los 7 días *postmortem* (85% del efecto), el resto de la suavidad alcanzable se da entre los 7 y los 14 días (Velasco, 1996). Una de las características más importantes de las calpainas es que el calcio las activa pero en presencia excesiva de calcio se autolizan.

En las primeras investigaciones sobre la activación de calpainas, se utilizaron 300 mM de CaCl<sub>2</sub> inyectado al 10% y se demostró una gran mejora en la blandura de la carne, pero a esta concentración, lo acompañaron sabores metálicos y amargos (Morgan y col., 1991b). Sin embargo cuando se utilizaron tratamientos de CaCl<sub>2</sub>

con niveles más bajos (200 mM), los sabores amargos y metálicos no fueron detectados sensorialmente (Wheeler y col., 1993).

Las condiciones óptimas para la activación de las calpainas es a 25° C y pH 7.5, sin embargo el requerimiento mínimo de calcio para la activación de calpainas parece ser independiente de la temperatura (Cottin y col., 1991). Se observa en la Tabla 4 las propiedades funcionales de la calpainas, su peso molecular, pH y sustrato donde éstas actúan.

**Tabla 4. Propiedades funcionales de las calpainas in Vitro.**

(Carballo y López de Torre, 1991)

Calpainas	Acción	PM kDa	pH	Sustrato*
I y II	Endo	80 y 30 (dos subunidades)	6.5 – 8	D, TT, TI, T, C.

\* D: desmina, TT: troponina T, TI: troponina I, T: tropomiosina, C: conectina

### 3.6.3 Relación calpainas/catepsinas.

Las Catepsinas lisosomales tienen un efecto conjunto con las calpainas del músculo durante el proceso de maduración, ambas ayudan al rompimiento de la miofibrilla por medio de la proteólisis de las proteínas miofibrilares, dando como resultado el ablandamiento de la fibra muscular (Masayuki y col., 1987), pero se ha sugerido que las catepsinas son más importantes que las calpainas en el rompimiento de la miofibrilla después del *rigor mortis* (Etherington y col., 1987).

### **3.7 Degradación de proteínas miofibrilares.**

Dos de los métodos utilizados para hallar las diferencias que se producen durante la maduración son los cambios de la extractibilidad de las proteínas miofibrilares en soluciones salinas y la actividad ATP-asa de las miofibrillas, sin embargo ha sido la introducción de la electroforesis en gel de poliacrilamida -dodecil sulfato de sodio- (SDS-PAGE), el método que proporcionó a los investigadores los cambios sufridos por las proteínas de las miofibrillas y de los extractos miofibrilares (Penny, 1984). Estudios sobre degradación de proteínas han demostrado que las calpaínas actúan sobre la troponina T, troponina I, tropomiosina,  $\alpha$ -actinina, titina y nebulina (Zeece y col., 1992), pero no hay un efecto de calpaínas sobre miosina y actina (Whipple y Koohmaraie, 1991; Greasery Fritz, 1995).

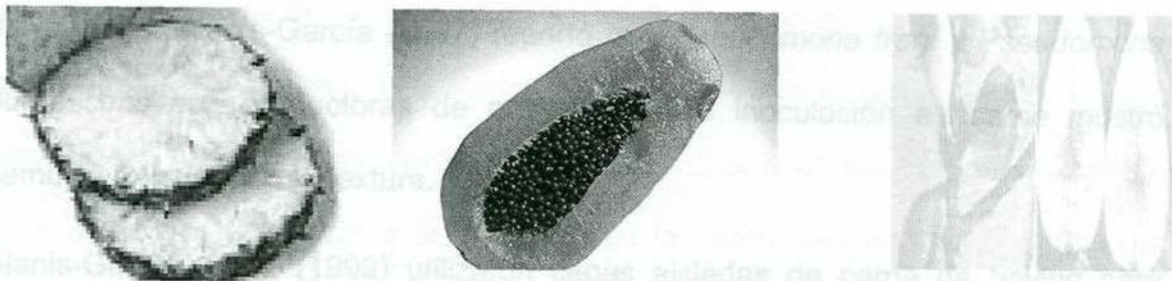
SDS-PAGE de las miofibrillas preparadas a partir de carne madurada muestra que desaparece la troponina T y que se forma cierto número de polipéptidos de peso molecular más bajo.

Olson y col. (1976) pusieron de manifiesto que la aparición en los geles de miofibrillas del componente 30 kDa se acompaña por la reducción de la dureza y aumento del índice de fragmentación miofibrilar durante la maduración de la carne de vacuno. Además se ha demostrado que la disminución de la dureza durante la maduración estaba relacionada cuantitativamente con la pérdida de troponina T.



### 3.7.1 Enzimas exógenas.

La práctica de ablandamiento de la carne por medio de enzimas de origen vegetal, se ha realizado desde hace siglos, y es aún una práctica muy común en la cultura mexicana. Dentro de estas enzimas se cuenta con la ficina, encontrada en las hojas de la planta de higo; la bromelina, encontrada en la corteza de la cascara de la pina; y la papaína en el fruto y el árbol de la papaya.



Este tipo de proteasas tienen dos desventajas al ser agregadas como ablandadores durante la cocción: Son inestables a temperaturas de 70°C y producen un sabor desagradable en la carne debido a la degradación de la miosina (Furia, 1983).

Se ha observado que la inyección de enzimas vegetales da como resultado una degradación extensiva de las fibras musculares, no así del tejido conectivo (Chambers y Bowers, 1981), lo que implica que en músculos con alto contenido de éste tipo de tejido (extremadamente duros), estas enzimas no tienen actividad proteolítica importante.

### **3.7.2 Enzimas bacterianas.**

La carne es considerada como un excelente medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos debido a su elevado contenido de humedad y gran diversidad de nutrientes. Se ha observado que en la refrigeración, que es el método de conservación más utilizado, favorece un ambiente selectivo, en el que preferentemente crecen microorganismos psicrófilos y algunas bacterias de descomposición cuya actividad es determinante sobre las proteínas miofibrilares de la carne. Alanis-García (1997) reportó que *Pseudomona fragi* y *Pseudomona fluorescens* son productoras de proteasas y su inoculación en carne mostró cambios en cuanto a la textura.

Alanis-García y col. (1999) utilizaron cepas aisladas de carne de bovino para evaluar su efecto sobre las proteínas miofibrilares, encontrando que existía mayor actividad proteolítica sobre proteínas de bajo peso molecular. Otros estudios han reportado la producción de elastasa por *Pseudomonas*, dicha cepa también sintetiza una colagenasa extracelular con poder de hidrolizar residuos de hidroxiprolina (Ockerman y col., 1969).

### **3.8 Marinado.**

El marinado es una técnica culinaria tradicional usada para ablandar y mejorar el sabor de la carne (Gault, 1991), la finalidad del marinado es obtener mejores y diferentes sabores, incrementando la blandura de músculos duros y prolongar la vida útil del producto por medio de la sal.

Existen tres métodos básicos para marinar la carne: inmersión, inyección, y el masajeo con vacío. El primero es el más tradicional y el menos efectivo. Se presume que la carne (dependiendo del pH) puede absorber entre 8 y 15 % por inmersión, mas esto implica un largo periodo de tiempo, lo que se traduce en altos costos de inventario y en un mayor riesgo microbiológico. La inyección consiste en penetrar el producto con agujas y depositar la solución dentro de este. La utilización de vacío durante el masajeo, es el mejor método para conseguir la textura y el rendimiento deseado. En este sistema, el sólido (la carne) y el líquido se comportan de manera muy similar, es decir, al vacío el sólido no lo es tanto, permitiendo la impregnación profunda del líquido. Los métodos mecánicos, son los más efectivos para mejorar la suavidad de la carne, puesto que destruyen la estructura del producto, ambos componentes son afectados: el tejido conectivo y el tejido miofibrilar, dentro de esta categoría se encuentran la molienda, el golpeo y la penetración con agujas o navajas (Velazco, 1996).

El mezclado, tombléo y masajeo de la carne a bajas temperaturas facilita el ablandamiento a través de la desintegración de las fibras musculares y el alargamiento de las miofibrillas (Brandt, 2001). Una máquina empleada en el masajeo al vacío de la carne durante el proceso de marinado se muestra en la Figura 3.



**Figura 3. Masajeadora al vacío útil para el marinado de la carne.**

### **3.8.1 Fuerza iónica.**

La fuerza iónica es un factor clave en la retención del marinado, depende de la concentración molar de varios iones en solución y sus cargas, tiene impacto en la disociación de moléculas. La solubilidad proteica está en función de la cantidad de iones en solución, cuando el pH de un marinado ha bajado mucho, sufre un cambio en la textura de la carne. Los marinados que son altamente ácidos, (pH debajo de 5.0) pueden causar una desnaturalización de la carne volviéndola más blanda (Brandt, 2001).

### **3.9 Bacterias lácticas.**

Las bacterias acidolácticas (BAL) son consideradas generalmente organismos "de grado alimentario" y muestran un comportamiento dentro de los sistemas alimentarios que les permite ser seleccionadas como cultivos protectores. Las estrategias de manufactura para incrementar la seguridad en la higiene en carne y productos cárnicos consisten en desarrollar nuevas tecnologías para reducir el

número de microorganismos patógenos ó nocivos en estos productos. En este sentido, las bacterias lácticas que son una microflora natural de los productos cárnicos pueden contribuir a la extensión de su vida de anaquel, debido a que tienen capacidad para inhibir otros microorganismos patógenos y de descomposición mediante la competencia de los nutrientes, por desplazamiento del nicho ecológico o por la producción de sustancias antimicrobianas como los ácidos láctico, acético, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Requena y Peláez, 1995).

Las bacterias lácticas se identifican como cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, tolerantes a los ácidos. Orla-Jensen en 1919 propuso que las bacterias lácticas verdaderas eran organismos Gram positivos, inmóviles no formadores de esporas, en forma de cocos o bastones, los cuales fermentaban carbohidratos y alcoholes superiores para formar ácido láctico principalmente (Stiles y Holzapfel, 1997). Las bacterias lácticas crecen en la mayoría de los alimentos, de las bacterias lácticas encontradas en los alimentos, solo unas pocas especies (*Streptococcus*) son patógenas (Lucke, 1996).

### **3.9.1 Producción de metabolitos.**

Además de la formación de ácidos orgánicos, las bacterias lácticas producen sustancias antimicrobianas como los metabolitos del oxígeno (peróxido de hidrógeno) y también algunos productos finales del catabolismo celular (diacetilo, alcoholes, dióxido de carbono, etcétera). Por otro lado, se ha descrito que algunas especies de bacterias lácticas son capaces de sintetizar y secretar al medio

sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica conocidas como bacteriocinas (Requena y Peláez, 1995).

### **3.9.2 Ácidos orgánicos.**

Las bacterias lácticas fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante este proceso se obtienen ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético). Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos deteriorantes (Requena y Peláez, 1995). El ácido láctico es el producto característico de la fermentación de las bacterias lácticas es considerado como seguro y su acción antagonista va principalmente contra bacterias deteriorantes (*Pseudomonas* y enterobacterias) y microorganismos patógenos como *Salmonella sp*, *Streptococcus aureus*, y *Clostridium botulinum*.

### **3.9.3 Aplicación de BAL en carne y productos cárnicos.**

En contraste con la leche, la carne contiene grandes cantidades de aminoácidos libres, pero solo unos pocos carbohidratos fermentables. Después de la glucólisis *postmortem*, la concentración de éstos difícilmente excede 0.3% y puede ser aún más bajo en tejidos con un contenido inicial bajo de glucógeno o ricos en grasa y colágeno. Esto es por lo cual las bacterias lácticas compiten pobremente en carne cruda fresca al tiempo que el oxígeno molecular está disponible para la degradación aeróbica de carbohidratos y aminoácidos (Lucke, 1996).

Las bacterias lácticas forman parte de la microflora endógena de la carne y han jugado un papel importante en numerosos procesos fermentativos durante milenios y no existe ninguna indicación de que representen riesgos para la salud. Pueden tener un efecto positivo en la salud del consumidor, ya que algunas de ellas han estado relacionadas con acciones anticancerígenas y con la regulación de las funciones del tracto intestinal. En carne fresca estas bacterias desarrollan una fermentación moderada que no afecta las cualidades organolépticas del producto. Aunque algunas bacterias lácticas pueden producir efectos indeseables en la carne (producción de sulfhídrico, problemas de enverdecimiento y limo) en general las condiciones que favorecen su crecimiento contribuyen a incrementar la vida útil de la carne.

### **3.10 Acidulantes.**

En la industria de la carne el uso de aditivos es ampliamente usado en una gran variedad de productos. La Glucono Delta Lactona (GDL) es un agente acidulante muy importante ya que permite disminuir rápidamente el nivel de pH en productos cárnicos (Totosaus y col., 2000b). Como un acidificante natural, contribuye al sabor de diferentes alimentos, también ayuda a preservarlos del deterioro por enzimas y microorganismos. La GDL es un aditivo reconocido generalmente como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés), funciona como un agente de curado, controla el pH, y es secuestrante de iones.

Históricamente los productos cárnicos han sido conservados usando la fermentación, el curado y el ahumado. Actualmente la GDL es usada para realzar

las técnicas de conservación de la carne por reducción del nivel de nitritos requeridos, acelerando el proceso de curación y produciendo una mayor estabilidad del producto. El uso de GDL en productos cárnicos ha prosperado en Europa donde se ha considerado como un valioso aditivo en las técnicas de proceso. Recientemente la tendencia en procesos cárnicos usando sistemas HACCP, incluyen el estricto control del pH entre los parámetros críticos de control para obtener productos seguros (Totosaus y col., 2000b).

### **3.11 Parámetros de calidad de la carne.**

Es costumbre clasificar al animal productor de carne, no-solo por su peso sino también por la apariencia y la calidad de la carne producida. Estos parámetros indican algunas propiedades por las que el consumidor acepta determinado tipo de carne. De las principales características sensoriales, perceptibles por nuestros sentidos está la jugosidad, y la textura.

#### **3.11.1 Capacidad de retención de humedad.**

La CRA se define como la capacidad de la carne ó sistema cárnico de retener toda, o parte de su propia agua o agua añadida durante la aplicación de fuerzas externas (Honikel y Ham, 1994).

La carne contiene alrededor de 75% de su peso total de agua, aunque este valor suele variar debido al manejo. La mayor parte del agua del músculo se encuentra en las miofibrillas, en los espacios entre los filamentos gruesos y delgados los



cuales varían entre 320 y 270 Å dependiendo de la longitud del sarcómero, la fuerza iónica y la presión osmótica.

El incremento de la CRA está influenciado por el espacio entre los filamentos y por la presencia de proteína, este espacio está determinado por fuerzas *electrostáticas*, por lo que en carnes de *alio* vaíor en pH se incrementan las cargas negativas de las proteínas, lo que permite el hinchamiento de *las miofibrillas* y en consecuencia cambras en las uniones de actina con la línea Z así como los filamentos de miosina en la línea M y en los enlaces cruzados entre los filamentos de actina y miosina. Por lo tanto la pérdida de agua de la carne depende de la cantidad de fluido liberado por proteínas musculares cuando cambia el espacio entre los filamentos delgados y gruesos.

Existe una relación entre la CRA, el pH y la blandura, debido a que la CRA y el pH tienen el mismo patrón de variación, es decir a menor pH menor CRA. Por otra parte una blandura mayor refleja un alto contenido de agua y por tanto alta CRA, lo cual se representa a valores de pH elevados. Cuando el pH está debajo de 5.5 la carne es muy blanda debido a la desnaturalización de las proteínas y a la pérdida estructural; esta situación no se presenta en la carne en condiciones normales siendo exclusiva de carne procesada en vinagre o ácidos débiles o en productos fermentados (Pérez-Álvarez, 1996).

### 3.11.2 pH

Los cambios de pH que ocurren en una canal durante las primeras 24 h después del sacrificio son importantes para la calidad final de la carne o productos cárnicos.

La acidificación del músculo después de la muerte del animal se debe principalmente a la disponibilidad de glucógeno después del sacrificio del animal (Beltrán y col., 1997). Varios investigadores han demostrado una relación entre el valor del pH final en el músculo, la CRA y la blandura de la carne (Purchas, 1990; Watanabe y col., 1996; Tomberg, 1996).

### **3.11.3 Textura.**

La textura de los alimentos está principalmente determinada por el contenido de humedad y grasa, el tipo y cantidad de proteínas y carbohidratos estructurales. Todas las pérdidas y cambios en estos componentes tienen una influencia importante sobre la textura (Aktas y Kaya, 2001).

La textura de la carne puede ser definida como la composición de los elementos estructurales de la carne y puede ser detectada sensorialmente (Tomberg, 1996). Instrumentalmente la textura se ha determinado por la dureza de corte medida por una navaja de Warner-Bratzler, que indica los kilos de fuerza requeridos para cortar un centímetro cuadrado del músculo, realizando el corte en orientación perpendicular a las fibras musculares.

La textura se ve afectada por la edad del animal ya que se ha observado que la carne de animales jóvenes es más blanda que la de animales viejos. Además de estos factores también se ve involucrado la raza del animal. Crouse y col. (1991) observaron que la carne obtenida de cruces de ganado *Bos indicus* era más dura que la obtenida a partir de *Bos taurus*.

### 3.11.3.1 Fuerza de corte.

La fuerza de corte en los músculos crudos es a veces mayor que en los músculos cocidos. En el caso de los músculos que son más suaves cocidos que crudos, es probable porque contienen una cantidad substancial de tejido conectivo, el cual al calentarse a 68°C en presencia de humedad, gelatiniza y se hace más suave. En los casos donde el cocimiento no haya tenido éste efecto, el tejido predominante es el miofibrilar (contráctil) y el aumento de fuerza se debe claramente al acortamiento de la proteína por efecto de calor (Velazco, 1999).

La fuerza de corte es una variable ampliamente utilizada para evaluar la textura de la carne. La navaja de Warner-Bratzler gráfica la fuerza de corte para comparar las diferentes muestras. Se debe indicar la velocidad de compresión del mismo. Luego se obtiene una curva en la pantalla con las mediciones de textura calculadas por los picos de la curva y el área bajo la curva.

Para evaluar la suavidad en productos de músculo entero, la American Meat Science Association (AMSA, por sus siglas en inglés) recomienda utilizar la medición de fuerza de corte Warner-Bratzler. El músculo se cocina utilizando procedimientos de cocción estandarizados, luego de cocinar la carne se deja enfriar. Varias muestras se deben analizar debido a la variación que puede existir en el mismo músculo. La muestra se toma en dirección de la fibra muscular paralela longitudinalmente a la muestra cilíndrica. El cilindro se coloca en el centro del cabezal de corte Warner-Bratzler con las fibras perpendiculares a la navaja. La

fuerza dará como resultado un valor en kilogramos, que es la fuerza requerida para cortar una muestra estándar de carne.

La Tabla 5 presenta un resumen de fuerzas de corte de diferentes músculos medidos con la navaja Warner Bratzler, la fuerza de corte en músculos crudos y cocido, el porcentaje que éstos representan en la canal y su clasificación de acuerdo al grado de blandura (Velazco, 1999).

**Tabla 5. Clasificación de músculos de acuerdo a su blandura**

Músculo	Fuerza de corte crudo (kg)	Fuerza de corte cocido (kg)	Porcentaje de la canal	Grado de blandura
1. <i>Peroneus tertius</i>	4.91	5.45	0.16	6
2. <i>Gastrocnemius</i>	4.32	3.82	0.52	4
3. <i>Flexor digital superficial</i>	4.55	6.05	0.10	6
4. <i>Vastus intermedius</i>	4.18	3.14	0.20	5
5. <i>Vastus medialis</i>	4.50	2.86	0.24	4
6. <i>Vastus lateralis</i>	5.14	2.64	0.66	5
7. <i>Rectus femoris</i>	4.27	3.09	0.56	5
8. <i>Sartorius</i>	4.68	4.09	0.08	4
9. <i>Pectineus</i>	3.68	2.27	0.18	4
10. <i>Gracilis</i>	5.23	4.45	0.36	5
11. <i>Adductor</i>	4.82	2.36	0.36	6
12. <i>Semimembranosus</i>	5.41	2.86	1.74	5
13. <i>Semitendinosus</i>	5.05	4.95	0.64	5
14. <i>Bíceps femoris</i>	4.14	3.36	2.04	4
15. <i>Tensor fasciae latae</i>	4.91	3.05	0.40	4

**Tabla 5. Clasificación de músculos de acuerdo a su blandura (continuación)**

Músculo	Fuerza de corte crudo (kg)	Fuerza de corte cocido (kg)	Porcentaje de la canal	Grado de blandura
16. <i>Obturator externus</i>	3.27	3.91	0.14	3
17. <i>Iliacus</i>	3.41	2.27	0.22	2
18. <i>Gluteus medius</i>	3.73	2.14	0.88	3
19. <i>Psoas major</i>	3.23	1.82	0.52	1
20. <i>Psoas minor</i>	3.23	2.23	0.10	2
21. <i>Multifidus dorsi</i>	3.64	2.41	0.60	3
22. <i>Longissimus dorsi</i>	3.77	1.73	1.92	3
23. <i>Longissimus costarum</i>	3.59	4.55	0.12	3
24. <i>Oblicus abdominis internus</i>	5.73	2.14	0.60	7
25. <i>Oblicus abdominis externus</i>	5.41	6.09	0.56	6
26. <i>Rectus abdominis</i>	5.27	3.68	0.72	5
27. <i>Cutaneus trunci</i>	6.27	11.82	0.54	7
28. <i>Diafragma</i>	4.55	3.77	0.24	5
29. <i>Intercostalis</i>	4.55	3.77	0.82	5
30. <i>Latissimus dorsi</i>	5.68	5.09	0.60	7
31. <i>Spinalis dorsi</i>	3.82	2.86	0.20	4
32. <i>Rhomboideus</i>	7.41	3.91	0.32	7
33. <i>Trapezius</i>	6.36	7.91	0.40	7
34. <i>Subscapularis</i>	4.50	2.64	0.32	5
35. <i>Complexus</i>	6.55	5.64	0.20	7
36. <i>Infraspinatus</i>	3.64	2.59	0.60	3
37. <i>Serratus ventralis</i>	4.23	3.41	1.24	4

**Tabla 5. Clasificación de músculos de acuerdo a su blandura (continuación)**

Músculo	Fuerza de corte crudo (kg)	Fuerza de corte cocido (kg)	Porcentaje de la	Grado de blandura
38. <i>Transversus abdominis</i>	5.95	4.00	0.32	7
39. <i>Pectoralis ascendens</i>	5.59	5.68	0.86	7
40. <i>Pectoralis descendens</i>	6.95	4.73	0.52	7
41. <i>Supraspinatus</i>	4.18	4.32	0.42	4
42. <i>Teres major</i>	5.05	4.27	0.12	5
43. <i>Deltoideus</i>	5.41	7.73	0.12	6
44. <i>Splenius</i>	6.09	4.00	0.16	7
45. <i>Brachiocephalicus</i>	6.18	8.18	0.36	7
46. <i>Sternocephalicus</i>	7.09	9.00	0.14	7
47. <i>Brachialis</i>	5.41	7.41	0.12	6
48. <i>Tríceps branchi</i>	3.86	3.55	1.04	4
49. <i>Bíceps branchi</i>	4.00	5.82	0.16	5
50. <i>Extensor carpí radialis</i>	5.27	6.32	0.20	6

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 *Objetivo general.*

Determinar las propiedades fisicoquímicas y de textura del músculo *Brachiocephalicus* de Bovino marinado con cloruro de calcio.

### 4.2 *Objetivos específicos.*

1. Establecer las condiciones para reducir el tiempo de marinado por inmersión con cloruro de calcio.
2. Conocer los cambios fisicoquímicos y microbiológicos de la carne marinada con cloruro de calcio y bacterias lácticas.
3. Determinar los cambios fisicoquímicos de la carne marinada con CaCb y GDL.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de carne de Músculo *Brachiocephalicus* de bovino (48 h *postmortem*) fueron obtenidas de una carnicería local. La grasa y el tejido conectivo superficial del músculo fueron eliminados y se procedió a realizar los tratamientos de marinado correspondientes.

### 5.1 *Diseño experimental.*

Se utilizó un diseño factorial completamente al azar de dos factores, tratamiento y tiempo, con tres y cuatro niveles respectivamente. Se utilizó un análisis de varianza con los factores y la interacción entre ellos; tratamiento: testigo, BAL y GDL; tiempo de almacenamiento: 1, 5, 10 y 15 días. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan con objeto de conocer cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas. Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 8.

### 5.2 *Primera parte: reducción de tiempo de marinado.*

Músculo braquiocefálico limpio de grasa y tejido conectivo fue cortado paralelamente en orientación a las fibras musculares en tiras 12 cm. de longitud por 1.2 cm. de ancho y 1.2 cm. de alto. Estas se distribuyeron aleatoriamente para hacer el marinado por inmersión y masajeo.

Las condiciones de marinado por inmersión fueron las descritas por Uytterhaegen y col. (1994), utilizando una solución de  $\text{CaCl}_2$  150 mM, sumergiendo la carne totalmente durante 48 h a 4°C.



El marinado con masajeo al vacío se llevó a cabo en una masajeadora al vacío modelo SVM-30 C (Edel Ingenieros, Monterrey, México). Las muestras se masajearon al vacío con una solución 150 mM CaCl<sub>2</sub>, en un volumen de 1000 mL a 4°C, trabajando a 15 pulgadas de Hg de presión y a una velocidad de giro de 10 rpm, funcionando a intervalos de 25 minutos con 5 minutos de descanso, hasta completar 1000, 2000, 3000 y 4000 golpes. Al llegar al número de golpes requeridos, la masajeadora, fue abierta y se extrajeron 2 de las muestras introducidas inicialmente. Posteriormente todas las tiras fueron empacadas al vacío y se mantuvieron en refrigeración hasta el día siguiente en que se hicieron los análisis. Se realizaron tres réplicas del experimento.

El diseño de los tratamientos de marinado por inmersión y masajeo se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6. Diseño de tratamientos para reducir tiempo de marinado.**

T0	Testigo sin marinar
T1	Inmersión durante 48 horas
T2	Masajeo 1000 giros
T3	Masajeo 2000 giros
T4	Masajeo 3000 giros
T5	Masajeo 4000 giros

### **5.3 Segunda parte: efecto del acidulante y bacterias lácticas.**

A partir de los resultados de la sección anterior, se procedió a ver el efecto de los acidulantes sobre la calidad del músculo braquiocefálico. Una vez establecidas las mejores condiciones de masaje, las muestras de carne después del marinado con  $\text{CaCl}_2$  bien se inocularon con BAL (*Pediococcus pentosaceus*) o bien fueron adicionadas con GDL, comparándose el efecto de éstas sobre la evolución de diversos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos durante la maduración de la carne: pH, CRA, índice de Fragmentación Miofibrilar, Fuerza al Corte, SDS PAGE, Recuento BAL y Coliformes totales -sólo en la carne inoculada con BAL-.

#### **5.3.1 Inoculación de BAL o adición de GDL.**

Músculo braquiocefálico (aproximadamente 1.5 kg) fue cortado en tres trozos del mismo tamaño paralelamente en orientación a las fibras musculares. Dos de ellos se sometieron a marinado. El otro se cortó en 4 trozos perpendiculares a las fibras musculares y cada uno de estos se empacó al vacío utilizándose como testigo.

Las condiciones de marinado en la masajeadora fueron, presión de vacío 15 pulgadas Hg, solución 150 mM  $\text{CaCl}_2$  (1000 mL) a 4°C, velocidad de giro de 10 rpm funcionando a intervalos de 25 minutos con 5 minutos de descanso, hasta completar 2000 golpes. Transcurrido el marinado se sacaron los músculos de la masajeadora, uno se inoculó con BAL y al otro se le adicionó GDL, posteriormente se empacaron al vacío. Los experimentos se realizaron por duplicado.

### **5.3.1.1 Inoculación con BAL.**

A partir de una cepa pura de la bacteria *Pediococcus pentosaceus* (PC -111016) se tomó una alícuota e inoculó en dos tubos de 10 mL de caldo MRS a 35°C durante 24 h de forma que alcanzara una densidad óptica de 1.0 leída en el espectrofotómetro a 650 nm. Posteriormente, uno de los tubos se vertió en un Erlenmeyer con 25 mL de caldo MRS y se mantuvo a 35°C. hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0. En ese momento se procedió a la inoculación de la carne recién marinada con el 5% (v/p) del caldo con las bacterias lácticas respecto al peso de la carne. La carne se mantuvo en contacto con el medio a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras los cuales se escurrió y se empacó al vacío para su maduración.

### **5.3.1.2 Adición de GDL.**

Por otra parte, al otro lote de carne marinada se le agregó 1 % de GDL disuelto en 500 mL de agua destilada. La carne se mantuvo en contacto durante 30 minutos a 4° C, posteriormente se escurrió y empacó al vacío para su maduración.

En ambos casos la maduración consistió en mantener las muestras a 4° C durante 1, 5, 10 o 15 días, que fueron los tiempos de muestreo utilizados para seguir la evolución de los parámetros analizados. En ambos casos se tomó un lote de carne sin marinar como testigo.

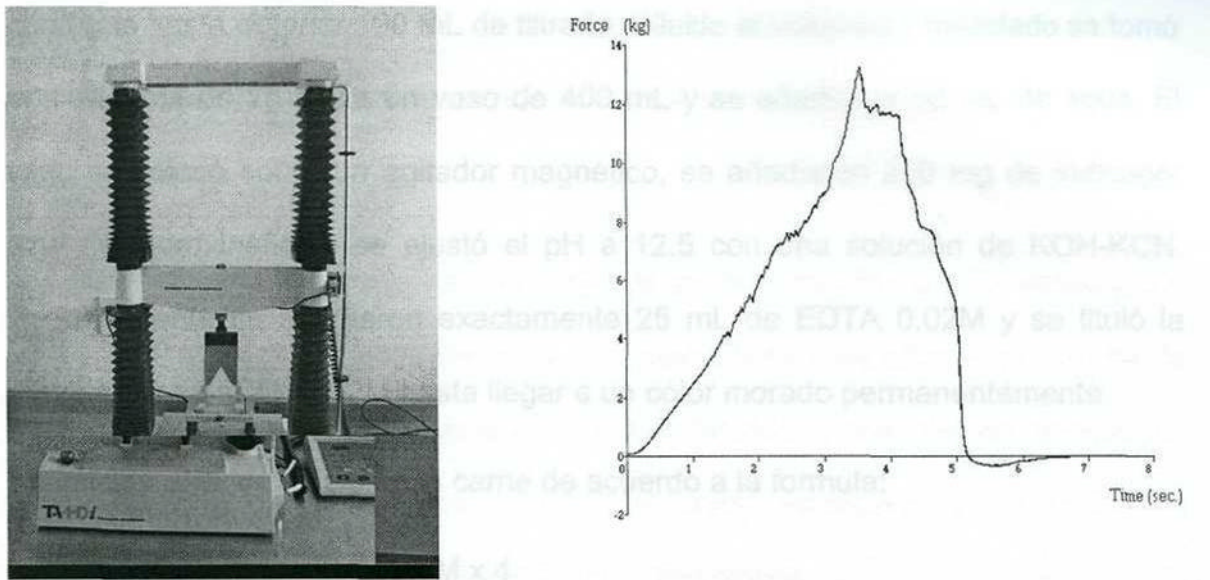
Todas las muestras fueron empacadas al vacío en bolsas Cryovac 6x8 pulgadas, con una empacadora modelo VC999 con un porcentaje de vacío aproximado del 99%.

### **5.3.2 Análisis de textura.**

La textura se determinó mediante fuerza al corte (máxima fuerza detectada) durante la compresión con una navaja Warner Bratzler en un analizador de textura Texture Analyser mod. TA-HDi (Texture Technologies, Scarsdale/ NY Stable Micro System, Surrey, Inglaterra). Se llevó a cabo sobre trozos de carne cruda y cocida, 6.0 cm. de largo x 1.2 cm. de ancho x 1.2 cm. de alto aproximadamente. Se hicieron tres cortes en cada muestra. La fuerza de corte da como resultado un valor en kilogramos, que es la fuerza requerida para cortar una muestra estándar de carne (Lien, 2001).

En el ensayo con BAL y GDL los análisis se realizaron sobre carne cruda y cocinada en los distintos tiempos de maduración. El cocinado consistió en introducir trozos de carne de unos 80 g en agua a 80° C protegidos por una bolsa de plástico hasta alcanzar una temperatura interna de 70°C (Wheeler y col., 1997b) Posteriormente las muestras se enfriaron a temperatura ambiente. Las dimensiones de los trozos de carne cruda y cocinada para el análisis fueron las mismas que en el ensayo preliminar.

La evaluación de textura de las muestras se realizó mediante un juego de cuchillas Warner-Bratzler, utilizando una celda de carga de 50 Kg y una velocidad de ensayo de la sonda de 2 mm/s.



**Figura 4. Analizador de textura y gráfico en la evaluación de textura de la carne**

La Figura 4 muestra un equipo analizador de textura con la navaja Warner-Bratzler y un gráfico típico en la evaluación de fuerza al corte (máxima fuerza detectada).

### **5.3.3 Concentración de calcio.**

La técnica utilizada para evaluar la concentración de calcio en las muestras marinadas fue la descrita en la AOAC No. 983.19. Calcio en aves y bovino mecánicamente separado (AOAC, 1997).

Se pesaron 10 g de muestra previamente homogeneizada en una picadora, y se añadieron 30 ml de HCl (1/1) (v/v), se hizo una digestión a ebullición lenta durante 20 minutos aproximadamente. El digerido se dejó enfriar y se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 4 en un matraz volumétrico de 200 mL, se lavó el filtro

con agua hasta obtener 190 mL de filtrado. Diluido al volumen y mezclado se tomó una alícuota de 25 mL a un vaso de 400 mL y se añadieron 50 mL de agua. El vaso se colocó sobre un agitador magnético, se añadieron 200 mg de indicador azul de hidroxinaftol y se ajustó el pH a 12.5 con una solución de KOH-KCN. Seguidamente se añadieron exactamente 25 mL de EDTA 0.02M y se tituló la muestra con  $\text{CaCO}_3$  0.02M hasta llegar a un color morado permanentemente.

Se calculó el % de calcio en la carne de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ Calcio (Ca)} = (A-B) \times R \times M \times 4$$

Donde;

A = mi de EDTA añadidos

B = mi de  $\text{CaCO}_3$  de la titulación

R = Relación, EDTA:  $\text{Ca}^{2+}$ -3

M = Molaridad de EDTA

4 = Valencia del EDTA

#### **5.3.4 Capacidad de retención de agua.**

La técnica para la determinación de CRA de la carne fue la de Hamm (1975), con modificaciones. Se tomó una muestra de 300 mg de carne y se colocó en el centro del papel filtro, se comprimió entre dos placas plexiglás colocando sobre la parte posterior un peso de 1 kg durante 10 minutos. Se reportó la capacidad de

retención de humedad por diferencia de peso a partir del incremento de peso del papel una vez eliminada la muestra carne ya presionada.

### **5.3.5 pH**

Se realizó la determinación del pH según la técnica descrita por Guerrero y col. (2002). Se pesaron 10 g de muestra homogeneizada y se añadieron 100 ml de agua destilada y se homogeneizó en una licuadora durante un minuto. El homogeneizado se filtró para eliminar el tejido conectivo, y se utilizó un potenciómetro marca Oakton serie EP 2500. Singapore.

### **5.3.6 Análisis microbiológicos.**

#### 5.3.6.1 Población de coliformes totales.

Se tomaron 10 g de muestra que se homogeneizaron en 90 mL de agua destilada estéril con un Stomacher y se realizaron las diluciones pertinentes, se utilizó como medio de cultivo Agar de Bilis y Rojo Violeta marca Bioxon, hecho en México por Becton Dickinson S. A. de C. V. (Grau, 1983), las cajas se incubaron a 35°C durante 24 horas. Al final de este periodo se realizó el conteo, reportándose las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra.

#### 5.3.6.2 Población de BAL.

A partir del homogeneizado obtenido en 5.3.7.1, se realizaron las mismas diluciones pertinentes, se hizo un recuento en cajas con Agar MRS (Mann-Rogose-Sharp) incubadas a 35°C durante 24 h.

### 5.3.7 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

#### 5.3.7.1 Obtención de las muestras

La extracción de proteínas de la carne se obtuvo por homogenización de 40 g de muestra en partes iguales de agua y hielo. La mezcla fue agitada en un baño de hielo durante 10 min. Se añadió agua comente (2:3) y se agito por 15 minutos más, la suspensión se filtró con una coladera metálica para eliminar el tejido conectivo. La muestra se centrifugó a 2000 x g durante 15 minutos a 10° C. El sobrenadante se decantó dejando aproximadamente 7 mL. Este fue resuspendido en agua destilada y el contenido de proteína se ajustó a 5 mg/mL (Totosaus y col., 2000a).

#### 5.3.7.2 Electroforesis en gel (SDS PAGE)

Las proteínas miofibrilares aisladas fueron analizadas de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). En una cámara de electroforesis Mini Protean II Slab cell (Bio-Rad, Richmond, California). Se inyectaron 25  $\mu$ L a cada carril de las muestras tratadas con la solución amortiguadora muestra (dodecil sulfato de sodio al 10% mercaptoetanol al 5 % azul de bromofenol al 0.05% glicerol 10% 0.5 M Tris-HCl pH 6.8) antes de inyectar las muestras se pusieron a ebullición durante 4 minutos y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos a fin de lograr una mejor solubilización.

Se usaron geles verticales con 10 % de poliacrilamida y 4% en el gel concentrador. Como referencia se aplicó un marcador que contenía 5 proteínas de



peso molecular conocido: miosina 200 kDa, (3-galactosidasa 116.25 kDa, fosforilasa  $\beta$  97.4 kDa, seroalbúmina 66.2 kDa, albúmina de huevo 45 kDa. (Bio-Rad 161-0303).

Las muestras se corrieron con un voltaje constante de 200 V. durante un tiempo aproximado de 45 minutos.

Terminado el proceso de separación de los geles, se tiñeron empleando una solución de azul de Coomasie al 0.1% durante 30 min. y después se destiñó empleando una solución al 40% de metanol y 10% de ácido acético. Se leyeron los geles en un auto analizador de imágenes Geldoc 2000 (Bio-Rad, California) para cuantificar los pesos moleculares de las bandas de las proteínas (Claeys y col., 1995).

### **5.3.8 índice de fragmentación miofibrilar.**

Se utilizó la técnica descrita por Olson y col. (1976). Se homogeneizaron 4 g de muestra con 10 volúmenes (v/p) de agua a 2° C. Se utilizó una solución extractara 100 mM KCl, 20 mM fosfato de potasio (pH 7.0), 1 mM de EDTA y 1mM de azida de sodio. El homogeneizado se centrifugó a 1000 X g durante 15 min. y se decantó el precipitado. El precipitado fue resuspendido en 5 volúmenes (v/p) de la solución amortiguadora y se filtró para eliminar el tejido conectivo. Este lavado se repitió en cuatro ocasiones, y finalmente el sedimento miofibrilar fue resuspendido en 5 volúmenes (v/p) y se determinó la concentración de proteína por el procedimiento de biuret. Se ajustó el contenido de proteína a 10 mL del extracto a

0.5 mg/ml, se leyó la absorbancia a 540 nM se multiplicó por 200 y se reportó por mL de muestra.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Primera parte (ensayo preliminar).

La Tabla 7 muestra la significancia y el coeficiente de correlación obtenido por las variables fuerza al corte Warner-Bratzler (WB) y concentración de calcio (Ca), la Tabla 8 el análisis de medias de Duncan ( $P < 0.05$ ) para estas variables.

**Tabla 7. Significancia y coeficiente de correlación para las variables WB y Ca.**

Variables	P<	R <sup>2</sup>
Fuerza al corte Warner-Bratzler (Kg)	0.0386	.58555
Concentración de Calcio (mg)	0.0001	.92575

**Tabla 8. Análisis de medias de Duncan para las variables WB y Ca.**

Variable respuesta	Tratamientos					
	Testigo	Inm <sub>48h</sub>	1000	2000	3000	4000
Fuerza al corte	26.45 <sup>a</sup>	14.20 <sup>b</sup>	14.01 <sup>b</sup>	13.67 <sup>b</sup>	11.57 <sup>b</sup>	11.48 <sup>b</sup>
WB	0.119 <sup>d</sup>	0.906 <sup>a</sup>	0.639 <sup>c</sup>	0.735 <sup>b</sup>	0.702 <sup>bc</sup>	0.739 <sup>b</sup>

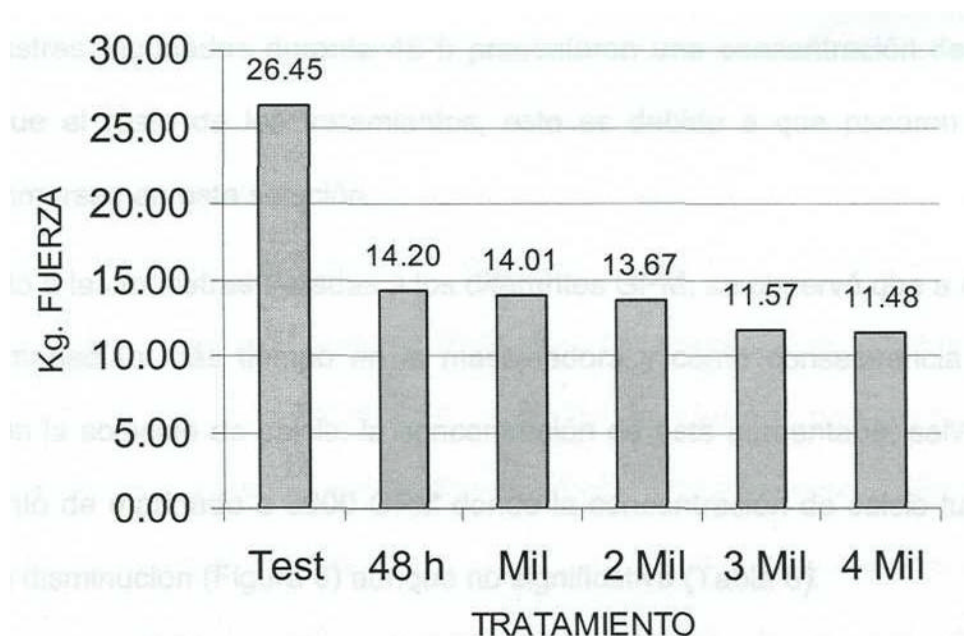
Medias con la misma letra en el mismo renglón no son estadísticamente significativas.

#### 6.1.1 Fuerza al Corte.

La máxima fuerza detectada durante la compresión medida por la navaja Warner-Bratzler mostró una marcada influencia de los diferentes tratamientos empleados con respecto a la muestra sin marinar. Esto reafirma lo reportado en los diferentes

trabajos sobre ablandamiento de la carne (Morgan y col., 1991a; Steen y col., 1997; Wheeler y col., 1997a; Pérez-Chabela y col. 1998), donde el cloruro de calcio tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la activación de enzimas proteolíticas capaces de degradar tejido miofibrilar, sobre todo las enzimas dependientes del calcio, esto es, las calpainas.

Por otro lado, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en cuanto al número de revoluciones o GPM utilizados, pero sí se encontró una tendencia a un mayor ablandamiento en las muestras tratadas con masajeo al vacío (valores de fuerza menores) que las muestras marinadas por inmersión durante 48 h a 4°C (Figura 5). Se puede observar que a medida que la carne estuvo mayor tiempo en la masajeadora reportó valores de fuerza cada vez menores, aunque éstos no hayan sido significativos ( $P < 0.05$ ) con respecto al marinado por inmersión durante 48 horas. Es posible que estos valores de fuerza menores sean también debidos al daño ocasionado a la estructura celular durante el proceso de masajeo (Velazco, 1996).



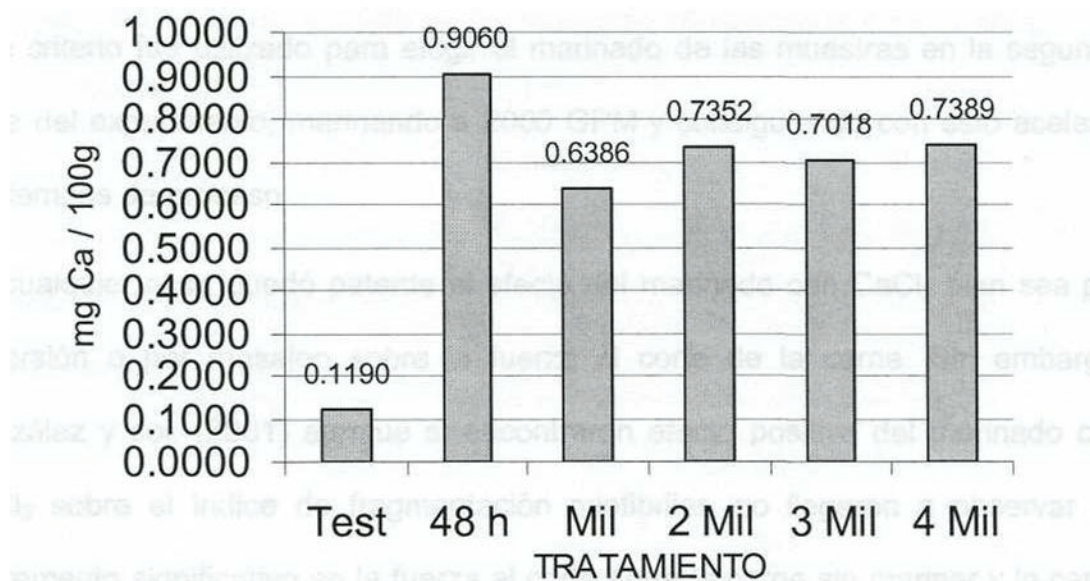
**Figura 5. Fuerza al corte de los diferentes tratamientos medido con la navaja Warner-Bratzler en el ensayo preliminar.**

### 6.1.2 Concentración de Calcio.

La Figura 6, muestra los resultados de la concentración de calcio para los diferentes tratamientos. De acuerdo al análisis de varianza hubo una alta significancia (Tabla 7) en cuanto a los tratamientos analizados. Como era de esperarse, la muestra testigo reportó la menor cantidad de calcio dado que no tuvo ningún tratamiento, la cantidad de éste es solo la contenida en la carne de forma natural. La cantidad de calcio en el músculo es mínima (<0.1 %) dado que la mayoría del calcio del organismo está presente en los huesos y los dientes (Forrest, 1979).

Las muestras marinadas durante 48 h presentaron una concentración de calcio mayor que el resto de los tratamientos, esto es debido a que pasaron mayor tiempo inmersas en esta solución.

En cuanto a las muestras tratadas a los diferentes GPM, se observó que a medida que permanecían más tiempo en la masajeadora y como consecuencia mayor tiempo en la solución de calcio, la concentración de éste aumentaba, salvo en el tratamiento de marinado a 3000 GPM donde la concentración de calcio tuvo una pequeña disminución (Figura 6) aunque no significativa (Tabla 8).



**Figura 6. Concentración de calcio de las muestras tratadas a diferentes GPM. en el ensayo preliminar.**

Como se mencionó anteriormente, no hubo diferencias estadísticamente significativa en la fuerza al corte en cuanto a los tratamientos por medio del

masajeo y al tratamiento por inmersión durante 48 horas, es decir; se obtienen los mismos resultados marinando durante 48 horas, que marinando con masajeo al vacío durante 2, 4, 6, u 8 horas que fue el tiempo requerido para cada uno de los tratamientos mediante este sistema. Por otra parte, la concentración de Ca aunque es superior en las muestras marinadas por inmersión que por masajeo, esta diferencia desde el punto de vista de la dureza parece no tener repercusiones. Por lo tanto, esta primera prueba nos conduce a afirmar que empleando un sistema de masajeo al vacío permite un ahorro considerable de tiempo en conseguir cierto ablandamiento de la carne del músculo *Brachiocephalicus* de Bovino.

Este criterio fue utilizado para elegir el marinado de las muestras en la segunda parte del experimento, marinando a 2000 GPM y consiguiendo con esto acelerar los tiempos de proceso.

En cualquier caso quedó patente el efecto del marinado con  $\text{CaCl}_2$  bien sea por inmersión o por masajeo sobre la fuerza al corte de la carne. Sin embargo, González y col. (2001) aunque sí encontraron efecto positivo del marinado con  $\text{CaCl}_2$  sobre el índice de fragmentación miofibrilar, no llegaron a observar un decremento significativo en la fuerza al corte entre la carne sin marinar y la carne marinada, tal vez por el corto tiempo de marinado por inmersión (2 horas) que podría no ser suficiente para alcanzar una concentración de Ca. suficiente en el interior de las piezas.

## 6.2 Segunda parte (ensayo con BAL o GDL). 6.2.1 Análisis fisicoquímicos.

### 6.2.1.1 Análisis estadístico

La Tabla 10 muestra la significancia y el coeficiente de correlación obtenido por las variables pH, capacidad de retención de humedad, y textura (fuerza al corte) para las muestras crudas y cocidas. Se observa una alta significancia ( $P < 0.0001$ ) en cuanto a las variables analizadas.

**Tabla 9. Significancia y coeficiente de correlación de las variables analizadas pH, CRA, y fuerza al corte en las muestras marinadas con BAL o GDL.**

variable	P<	R <sup>2</sup>
pH	0.0003	0.2627
CRA	0.0001	0.7516
Fuerza al corte(cruda)	0.0001	0.5332
Fuerza al corte(cocida)	0.0001	0.5702

La Tabla 11 muestra la significancia para las variables tiempo de maduración, tratamiento e interacción entre tiempo y tratamiento analizados. Se puede observar que el tiempo de almacenamiento solo fue significativo para la CRA y fuerza al corte en muestras crudas, y por otra parte existió una alta significancia ( $P < 0.0001$ ) en cuanto a los tratamientos utilizados para todas las variables así



como para la interacción tiempo- tratamiento de CRA y fuerza al corte en muestras cocidas. Las Tablas 12 y 13 muestran el análisis de medias de las variables estudiadas.

**Tabla 10. Significancia para las variables tiempo de maduración, tratamiento y la interacción tiempo - tratamiento en las muestras marinadas.**

Variable respuesta	Variable P<		
	Tiempo	Tratamiento	Tiempo * Tratamiento
PH	0.7321	0.0001	0.6343
CRA	0.0001	0.0001	0.0020
F máx. cruda	0.0263	0.0001	0.0233
F máx. cocida	0.1030	0.0001	0.0001

**Tabla 11. Análisis de medias de Duncan en las muestras maduradas a diferente tiempo.**

Variable	Días			
	1	5	10	15
PH	5.65 <sup>a</sup>	5.55 <sup>a</sup>	5.55 <sup>a</sup>	5.50 <sup>a</sup>
CRA	60.6 <sup>b</sup>	65.0 <sup>a</sup>	64.8 <sup>a</sup>	63.3 <sup>a</sup>
F.máx. cruda	9.78 <sup>b</sup>	10.03 <sup>b</sup>	12.01 <sup>a</sup>	11.28 <sup>ab</sup>
F. máx. cocida	8.02 <sup>db</sup>	7.62 <sup>b</sup>	8.34 <sup>db</sup>	8.48 <sup>a</sup>

\* Medias con la misma letra en el mismo renglón no son estadísticamente significativas.

**Tabla 12. Análisis de medias de Duncan en los diferentes tratamientos utilizados.**

Variable	Tratamiento		
	Testigo	BAL	GDL
pH	5.94 <sup>a</sup>	5.40 <sup>b</sup>	5.33 <sup>b</sup>
CRA	71.0 <sup>a</sup>	61.8 <sup>b</sup>	57.5 <sup>c</sup>
F. máx. cruda	9.85 <sup>b</sup>	7.75 <sup>c</sup>	14.72 <sup>a</sup>
F. máx. cocida	6.91 <sup>b</sup>	7.46 <sup>b</sup>	9.96 <sup>a</sup>

\* Medias con la misma letra en el mismo renglón no son estadísticamente significativas.

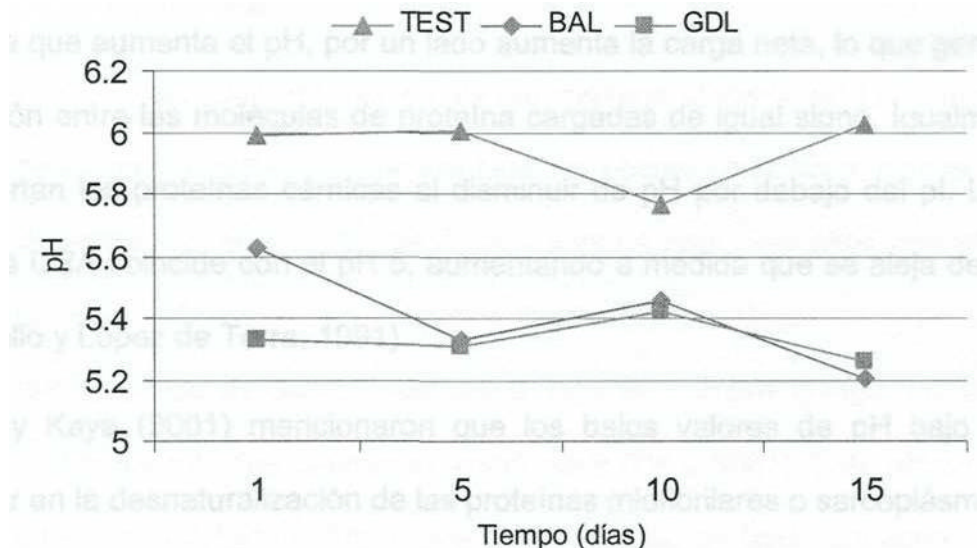
#### 6.2.1.2 pH

En la figura 7 se observan los valores de pH para cada uno de los tratamientos empleados y su evolución a lo largo del tiempo de maduración. Se puede apreciar que el pH de las muestras testigo es mayor que el de los otros dos tratamientos, incluso en el primer día de maduración. Como consecuencia de la adición de BAL o GDL, se obtuvieron valores de pH bajos en las muestras marinadas, con respecto a la muestra testigo dado que esta no contenía ningún agente que hiciera bajar el nivel de pH. Esto quiere decir que la acidificación de la carne por la hidrólisis del GDL o la inoculación de BAL es patente ya desde el primer día de maduración.

Por otra parte se puede observar que en el primer día de maduración, el pH de las muestras inoculadas con BAL es mayor a las acidificadas con GDL, pero las diferencias no son estadísticamente significativas. Este hecho se debe probablemente que las BAL producen ácido láctico a partir de los carbohidratos

presentes en la carne, pero la cantidad de éstos es muy poca, descendiendo el pH durante los 5 primeros días de maduración. A partir del día 5 de maduración el pH experimentó pocos cambios en las muestras analizadas.

Se sabe que el pH de la carne depende de varios factores, entre otros, de las condiciones pre y postmortem, siendo especialmente importantes el contenido de glucógeno del músculo al momento del sacrificio, la velocidad y el nivel de degradación de ese glucógeno durante la transformación del músculo en carne (Guerrero y col., 2002). También el pH depende de las condiciones y tiempo de almacenamiento. Durante el almacenamiento, el nivel de pH de la carne aumenta ligeramente por la formación bases nitrogenadas formadas principalmente a partir de compuestos aminados como las proteínas, péptidos y aminoácidos. Además en el caso de los productos cárnicos, el pH depende de los aditivos que se incluyan en su formulación o de los procesos de fermentación que se lleven a cabo.



**Figura 7. Valores de pH para las muestras testigo, marinadas con BAL ó GDL.**

### 6.2.1.3 CRA

La figura 8 señala los valores de la CRA de las muestras marinadas de los tres tratamientos a lo largo de todo el tiempo de maduración. La capacidad de retención de humedad ( $P < 0.001$ ) fue menor en las muestras tratadas con BAL y GDL, respecto a la muestra testigo, debido principalmente a que la acidez producida en ambas disminuyó el nivel de pH hasta situarlo en valores alrededor de 5, cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas de la carne, mientras que el valor de pH de la muestra testigo se situó entre valores de 5.8 y 6.2, (alejados del punto isoeléctrico). Asimismo, las muestras tratadas con BAL presentaron un valor de CRA ligeramente superior al de las tratadas con GDL.

El pH tiene un efecto definitivo en la CRA, a valores de pH 5, punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas cárnicas, no existe en ellas carga eléctrica neta y existe, por tanto la menor repulsión entre las moléculas de proteína entre sí. A medida que aumenta el pH, por un lado aumenta la carga neta, lo que genera una repulsión entre las moléculas de proteína cargadas de igual signo. Igualmente se comportan las proteínas cárnicas al disminuir de pH por debajo del pl. Luego la mínima CRA coincide con el pH 5, aumentando a medida que se aleja del mismo (Carballo y López de Torre, 1991).

Aktas y Kaya (2001) mencionaron que los bajos valores de pH bajo pueden resultar en la desnaturalización de las proteínas miofibrilares o sarcoplásmicas, las cuales pueden alterar su capacidad de retención de humedad.

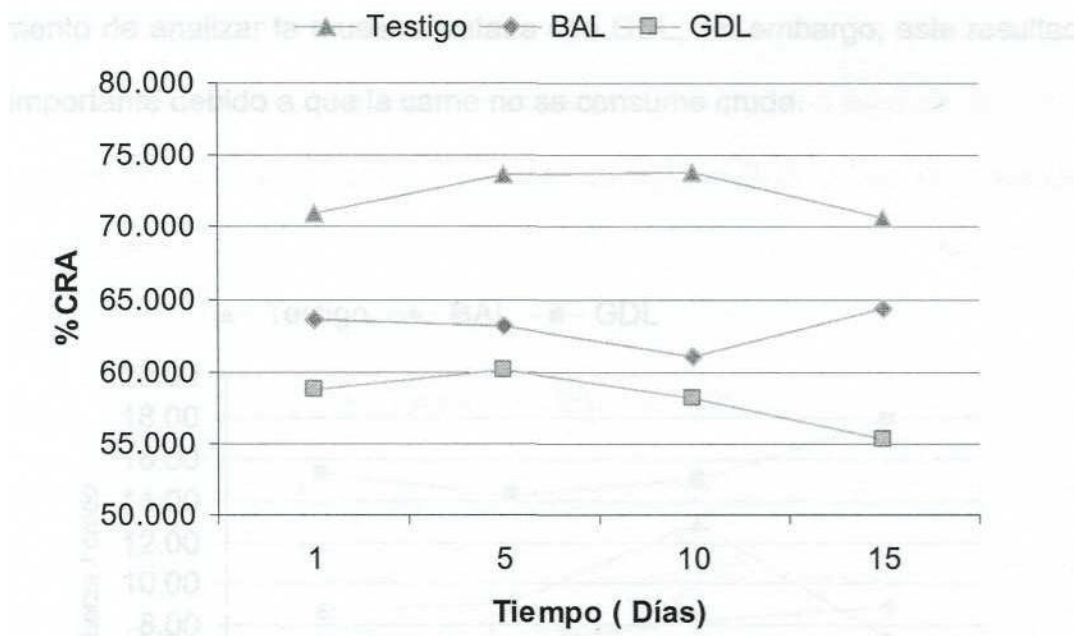


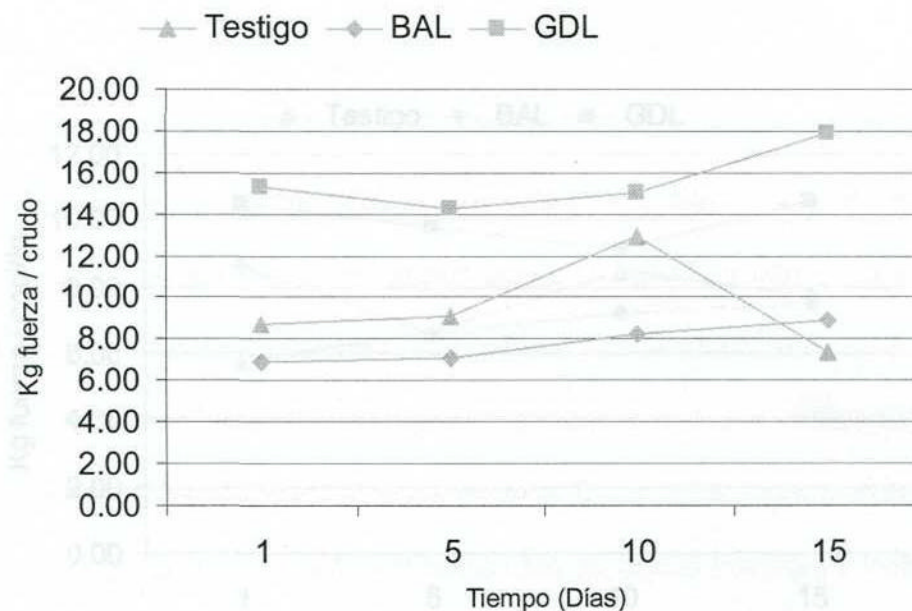
Figura 8. Valores de CRA para las muestras testigo, marinadas con BAL o GDL.

#### 6.2.1.4

##### Fuerza al corte

La figura 9 muestra los valores de fuerza máxima al corte en las muestras de carne marinada sin cocinar. En primer lugar se observa que las muestras tratadas con GDL fueron las que presentaron los valores fuerza más altos convirtiéndose en la muestra más dura. En segundo lugar, las muestras tratadas con BAL presentaron valores de fuerza más bajos, que la muestra testigo. La diferencia debida al tratamiento fue altamente significativa ( $P < 0.0001$ ). Este ablandamiento mayor tal vez sea debido a diferencias en la cantidad de tejido conectivo presente

al momento de analizar la muestra tratada con GDL, sin embargo, este resultado no es importante debido a que la carne no se consume cruda.

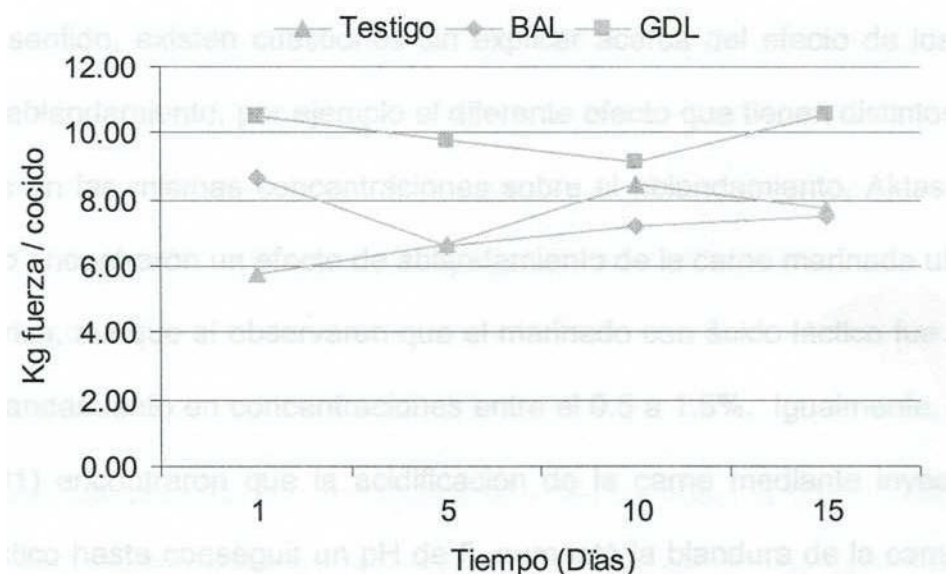


**Figura 9. Valores de fuerza al corte en muestras crudas.**

En la figura 10 se observan los valores de fuerza máxima al corte de la carne marinada cocida. Al igual que en las muestras crudas, las muestras cocidas tratadas con GDL presentaron los valores más elevados en cuanto a dureza. En este caso, a diferencia de la carne cruda, las muestras con BAL presentaron valores de fuerza algo más altos en comparación con el testigo aunque esta diferencia numérica no fue significativa.

Tomando en cuenta el criterio de Steen y col. (1997) ellos reportan que el ablandamiento a valores de pH altos es el resultado de un incremento en la

actividad proteolítica, incremento en la CRA y reducción de pérdidas por cocimiento, la mayor blandura de la muestra testigo se podría explicar al menos parcialmente por su mayor pH y por tanto su mayor CRA y por la proteólisis normal de la carne.



**Figura 10. Valores de Fuerza al corte en muestras cocidas.**

Por otra parte, cuando el pH de la carne es suficientemente bajo como es el caso de la carne procesada en vinagre o ácidos débiles o en productos fermentados la carne se ablanda debido a la desnaturalización de las proteínas y a la pérdida estructural (Pérez-Álvarez, 1996), por lo que cabría esperar un ablandamiento de la carne cuando se adiciona ácido en cantidad suficiente.

Sin embargo, el mecanismo de ablandamiento de la carne mediante el marinado con soluciones de ácidos orgánicos débiles no está totalmente comprendido, aunque parece ser importante el efecto del ácido sobre el colágeno del tejido conjuntivo (Aktas y Kaya, 2001) o el colágeno y la estructura miofibrilar (Berger y col., 2001).

En este sentido, existen cuestiones sin explicar acerca del efecto de los ácidos sobre el ablandamiento, por ejemplo el diferente efecto que tienen distintos ácidos utilizados en las mismas concentraciones sobre el ablandamiento, Aktas y Kaya (2001) no encontraron un efecto de ablandamiento de la carne marinada utilizando ácido cítrico, aunque sí observaron que el marinado con ácido láctico fue efectivo en el ablandamiento en concentraciones entre el 0.5 a 1.5%. Igualmente, Berge y col. (2001) encontraron que la acidificación de la carne mediante inyección de ácido láctico hasta conseguir un pH de 5, aumentó la blandura de la carne. En el presente trabajo se encontró que la GDL endurece la carne respecto a la acidificación con BAL e incluso respecto al testigo (carne marinada no acidificada), sin poder encontrar una causa a este hecho.

En cualquier caso, para lograr ablandar la carne mediante el marinado con ácidos orgánicos, se requiere de suficiente concentración de ácido y una completa penetración de las soluciones acidas, que tal vez no se hayan alcanzado en el presente experimento, ya que el uso de los agentes utilizados no disminuyó la dureza.



Por otro lado, otro factor a tener en cuenta en el marinado con ácidos orgánicos es que pueden tener efectos perjudiciales sobre el sabor o el color de la carne (Berge y col., 2001).

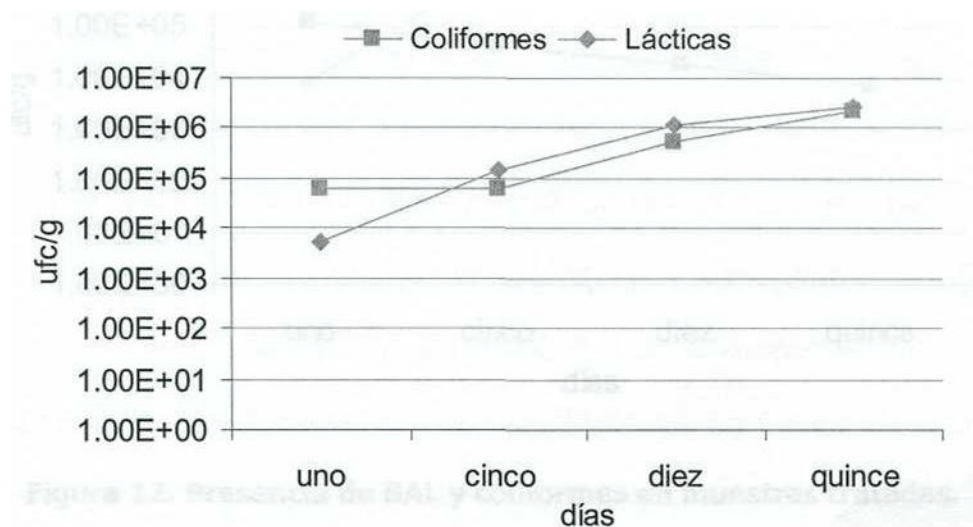
El efecto en blandura de las muestras marinadas con cloruro de calcio y adicionándoles bacterias lácticas es gradual y se produce en los primeros 5 días de maduración, permaneciendo constante en los siguientes días. Cabe hacer notar que las enzimas endógenas no afectan las proteínas del tejido conectivo, las cuales son las responsables de la dureza de la carne, el ablandamiento por calpainas es principalmente debido a la degradación de proteínas como  $\alpha$ -actinina, desmina y troponina T, proteínas reguladoras y que se encuentran en una proporción en el músculo menor al 1% (Pérez-Chabela, 1998).

Finalmente, comparando ambas figuras (9 y 10) se observa que los valores de fuerza fueron menores en las muestras cocinadas que en las muestras crudas ( $P < 0.0001$ ). Esto puede haber sido debido a la propiedad termolábil del colágeno que al calentarse a temperaturas entre 65 y 70°C. éste tiende a gelatinizarse y como consecuencia proporciona un mayor ablandamiento a la carne (Bailey y Light, 1989).

### **6.2.2 Análisis Microbiológicos.**

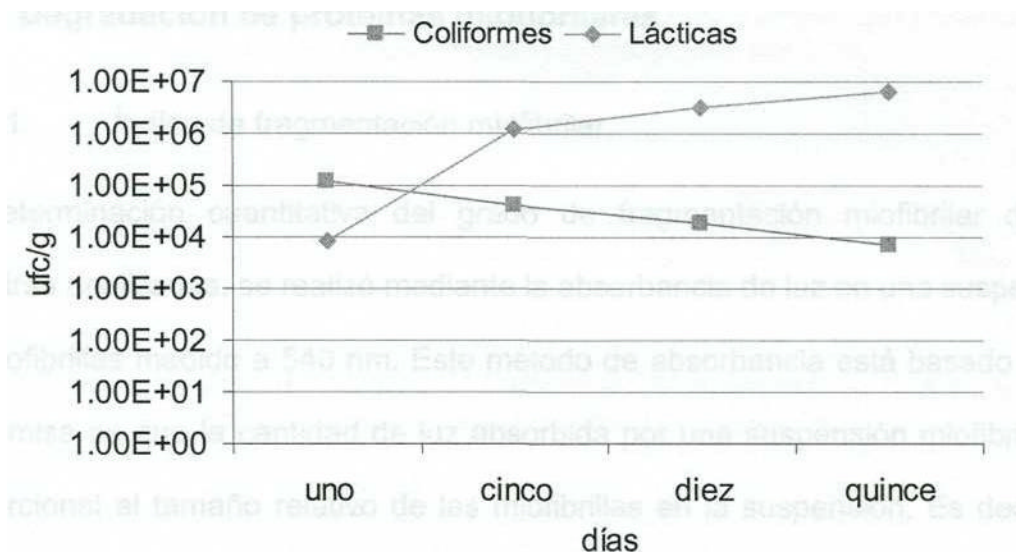
Los microorganismos que se estudiaron fueron coliformes totales y bacterias lácticas, la figura 11 muestra la presencia de éstos durante el periodo de

almacenamiento de las muestras testigo. Se puede observar un crecimiento continuo a través de los días tanto de bacterias lácticas como de coliformes.



**Figura 11. Presencia de BAL y coliformes totales en muestras testigo.**

La figura 12 muestra la presencia de estos microorganismos en muestras tratadas con BAL. Se puede apreciar un crecimiento de las BAL y un descenso de los coliformes, lo que se puede explicar por el efecto de las BAL durante el periodo de almacenamiento inhibiendo la actividad de los coliformes. Numerosos trabajos constatan el efecto antagonista de las bacterias lácticas sobre microorganismos patógenos, lo que permite una mayor vida de anaquel de los productos cárnicos tratados con estas.



**Figura 12. Presencia de BAL y coliformes en muestras tratadas.**

Requena y Peláez (1995) y Heiander y col., (1997) mencionan que las bacterias lácticas, pueden contribuir a la extensión de la vida de anaquel de los productos cárnicos, debido a que tienen capacidad para inhibir otros microorganismos patógenos y de descomposición mediante la competencia de los nutrientes, por desplazamiento del nicho ecológico o por la producción de sustancias antimicrobianas como los ácidos láctico, acético, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

### **6.2.3 Degradación de proteínas miofibrilares.**

#### 6.2.3.1 Índices de fragmentación miofibrilar.

La determinación cuantitativa del grado de fragmentación miofibrilar de las muestras analizadas, se realizó mediante la absorbancia de luz en una suspensión de miofibrillas medido a 540 nm. Este método de absorbancia está basado sobre la premisa de que la cantidad de luz absorbida por una suspensión miofibrilar es proporcional al tamaño relativo de las miofibrillas en la suspensión. Es decir; en dos suspensiones miofibrilares teniendo la misma concentración de proteína, la suspensión que tiene más fragmentación de miofibrillas es la más turbia y tiene los valores de absorbancia más altos (Olson y col., 1976).

La Tabla 13 muestra la alta significancia de los resultados de esta variable tanto en el tiempo de almacenamiento de las muestras como en el tratamiento recibido por ellas y la interacción existente entre estos. Por otro lado en la Tabla 14 se observa el análisis de medias de Duncan durante el tiempo de almacenamiento y el tratamiento utilizado. Así también, en la figura 13 los valores del IFM. para las muestras analizadas durante los días 1, 5, 10, o 15.

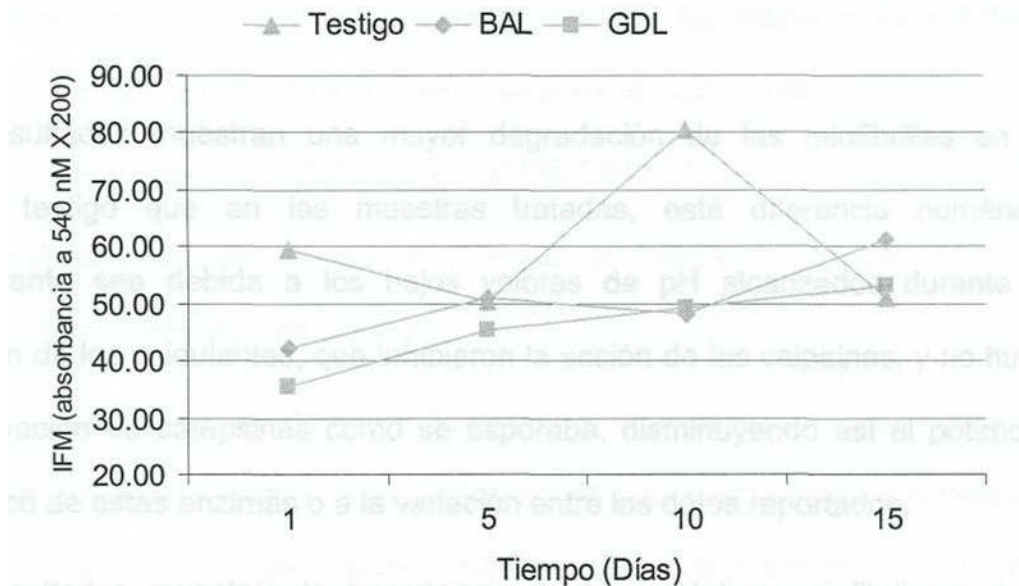
**Tabla 13. Significancia, coeficiente de correlación, tiempo, tratamiento e interacción entre tiempo y tratamiento del IFM.**

Variable	P<	R <sup>2</sup>	Tiempo	Tratamiento	Tiempo Tratamiento
IFM	0.0001	0.6918	0.0001	0.0001	0.0001

**Tabla 14. Análisis de medias de Duncan del IFM durante el tiempo de almacenamiento y el tratamiento utilizado.**

Variable	Tiempo				Tratamiento		
	1	5	10	15	Testigo	BAL	GDL
IFM	47.633 <sup>c</sup>	50.933 <sup>c</sup>	59.533 <sup>a</sup>	55.033 <sup>b</sup>	61.200 <sup>a</sup>	50.175 <sup>b</sup>	48.475 <sup>b</sup>

Medias con la misma letra en el mismo renglón no son estadísticamente significativas.



**Figura 13. Índice de fragmentación miofibrilar en muestras testigo, BAL y GDL almacenadas durante 1, 5, 10 ó 15 días.**

El índice de fragmentación miofibrilar aumentó significativamente ( $P < 0.0001$ ) durante los días de almacenamiento de la carne, tanto en muestras testigo como las tratadas con BAL o GDL. Los valores fueron incrementando a medida que transcurría el periodo de maduración principalmente en la muestra testigo.

La fragmentación de las miofibrillas ocurrió durante los primeros días de almacenamiento y que se haya incrementado significativamente durante el proceso de almacenamiento es indicativo de que la actividad del factor activado por el calcio. (FAC) sobre las proteínas miofibrilares, ocurre durante los primeros días de almacenamiento de la carne. EL FAC es una proteasa neutra activada después del sacrificio de los animales y es responsable de la degradación de proteínas miofibrilares, de la desaparición de troponina T, troponina I y la aparición de un componente 30 kDa durante el almacenamiento postmortem (Olson y col., 1976).

Estos resultados muestran una mayor degradación de las miofibrillas en la muestra testigo que en las muestras tratadas, esta diferencia numérica, posiblemente sea debida a los bajos valores de pH alcanzados durante la aplicación de los acidulantes, que inhibieron la acción de las calpainas, y no hubo una activación de catepsinas como se esperaba, disminuyendo así el potencial proteolítico de estas enzimas o a la variación entre los datos reportados.

Estos resultados muestran la importancia de las proteínas miofibrilares y su relación con el ablandamiento de la carne durante el almacenamiento. Particularmente la relación entre IFM y la fuerza al corte.

### 6.2.3.2 Electroforesis (SDS PAGE).

La marinación con bacterias lácticas y la adición de gluconolactona, tenían la función de bajar el nivel de pH y con esto activar a las enzimas endógenas catepsinas, sin embargo, los resultados obtenidos por SDS-PAGE (Tabla 15 y Figura 14) muestran que la mayor degradación está en la carne marinada con bacterias lácticas, pero esta degradación es similar al testigo en el día 5, esto podría significar que el pH no bajó lo suficiente y que las únicas enzimas que están actuando son las calpainas lo cual concuerda con los resultados de pH y fuerza al corte encontrados, donde se obtuvieron valores similares en todas las muestras.

En el tratamiento con GDL el número de bandas es menor y se mantiene constante durante los 15 días de almacenamiento, esto podría ser por el pH obtenido o porque tal vez la GDL sea un inhibidor para la actividad de las enzimas.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en fuerza al corte donde la GDL tiene los valores más altos de dureza.

Olson y Parrish (1976) pusieron de manifiesto que la aparición en los geles de miofibrillas del componente 30 kDa se acompaña por la reducción de la dureza y aumento del índice de fragmentación miofibrilar durante la maduración de la carne de vacuno. Además se ha demostrado que la disminución de la dureza durante la maduración estaba relacionada cuantitativamente con la pérdida de troponina T.

La troponina T es un indicador de proteólisis postmortem y aparece tanto en testigo, marinada con BAL y GDL desde el día 1, pero la carne marinada con BAL muestra más bandas menores que la GDL.

La desmina y la  $\alpha$ -actinina aparecen en todos los tiempos y todos los tratamientos de las muestras después del día 5, los patrones electroforéticos no muestran cambios en la carne marinada con BAL y GDL, esto concuerda con los datos de pH obtenidos similares en todas las muestras.

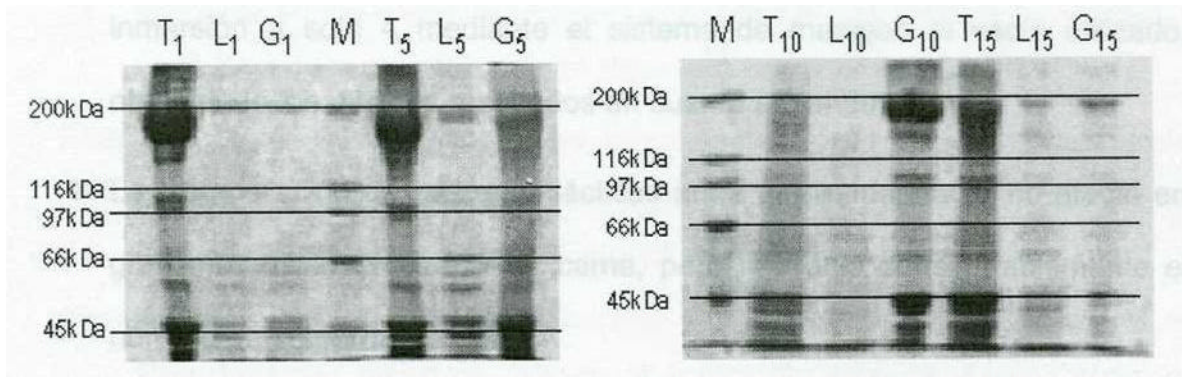
Trabajos previos, han indicado que la fragmentación miofibrilar y la aparición del componente a 30 kDa al parecer está relacionado con el ablandamiento del músculo de bovino postmortem (Olson y col., 1976).

Estudios sobre degradación de proteínas han demostrado que las calpaínas actúan sobre la troponina T, troponina I, tropomiosina,  $\alpha$ -actinina, titina y nebulina (Zeece y col., 1992), pero no hay un efecto de calpaínas sobre miosina y actina (Whipple y Koohmaraie, 1991; Greasery Fritz, 1995).



**Tabla 15. Perfil electroforético de las muestras testigo, marinadas con BAL y GDL.**

Día	TESTIGO		BAL		GPL	
	BANDA	P. M. (KDA)	BANDA	P.M. (KDA)	BANDA	P. M. (KDA)
1	1	257.5	1	262.5	1	206.1
	2	237.8	2	206.7	2	101.3
	3	178.4	3	158.0	3	68.5
	4	146.4	4	84.1	4	62.5
	5	108.9 <sup>a</sup>	5	70.3	5	58.4
	6	101.7	6	63.2	6	45.0
	7	87.6	7	57.8	7	39.8
	8	70.8	8	46.4	8	37.3 <sup>T</sup>
	9	65.1	9	43.5		
	10	59.1	10	40.4 <sup>T</sup>		
	11	45.2	11	37.8 <sup>T</sup>		
	12	42.4				
	13	39.4 <sup>T</sup>				
	14	37.5 <sup>T</sup>				
5	1	267.6	1	259.5	1	218.4
	2	169.9	2	193.4	2	185.7
	3	140.2	3	156.3	3	148.6
	4	126.8	4	105.5	4	104.4
	5	100.8	5	99.4	5	66.7
	6	95.8	6	66.7	6	62.8
	7	80.7	7	60.8	7	56.4
	8	66.5	8	55.9	8	43.6
	9	60.1	9	49.8	9	38.2 <sup>T</sup>
	10	56.8	10	45.8		
	11	44.7	11	42.6		
	12	42.2 <sup>T</sup>	12	39.5		
	13	39.2 <sup>T</sup>	13	37.9 <sup>T</sup>		
10	1	212.8	1	131.6	1	190.5
	2	185.1	2	63.2	2	153.1
	3	163.5	3	52.5	3	103.6
	4	135.7	4	37.4 <sup>T</sup>	4	84.1
	5	104.3	5	31.5	5	67.6
	6	62.2			6	60.7
	7	53.3			7	53.5
	8	35.1 <sup>T</sup>			8	34.1 <sup>T</sup>
	9	31.5			9	27.9
	10	27.4				
15	1	176.7	1	206.3	1	209.5
	2	153.7	2	153.7	2	158.5
	3	133.7	3	140.0	3	111.6
	4	101.5	4	102.9	4	65.2
	5	82.2	5	67.2	5	55.8
	6	66.2	6	55.9	6	38.6 <sup>T</sup>
	7	59.4	7	37.9 <sup>T</sup>	7	31.0
	8	53.3	8	33.5		
	9	34.6 <sup>T</sup>	9	28.7		
	10	27.9				



**Figural4. Electroforogramas de las muestras testigo (T), marinadas con bacterias ácido lácticas (L) y glucono-lactona (G) a los 1, 5,10 y 15 días. La M es el marcador de pesos moleculares.**

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró reducir el tiempo de marinado de la carne de 48 horas por inmersión a solo 4 mediante el sistema de masaje al vacío utilizado, obteniendo los mismos resultados en cuanto a blandura.
- ❖ La incorporación de bacterias lácticas en la carne marinada, no afectó en gran manera la dureza de la carne, pero si redujo considerablemente el número de coliformes totales.
- ❖ El uso de gluconolactona no tuvo efecto en el ablandamiento de la carne, bajo las condiciones experimentales utilizadas.
- ❖ El mejor efecto de la marinación con calcio se dio en los primeros 5 días, y en los siguientes no se alteró su estructura por lo tanto podría ser ocupada también para alargar la vida de anaquel de la carne empacada al vacío y almacenada a 4°C.
- ❖ La marinación con cloruro de calcio podría ser una buena herramienta para producir ablandamiento de la carne de músculos clasificados como duros.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aktas N. y Kaya M., 2001. The influence of marinating with weak organic acids and salts on the intramuscular connective tissue and sensory properties of beef. *European Journal of Food Research and Technology* 213:88-94.
- Alanis-Garcia, E., 1997. Acción de proteasas de *Pseudomonas* spp sobre proteínas contráctiles en un sistema modelo. Tesis Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Alanis-Garcia, E., Lara, P y I. Guerrero, 1999. Proteolityc of four strains of *Pseudomonas* on crude extracts of contractile proteins. *Food Chemistry* 67:45-51.
- AOAC, 1997. American Association of Analytical Chemist Official Methods. CD-ROM.
- Bailey, A.J., y N.D. Light 1989. *Connective tissue in meat and meat producís*. Elsevier applied science, New York, p 95.
- Beltrán, J. A., Jaime, I., Santularia, P., Sañudo, C. A. y Roncales, P. 1997. Effect of stress-induced high post-mortem pH on protease activity and tendemess of beef. *Meat Science* 45: 201-207.
- Berge, Philippe, Per Ertbjerg, Lone Melchior Larsen, Thierry Astruc, Xavier **Vignon and** Anders J. Moller. 2001. Tenderization of beef by lactic acid injected at different times postmortem. *Meat Science*. 57:347-357.
- Brandt, L. A. 2001. Marinades "meat" challenges. *Prepared foods*. January 2001.URL: [http://www.preparedfoods.com/archives/2001/2001\\_01/0101\\_dfch.htm](http://www.preparedfoods.com/archives/2001/2001_01/0101_dfch.htm). Fecha de acceso 19/02/02.
- Carballo, B. y López de Torre, G. 1991. *Manual de bioquímica y tecnología de la carne*, ed. Madrid Vicente. Madrid.

- Claeys.E., Uytterhaegen,L, Buts, B. Y Demeyer, D. 1995. Quantification of beef Myofibrillar proteins and shear forcé of beef. *Journal of Food Science* 56:903-905.
- Cottin, P. Poussard, P., Desmazes, D., Gergescauld.H. Y Ducastaing, A. 1991. Free calcium and calpain I activity: *Biochimica et Biophysica Acta* 1079:139-140.
- Crouse, J.D., Koohmaraie, M. y Dickson, J.S. 1991. Storage and bacterial contamination effects on myofibrillar proteins and shear forcé of beef. *Journal of Food. Science* 56:903-905.
- Chambers, E. y Bowers, J.A. 1981. Sensory characteristics of postmortem papain injected turkey cooked conventionally or by microwaves *Journal of Food. Science* 46:1627.
- Chambers, J.J., Reville, J.W. y Zeece, G.M. 1994. Lysosomal integrity in postmortem bovine skeletal muscle. *Sciences des Aliments*. 14:441-457.
- Dransfield, E. 1994. Optimization of tenderization aging and tenderness. *Meat Science*, 36:105-121.
- Dransfield, E. 1997. Beef-Whatpricafortenderness? *Meat International*, 7:24-26.
- Etherington, D.J. Taylor, M.A.J., and Dransfield E. 1987. Conditioning of meat from different species. Relationship between tenderising and the levéis of cathepsin B, cathepsin L, calpain I,calpain II and beta glucoronidase. *Meat Science*. 20:1-14.
- Fogle, D.R., Plimpton, R.F., Ockerman, H.W., Jarenback, L. y Persson, T. 1982. Tenderization of beef: effect of enzyme, enzyme level, and cooking method. *Journal of Food. Science* 47:1113.

- Forrest, J.C., Aberle E.D., Hedrich H.D., Hudge M.D. y Merkel R.A. 1979. Fundamentos de ciencia de la carne. Ed. Acribia. Zaragoza; España, pp 21-68.
- Furia, T.E. 1983. CRC Handbook of additives. Ed. Thomas E. Furia, Florida USA.
- Gault, N.F.S. 1991. Marinated Meat. Capítulo 5 en: Developments in Meat Science (Eds. Lawrie, R.). Elsevier Applied Science, London. pp. 191-246.
- González, C.B., V. A. Saltito, F. J. Carduza, A.A. Pazos, y J.A. Lasta. 2001. Effect of calcium chloride marination on bovine *Cutaneus trunci* muscle. Meat Science. 54:251-256.
- Grau, F.H., 1983. Microbial growth on fat and lean surfaces of vacuum-packaged chilled beef. Journal of Food Science 48:326-328.
- Ham, R. 1975. Water holding capacity of meat. En: Meat, D.J.A. Colé y R.A. Lawrie (editors). Butterworths, Londres, pp. 321-337.
- Greaser, L.M., Fritz. D.J. 1995. Post-Mortem changes in myofibrillar proteins in relation to meat texture. Ecceamst. 293-303.
- Guerrero, L. I. Pérez\_Chabela M.L., y Ponce, A.E. 2002. Curso práctico de tecnología de carnes y pescado. UAMI. México. Pp. 11-18.
- Guroff, G., 1964. A neutral, calcium - activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. Journal of Biological Chemistry 239: 149.
- Helander IM, A. von Wright and T-M. Mattila-Sandholm. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Elsevier Science Mayo 1997 (vol 8)
- Hildrum, K.I., Solvang, M., Nielsen, B.N., Froystein, T. y Berg, J. 1999. Combined effects of chilling rate, low voltage electrical stimulation and freezing on sensory properties of bovine M. Longissimus dorsi. Meat Science 52 (1):1-7

- Honikel, K.O. and Hamm, R. 1994. Measurement of water -holding capacity and juiciness. In: Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products. Edited by Pearson, A.M. and Dutson, T.R. Advanced in meat research series volume 9. Blackie academic & professional 1994.
- Jaarsveld, F.P., Naudé, R.J., Oelofsen, W. 1997. The effects of Ca ions, EGTA and Storage time on myofibrillar protein degradation, levels of Ca<sup>2+</sup> dependent proteases and cathepsins B, H. L, D of ostrich skeletal muscle. Meat Science 45:517-529.
- Kendall, T.L., Koohmaraie, M., Arbona, J.R., Williams, S.E. and Young. L.L. 1993. Effect of pH and ionic strength on bovine m-calpain and calpastin activity. Journal Animal Science. 71:96-105.
- Khouri, H.E. Vernet, R., Parlati, F., Laflamme, P., Tessier, D.C., Gour-Salin, B., Thomas, D.Y. y Storer, A.C. 1991. Connective tissue distribution patterns in beefenard, Engineering of papain selective alteration of substrate specificity by site-directed mutagenesses. Biochemistry. 30:8929.
- Koohmaraie, M., Babiker, A.S. Merkel, R.A. y Dutson, T.R. 1988. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca<sup>2+</sup> dependent proteases. Journal of Food Science 53:1638.
- Koohmaraie, M. 1992. Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic on bovine skeletal muscle m-calpain. Journal of Animal Science 70:3071-3080.
- Koohmaraie, M., Whipple, G. y Crouse, J.D. 1990. Acceleration of postmortem tenderization in lamb and Brahman-cross beef carcasses through infusion of calcium chloride. Journal of Animal Science 68: 1278.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature. 227:680-685.
- Lawrie, R.A. 1985. Meat Science. Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall. London.

- Lien, R. 2001. Técnicas para Medir la Textura de Carnes Procesadas. Revista Carnetec Nov- Dic 2001. Pp. 36-40.
- Lücke, F. 1996. Indigenous lactic acid bacteria of various food commodities and factors affecting their growth and survival lactic acid bacteria; Current advances in metabolism, genetics and Applications. NATO ASI series, 98: pp. 253-265 Editorial Springer-Verlag Berlin.
- Maruyama, K., Mutakami F., y Ohashi K. 1977. Conectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function. Journal of Biochemistry 82:317-337.
- Masayuki, M., Whiting, A., Taylor, M.A.J., Maciewicz, R. A., y Etherington, D.J. 1987. Degradation of myofibrils of rabbit, chicken, and bovine for cathepsin L. Meat Science. 21: 81-87.
- Morgan, J.B., J.W. Savel., Hale, D.S., Miller, R.K., D.B. Griffin., Cross, H.R., y S.D. Shackelford. 1991a. National beef tenderness survey. Journal of Animal Science 69: 3274-3283.
- Morgan, JB. RK. Miller, Méndez, FM. DS. Hale, and Savell JW. 1991b. Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. Journal of Animal Science 69: 4469-4476.
- Moribo, H., Ertbjerg, P., Anderson, M., Barton, G.P. y Moller, A.J. 1999. Electrical stimulation of pigs: Effects on pH fall, meat quality and Cathepsin B L activity Meat Science 52(2): 179-187.
- Morton, J.D. Bikerstaffe, R., Kent, M.P., Dransfield, E. y Keeley, G.M. 1999. Calpain- calpastatin and toughness in M. longissimus from electrically stimulates lamb and beef carcasses. Meat Science 52 (1): 71-79.
- Murai, S. Arataa T y Inoue, A. 1995. Binding of myosin and its subfragment-1 with antibodies specific to the two heads of the myosin molecule. Journal of Biochemical, 117: 974-979.



- Novikoff, B.A. y Holtzman, E. 1978. Estructura y dinámica celular. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. Segunda edición pp. 132-146.
- Ockerman, H.W., Cahill, V.R., Weiser, H.H., Dacis, CE., y Siefker, J.R. 1969. Comparison of sterile and inoculated beef tissue *Journal of Food Science* 34:93.
- Olson, D.G. F.C. Parrish J.R. and M. H. Stromer. 1976. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during portmortem storage. *Journal of Food Science* 41:1036-1041.
- Olson, D.G. 1991. Curso teórico práctico de tecnología de la carne. Presentado en Iowa State University, Ames, Iowa EE.UU. pp.1-13
- Penny, I.F. 1984. Enzimología de la maduración in: Avances de la ciencia de la carne. Ralston Lawrie. Pp. 149-181. Edit. Acribia. Zaragoza, España.
- Pérez-Alvarez, J.A. 1996. Contribución al estudio objetivo del color en productos cárnicos crudo-curados. Tesis Doctoral. Valencia, España. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pérez-Chabela, M.L., Escalona, H. y Guerrero, I. 1998. Effect of calcium chloride marination on calpain and quality characteristics of meat from chicken, horse, cattle and rabbit. *Meat Science*. 48: 125-134.
- Pérez-Chabela, M.L., 1998. Efecto de las calpains sobre las propiedades fisicoquímicas, ultraestructurales y sensoriales de carne roja. Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Price, J.F. y Schweigert, B.S. 1987. The science of meat and meat producís. W.H. Freeman and Company. San Francisco, E.U. pp 11-77.

- Purchas, R.W. 1990. An assessment of the role of pH differences in determining the relative tenderness of meat from gulls and steers. *Meat Science* 27:129-140.
- Requena, T. y Peláez, C. 1995. Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de ciencia y tecnología de alimentos* 35: (1) 19-44.
- Sancho, R., Jaime, I., Beltrán, A. J., y Roncales P. 1997. Degradation of actin by cathepsins in beef fibers stored at 20° C. *Journal of Muscle Foods* 8:137-146.
- Smulders, F.J.M., Marsh, B.B., Swartz, D. R., Russell, R.L. y Hoenecke, M.E. 1990. Beef tenderness and sarcomere length. *Meat Science*, 28: 349-363.
- Steen, D. Claeys, E. Uytterhaegen, L. De Smet, S. y Demeyer, D. 1997. Early postmortem conditions and the calpains/calpastatin system in relation to tenderness of double-musled beef. *Meat Science*, 45:307-319.
- Stiles, M. and Holzapfel, W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36:1-29.
- Takahashi, K. 1996. Structural weakening of skeletal muscle tissue during post-mortem ageing of meat: The non-enzimatic mechanism of meat tenderization. *Meat Science* 43: 67-80.
- Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F., Koohmaraie, M. And Goll, D.E. 1995. Is Z-disk degradation responsible for post-mortem tenderisation. *Journal of Animal Science*, 73: 1351-1367.
- Thompson, J., 2002. Managing meat tenderness. *Meat Science* 62: 295-308.
- Toldrá, F., y Etherington D. 1988. Examination of cathepsins B, D, H and L activities in dry-cured hams. *Journal Meat Science*. 23:1-6.

- Tornberg, E. 1996. Biophysical aspects of meat tenderness. *Meat Science* 43:175-191.
- Totosaus, A. R. García-Barrientos. M. L. Pérez-Chabela. F. Mijangos. R. M. Cruz-Hernández, e I. Guerrero. 2000a. Beef horse and meat quality: Calorimetry functional and electrophoretical analisis. Proceedings of the 46<sup>th</sup> International congress on meat science and technology. Vol. II, 510-511. Buenos Aires, Argentina.
- Totosaus, A. N. F.S. Gault, y Guerrero, I. 2000b. Dynamic rheological behavior of meat proteins during acid-induced gelation. *International Journal of food properties*. 3 (3), 465-472.
- Uytterhaegen, L. E. Claseys and D. Demeyer, 1994. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *Journal Animal Science*. 72: 1209-1223.
- Velazco, J. 1996. La suavidad y textura de la carne. *Carnetec*. Noviembre. Vol. 3 No. 5.
- Velazco, J. 1999. Los músculos: Características, funcionalidad y su relación con el rendimiento de corte. *Carnetec Nov-Dic* 1999. pp. 42-44.
- Vigoreaux, J.O. 1994. The muscle Z band: lessons on stress management, *Journal of Muscle Research and Cel Motility*. 15:237-255.
- Watanabe, A., Daly, C.C. y Devine CE.1996. The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during aging. *Meat Science* 42:67-78.
- Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Lansdell, J.L., Siragusa, G.R. and Miller, M.F. 1993. Effects of postmortem injection time, inyección level, and concentration of calcium chioride on beef quality traits. *Journal of Animal Science* 71:2965-2974.
- Wheeler, T.L., Shakelford, S.D., Johnson, L.P., Miller, M.F., Miller, R.K., y Koohmaraie, M. 1997a. A comparison of Wamer-Bratzler shear forcé

assessment within and among institutions. *Journal of Animal Science* 75:2423-2432.

Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., and Shackelford, S.D. 1997b. Effect of postmortem injection time and postinjection aging time on the calcium-activated tenderization process in beef. *Journal of Animal Science* 75:2652-2660.

Whipple, G. and Koohmaraie, M. 1991. Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. *Journal of Animal Science* 69:4449-4460.

Zeece, M.G., Woods, T.L., Kee, M.A., Reville, W.J. 1992. Role of proteinases and inhibitors in postmortem muscle protein degradation. *Reciprocal Meat Conference proceedings*. 45:51-61.