



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CAMBIOS EN LA SOLUBILIDAD Y ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

DE LA FRACCIÓN MIOFIBRILAR Y SARCOPLÁSMICA

EN LA CARNE DE OVINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ERIKA ROXANA RODRÍGUEZ RAMOS



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

VOCAL: Profesor: M. en C. Verónica Hernández Briones

SECRETARIO: Profesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

1er. SUPLENTE: Profesor: M. en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

2° SUPLENTE: Profesor: M. en C. Juan Carlos Ramírez Orejel

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO S-132, ÁREA DE BIOQUÍMICA DE MACROMOLÉCULAS, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Edith Ponce Alquicira

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en B. Isadora Martínez Arellano

SUSTENTANTE (S):

Erika Roxana Rodríguez Ramos

“El presente trabajo forma parte del proyecto “Calidad de carne de cordero, industrialización y desarrollo de nuevos productos a nivel comercial “, con clave 2006-45840 financiado por el Fondo sectorial de investigación en materias agrícola, pecuaria, acuacultura, agrobiotecnología y recursos fitogenéticos, SAGARPA-CONACYT.”



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi *Alma máter* proveedora de intelecto, agradezco mi formación científica y profesional siempre bajo un enfoque humano.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa; por dejar desarrollar el presente estudio dentro de sus laboratorios.

A la Dra. Edith Ponce Alquicira todo mi respeto, agradecimiento y admiración; por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo, paciencia y tiempo dedicado al desarrollo del presente, brindándome la oportunidad de retomar la tesis y poder concluir una etapa de mi formación.

A la M. en B. Isadora Martínez Arellano próxima Dra., por su asesoría, sus enseñanzas, por los consejos brindados en la ciencia y en la vida; pero sobre todo porque una mujer tan admirable me brindó su amistad

Al gran equipo de trabajo y amigos en la UAM: Isa, Yeni, Isabel, Luis, Arturito, Juanito, gracias por su apoyo, ayuda y risas, porque sin ustedes nada de esto hubiese sido lo mismo y a Jaime (gracias por prestarme tu biofotómetro).

Al H. Jurado por su tiempo, consejos y aportaciones al presente.

Eternamente mi agradecimiento y amor a mis padres Rosalinda y Vicente por darme la vida, procurarme, formarme, regañarme, consentirme, por sus sacrificios, sus esfuerzos, su trabajo, por dejarme equivocarme y estar detrás mío, por levantarme y enseñarme como salir adelante ante mis caídas, por su amor...gracias al Ser supremo por bendecirme y llegar a sus brazos.



DEDICATORIAS

A mis hermanos Karina o como te gusta *Pamela* y Adrián mejor conocido como Wenceslao en la familia paterna, a ustedes por los consejos, amor incondicional, protección, complicidad, por las travesuras aunque terminaran con suturas, por ser mis compañeros de vida.

A ti precioso, mi amor, por ser mi fuerza y templanza, por lo que representas en mi vida, por el ser único que formamos cuando estamos juntos y ese sentimiento me lo llevaré a la tumba.

A mis abuelitos Mariana y Melquiades - Carmen y Víctor por darme una gran familia, a mis tíos, tías, primos, primas y adjuntos, porque ellos también fueron partícipes en cincelar a esta Erikita.

A mis padrinos Ana María y Fernando por los cuidados, consejos, bromas y cariño, por darme 4 hermanos más Analía, Fernandin, Ari y Ale porque son parte esencial de mi vida por los profesionistas y humanos que son y llegarán a ser.

Al amor que se profesa la familia Ramos-Soto, al trabajo y dedicación.

A mis *hermanos*... porque alguna vez alguien me dijo que los amigos son los hermanos que elegimos:

A la hermosa mariposa que llegó a mi vida... **Lau**, gracias por acercarte hace casi 11 años a la niña que acababa de cambiar de turno y ofrecerle tu amistad, **Richi** por ser mi cómplice, mi guía, mi confidente, mi hermano regañón y consentidor, mi instructor de baile gracias por estos años...los quiero.

A mis maravillosas salvadoras, compañeras de facultad, de desvelos, estudios, risas y fiestas, entrañables amigas. Mi **May** porque eres la unión, el baile, el ejemplo del esfuerzo y las ganas de llegar a terminar una licenciatura.



Kari por la madurez y fuerza con la que encaras la vida gracias por estar a mi lado y dejarme ser parte de tu familia. **Soni** por ser el alma, la bondad, la alegría y porque en los momentos de estrés nos sacabas adelante. **Pau** por tu alegría, honestidad, porque tu dedicación en los proyectos de la carrera nos trajo muchas ventajas frente a nuestros colegas. **Viri** gracias a un personaje que todas extrañamos llegaste, llenaste y sigues llenando nuestra vida. A nuestra **Alicia** porque es sinónimo de risas e infinita alegría gracias por contagiarla. A **Manianne** por los gratos momentos a tu lado. A **Vero** mi cariño y porque ha encontrado la felicidad.

Y a todos aquellos que han quedado en los más recónditos recintos de mi memoria, pero moldearon una parte de mi, GRACIAS.



REACTIVOS EMPLEADOS

REACTIVO	MARCA	PAÍS DE ORIGEN
Acrilamida	Bio-Rad	CA, USA
Ácido acético glacial	J.T.Baker	Edo. México, México
Ácido bórico	J.T.Baker	USA
Ácido clorhídrico	J.T.Baker	Edo. México, México
Ácido fosfórico	J.T.Baker	USA
Ácido tricloroacético	J.T.Baker	NJ, USA
Azul de bromofenol	LKB	Bromma, Suiza
Azul de coomassie R250	LKB	Bromma, Suiza
Caseína grado Hammarsten	Research Organics	Ohio, USA
Cloruro de sodio	J.T.Baker	Edo. México, México
Duodecilsulfato de sodio (SDS)	Bio-Rad	CA, USA
Fosfato de sodio dibásico	J.T.Baker	Edo. México, México
Fosfato de sodio monobásico	J.T.Baker	Edo. México, México
Gelatina	Sigma-Aldrich	Canadá
Glicina	Bio-Rad	CA, USA
Hemoglobina bovina	Sigma	MO, USA
Hidróxido de sodio	J.T.Baker	Edo. México, México
Metanol	J.T.Baker	Edo. México, México
N,N´metilén-bis-acrilamida (bis-acrilamida)	Sigma	MO, USA
Persulfato de amonio	Sigma-Aldrich	USA
Propanol	J.T.Baker	Edo. México, México
Sulfato de cobre pentahidratado	J.T.Baker	Edo. México, México
Tartrato de sodio y potasio	J.T.Baker	Edo. México, México
Tetrametiletiléndiamina (TEMED)	Bio-Rad	CA, USA
Tris	Bio-Rad	CA, USA
Triton® X-100	Sigma-Aldrich	USA
Yoduro de potasio	Reasol	México



RESUMEN

Resumen

La ovinocultura es una actividad pecuaria que ofrece ventajas en la producción de carne sobre la proveniente de otras especies animales, por su rápido crecimiento, fácil adaptación a diversos ambientes y sistemas de producción, desde la rural hasta el tecnificado.

Gracias a las ventajas de esta actividad se logra ofrecer una rápida recuperación de inversión siendo una excelente opción no sólo por su aporte nutrimental sino como base para el desarrollo económico en zonas marginadas. Sin embargo, existen pocos reportes referentes al estudio de los cambios que ocurren durante la refrigeración siendo ésta una operación unitaria muy importante en la conservación de los alimentos. El objetivo del presente estudio fue la evaluación de los cambios en la carne de ovino durante su almacenamiento a 4 °C sobre parámetros fisicoquímicos como son el pH, la solubilidad de las proteínas totales, sarcoplásmicas y miofibrilares así como su degradación mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), para finalmente determinar la actividad proteolítica mediante el uso de zimogramas.

Para ello se seleccionaron 12 animales machos de la raza Pellibuey de un año de edad, alimentados en pastoreo con suplemento; del cual se obtuvo el músculo *Longissimus lumborum* ya que este músculo es el más homogéneo de la canal, en cuanto a propiedades fisicoquímicas. Para cada muestra se realizó por triplicado cada determinación. El tiempo del presente estudio fue de 14 días.

Los resultados de los análisis fisicoquímicos y enzimáticos (pH, solubilidad y actividad proteolítica) indicaron una diferencia a lo largo de los días de estudio. Para el pH se observó un decremento gradual en los días de almacenamiento 1, 3 y 5; sin embargo en el día 14 existió un ligero aumento en los valores atribuible a la acumulación de amoníaco por la desaminación de los aminoácidos básicos.

En cuanto a la actividad proteolítica, las proteasas neutras mostraron una mayor actividad en comparación con las proteasas ácidas siendo nuevamente el día 14 aquel en el que residió la mayor actividad para las proteasas neutras.

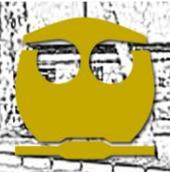


Con base a las actividades proteolíticas de los dos sistemas enzimáticos estudiados podrían ser el resultado de una acción sinérgica.

En la solubilidad de las proteínas, se encontró que, durante el periodo de refrigeración existió una mayor solubilidad de las proteínas miofibrilares en comparación con las proteínas sarcoplásmicas. Los días en los que se presentó la mayor solubilidad de la fracción sarcoplásmica fueron 3 y 5; en cuanto a la fracción miofibrilar la mayor solubilidad corresponde a los días 5 y 14. Al observar el comportamiento en la solubilidad de las proteínas miofibrilares se encontró que al aumentar los valores de pH la solubilidad de dichas proteínas aumentó debido a que se encuentran cargadas negativamente incrementando las fuerzas repulsivas entre las miofibrillas que conlleva a la hinchazón de éstas, permitiendo una mayor interacción con el agua y por lo tanto se podría hacer referencia a una mayor capacidad de retención de agua (CRA).

El análisis de las fracciones proteicas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), los principales constituyentes de la miofibrilla, actina y miosina, muestran la poca o nula degradación a través de los días de almacenamiento a la temperatura de refrigeración del estudio 4 °C. Por otra parte, se encontraron bandas que podrían estar asociadas a la degradación de las proteínas clave en la terneza como son la Desmina y la Troponina-T. En cuanto a la electroforesis en condiciones nativas empleada para la fracción sarcoplásmica, bandas en un rango de 70 a 6 kDa fueron observadas en el gel correspondiente. Al comparar los pesos moleculares se lograron identificar 8 proteínas. Finalmente en los zimogramas la aparición de 2 bandas (con pesos de 25 y 20 kDa) biológicamente activas, fueron detectadas al emplear en dicha técnica gelatina como sustrato.

Por lo tanto, el seguimiento de los procesos y cambios ocurridos en el proceso *postmortem* que llevan a la transformación del músculo en carne, juegan un rol sumamente importante para dar las características propias de la calidad de la carne, lo que se verá reflejado en la satisfacción y aceptación del consumidor, así como su apertura en el mercado.

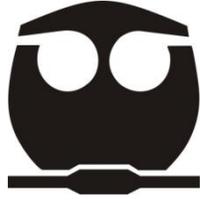


ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	IV
Dedicatorias.....	V
Reactivos empleados.....	VII
Resumen.....	VIII
Índice general.....	X
Capítulo 1. Introducción	2
1.1 Situación actual de la carne de ovino en el mercado mundial y en México	2
1.2 Características generales de la carne	7
1.2.1 Definición de carne.....	7
1.2.2 Composición química	7
1.2.3 Tejido muscular	8
1.2.4 Estructura del tejido muscular esquelético.....	9
1.2.4.1 Sistema contráctil.....	11
1.2.4.2 Proteínas contráctiles y otras proteínas que componen el tejido muscular esquelético.....	13
1.2.5 Conversión del músculo a carne	16
1.2.6 Enzimas endógenas involucradas en el ablandamiento de la carne	17
1.2.7 Solubilidad de las proteínas.....	18
1.2.8 pH en la carne	18
Capítulo 2. Justificación	22
Capítulo 3. Hipótesis	24
Capítulo 4. Objetivo general	26
4.1 Objetivos particulares.....	26
Capítulo 5. Metodología	28
5.1 Obtención y preparación de la muestra.....	29
5.1.1 Condiciones de almacén de las muestras	29
5.2 pH.....	29
5.3 Solubilidad	29



5.4 Extracción de proteínas miofibrilares	30
5.5 Actividad proteolítica	30
5.5.1 Obtención del extracto enzimático.....	31
5.5.2 Evaluación proteolítica de proteasas neutras y ácidas	31
5.6 Liofilización de las proteínas extraídas.....	32
5.7 Electroforesis (SDS-PAGE)	32
5.8 Zimogramas para la detección <i>in situ</i> de la actividad de las proteasas	33
5.9 Análisis estadístico	34
Capítulo 6. Resultados y Discusión	36
6.1 Actividad enzimática y pH	36
6.2 Solubilidad y pH.....	41
6.3 Electroforesis	45
6.4 Zimografía.....	53
Capítulo 7. Conclusiones.....	57
Bibliografía	59
Anexos	
Anexo A	64
Anexo B	67
Anexo C	70



CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1.1 Situación actual de la carne de ovino en el mercado mundial y en México

A nivel mundial, los pequeños rumiantes se encuentran en menor población que la especie bovina (Figura 1.1). Las principales poblaciones ovinas se encuentran en primer lugar, China; Australia y Nueva Zelanda; el mundo islámico desde Marruecos hasta la India; el noroeste de Europa; el sur de Europa, donde la carne de ovino con canales ligeras constituyen un producto secundario de la producción de leche de oveja, el sur de Rusia y Kazajstán, y Patagonia (Figura 1.2).



Figura 1.1. Distribución mundial de pequeños rumiantes



Figura 1.2. Distribución mundial del ganado ovino (Animal Production and Health Division FAO, 2007)

El mercado mundial de la carne se ha visto afectado por las inquietudes acerca de las enfermedades de los animales. La reacción de los consumidores a la gripe aviar, junto con las restricciones impuestas a las exportaciones de la carne, así como la Encefalopatía Espongiforme bovina en Inglaterra, Europa, Canadá y Estados Unidos de América, aunado al encarecimiento de granos forrajeros y oleaginosos necesarios para la alimentación y la disminución de los espacios destinados al forraje, son unas de las principales causas de este desequilibrio mundial (González, 2012).

En México tradicionalmente los pequeños rumiantes han estado en manos de los productores más marginados, de bajos recursos económicos y alejados de los beneficios de la asistencia técnica y la tecnología. Sin embargo, en la producción ovina, cada vez es más frecuente el flujo de capital financiero, dando origen a una producción pecuaria empresarial muy promisoría. México posee el mayor número de ovejas de Centroamérica y la mayor parte del continente americano (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Distribución mundial del ganado ovino (Animal Production and Health Division FAO, 2007)

Region/Pais	LGA	LGH	LGT	MIA	MIH	MIT	MRA	MRH	MRT	OTRA	URBANO	FAOSTAT 2005
AMERICA CENTRAL												
Belize		40						1 265		4 960		6 265
Costa Rica		0			120	0	0	590	20	1 970		2 700
El Salvador					100		170	570	30	4 220	10	5 100
Guatemala	160	360	1 160	300	7 110	10	17 350	59 890	50 520	122 980	160	260 000
Honduras	40	520	40	0	340		400	4 130	430	8 970	0	14 870
México	1 293 260	700	425 380	252 070	430	541 430	658 880	240 750	560 800	2 838 940	7 130	6 819 770
Nicaragua	0	80		0	0		770	1 500	80	2 070	0	4 500
CARIBE												
Antigua y Barbados	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	19 000
Bahamas	420							0		5 740	0	6 500
Barbados	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	10 800
Islas vírgenes británicas	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6 100
Cuba	17 590	11 160		80 170	789 770		336 980	847 200	21 660	289 350	6 120	2 400 000
Dominica	0	7 600						0		0		7 600
República Dominicana	830	0		16 530	5 140	7 120	7 460	43 210	5 670	37 010	30	123 000
Granada	0							0		13 200		13 200
Guadalupe		2 910					0	240	0	0		3 150
Haiti	750	0	50	4 230	2 690	0	37 000	94 510	1 880	12 390		153 500
Jamaica	0			10	20		0	180	0	1 070	0	1 280
Martinique	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	18 000
Montserrat	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4 700
Antillas	0						4 340			4 660		9 000
Puerto Rico	0			0	190		230	12 030	0	3 550	0	16 000
Saint Kitts y Nevis	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	12 500

LGA Livestock only - arid/semi-arid tropics and subtropics

LGH Livestock only - humid/subhumid tropics and subtropics

LGT Livestock only - temperate and tropical highlands

MRA Mixed rainfed - arid/semi-arid tropics and subtropics

MRH Mixed rainfed - humid/subhumid tropics and subtropics

MIA Mixed irrigated - arid/semi-arid tropics and subtropics

MIH Mixed irrigated - humid/subhumid tropics and subtropics

MIT Mixed irrigated - temperate and tropical highlands

MRT Mixed rainfed - temperate and tropical highlands



Cambios en la solubilidad y actividad proteolítica de la fracción miofibrilar y sarcoplásmica en la carne de ovino

1. INTRODUCCION



Específicamente para México, el sector cárnico en general, es decir la carne de bovino, porcino, caprino, ovino y aves, ha mostrado una tasa media de crecimiento anual de 3.01%, pasando de las 4,359,457 toneladas producidas en el año 2000 a 5,526,809 toneladas producidas en el año 2008 (SAGARPA, 2008). Durante el 2009 se alcanzó una producción de 96.6 mil toneladas. En la Figura 1.3 se muestra la conformación porcentual en la producción en México.

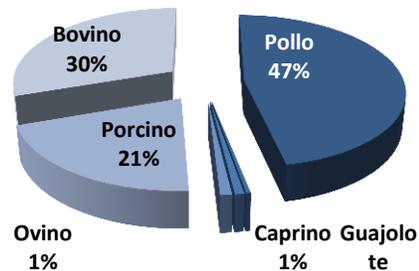
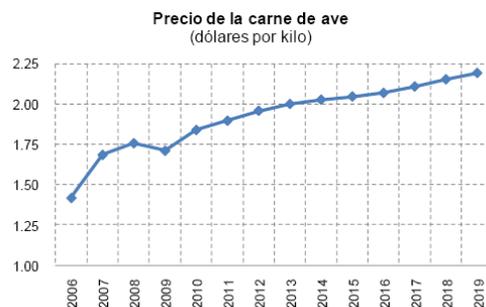


Figura 1.3. Conformación porcentual de la producción de carnes en México (SAGARPA, 2010)

Se destacan los siguientes datos de las distintas especies productoras de carne:

Aves: el sector con mayor dinamismo; muestra 4.4% de crecimiento promedio anual; representa más del 40% del total de la carne producida en el país. En el 2011 se proyectaron 1.65 millones de aves sacrificadas y hacia el 2020 se proyectan 1.8 millones de aves sacrificadas; en cuanto al consumo per cápita de pollo se espera un incremento alrededor de 32 kg así como en el precio de esta carne (Gráfica 1.1).



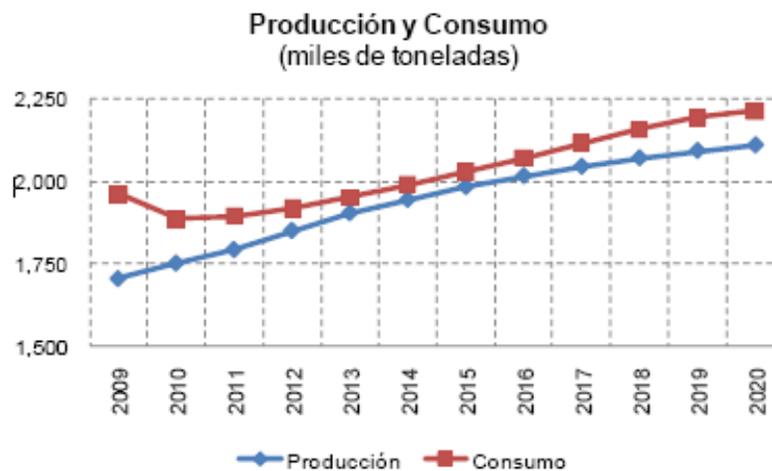
Gráfica 1.1. Perspectiva nacional del precio de la carne de ave (SFA-SAGARPA, 2011).

Bovino: su tasa de crecimiento anual es de 2.13%; la producción pasó de 1,408,626 toneladas en el año 2000 a 1,667,136 en 2008. Con respecto al consumo se proyectó en el año 2011 un consumo aproximado de 1.9 mtm (miles de toneladas métricas) y en el 2020 se estima que se alcance 2.2 mtm. (Tabla 1.2 y Gráfica 1.2)



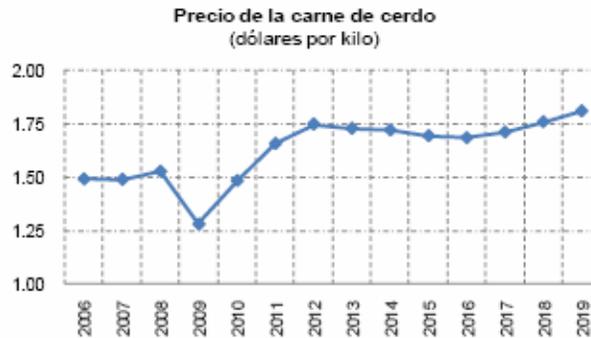
Tabla 1.2. Producción y consumo de carne de bovino en México (SFA-SAGARPA, 2011)

Año	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Carne	Miles de toneladas métricas (MTM)											
Producción	1705	1751.2	1792.7	1850	1903.3	1943.5	1982.1	2015	2043.5	2069.1	2091	2107.9
Importaciones	296.7	220.1	189.3	156.6	136.5	134.7	134.3	143.5	160.1	176.5	190.1	192.2
Consumo doméstico	1960.8	1885.3	1894	1918.3	1951.1	1989.6	2027.8	2070	2115.2	2157.4	2193.1	2212.1
Exportaciones	40.9	86	88	88	88.7	88.7	88.7	88.6	88.4	88.2	88	88



Gráfica 1.2. Perspectiva nacional de carne de bovino (SFA-SAGARPA, 2011)

Porcino: única especie que mostró una disminución; la cifra reportada de producción en el año 2000 fue de 1,290,955 toneladas mientras que en 2008 dicha cifra fue de 1,160,677 toneladas. En Estados Unidos se estima que la producción de carne de cerdo disminuya ligeramente en 2012 debido al incremento en el costo de producción. Durante los diez años próximos se prevé que los precios del cerdo incrementen (Gráfica 1.3).



Gráfica 1.3. Perspectiva nacional del precio de la carne de cerdo (SFA-SAGARPA, 2011)

Ovino: la especie con el mayor crecimiento (5.51%), pasando de 38,760 toneladas producidas en el año 2000, a 51,275 toneladas reportadas en el 2008.

Caprino: su crecimiento promedio anual es de 1.34%, con 38,760 toneladas producidas reportadas en el año 2000, mientras que en el 2008 se reportó una producción de 43,128 toneladas. En México tradicionalmente los pequeños rumiantes han estado en manos de los productores más marginados, de bajos recursos económicos y alejados de los beneficios de la asistencia técnica y la tecnología. Sin embargo, en la producción ovina, cada vez es más frecuente el flujo de capital financiero, dando origen a una producción pecuaria empresarial muy promisoriosa. Durante el 2009 entre la ovinocultura y la caprinocultura se alcanzó una producción de 53 y 43 miles de toneladas respectivamente, dicha expansión se debió principalmente por la producción de carne de ovino (TMCA de 5.7%, [Figura 1.4](#))

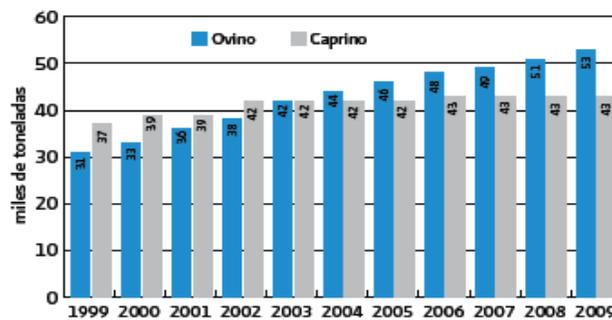


Figura 1.4. Producción de carnes de ovino y caprino en México (SAGARPA, 2010).



1.2 Características generales de la carne

1.2.1 Definición de carne

Si se busca una definición de carne se podrá encontrar que existen diferentes criterios para llegar a ella, lo cual podría depender del objetivo de las mismas; según la NORMA Oficial Mexicana NOM-009-Z00-1994; se entiende como carne a *“La estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano”*.

Así mismo, se podría definir como carne al resultado de la transformación del tejido muscular de animales sanos, a través de una serie de procesos fisicoquímicos y bioquímicos en la que se adquieren características señoriales apropiadas para su consumo, acorde con las costumbres propias de los habitantes de una región.

1.2.2 Composición química

La carne contiene alrededor de un 70-80% de agua, 15-22% de proteína, 1-2% carbohidratos y 1-15% de lípidos (Pearson y Young, 1989).

En todo el mundo animal la función muscular es similar, es decir, hacer posible la locomoción. Sin embargo, hay diferencias entre especies y, por supuesto entre la localización anatómica de los músculos, especialmente cuando la función muscular es diferente (Fennema, 2000). A continuación se muestra en la **Tabla 1.3** la composición general del tejido muscular de varias especies.



Tabla 1.3. Composición general del tejido muscular (Foegeding, Lainer y Hultin, 2000).

Especie	Agua %	Proteína %	Lípidos %	Cenizas %	Comp. nitrogenados no proteicos %
Vacuno	70-73	20-22	4-8	1	
Porcino	68-70	19-20	9-11	1.4	
Pollos	73.7	20-23	4.7	1	1.2
Ovino	70-75	20-22	4-10	1	3.5
Peces	66-81	17-22	0.2-25	1.2-1.3	1.2-5.5

1.2.3 Tejido muscular

Los músculos animales se dividen en tres categorías: músculo liso, músculo cardiaco y músculo esquelético (Figura 1.5). El primero posee la organización estructural más simple de los tres tipos; la célula de la musculatura lisa posee un núcleo en su posición central y miofibrillas ópticamente homogéneas, de modo que no presentan estriamiento transversal. Su funcionamiento es involuntario y se encuentra localizado en los sistemas gastrointestinal, respiratorio y cardiovascular formando paredes de vasos sanguíneos.

El segundo se encuentra en el corazón y en la raíz de los grandes vasos sanguíneos que se unen al corazón, posee un número de mitocondrias considerablemente mayor al músculo esquelético, es involuntario y estriado. El tercero actúa bajo control nervioso voluntario y constituye del 40 al 65% del peso de la canal (Ponce, 2006).

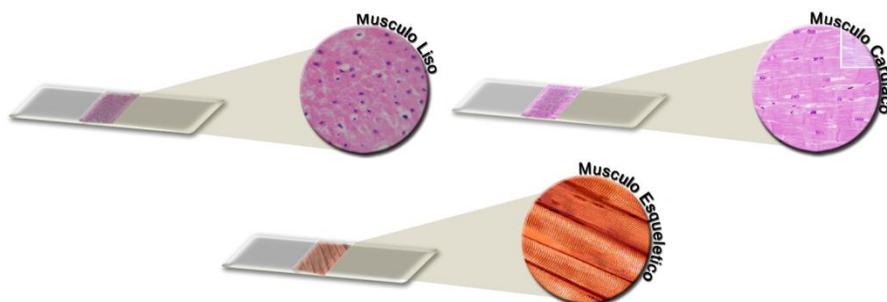


Figura 1.5. Tipos de músculos (<http://scioly.org>)



1.2.4 Estructura del tejido muscular esquelético

El tejido muscular esquelético forma los componentes activos del aparato locomotor, cuya principal función es la de transformar la energía química en energía cinética. El tejido muscular esquelético junto a cantidades variables de otros tejidos, es el componente principal de la carne (Barberá y López, 2006). Las unidades estructurales son las células musculares estriadas, largas y multinucleadas, también llamadas fibras musculares que se encuentran en un rango de 10 a 100 μm de diámetro (Lee, Joo y Ryu, 2010); éstas se encuentran ordenadas en forma paralela, y son causantes del aspecto poliédrico irregular que se observa en los cortes transversales del músculo esquelético (Figura 1.6), a su vez se encuentran rodeadas de una envoltura de tejido conectivo o epimisio.

Capas más finas de este mismo tejido (perimisio) separan los grupos de fibras, formando haces musculares o fascículos en cuya intersección se alojan tejidos grasos, nervios, tendones y vasos sanguíneos (Mendoza, Quiroz y Pacheco, 2004). Al mismo tiempo cada una de las fibras se encuentra a su vez separadas de las demás de un mismo haz por otra envoltura más fina (endomisio). La membrana celular y el citoplasma de las fibras musculares reciben el nombre de sarcolema y sarcoplasma, respectivamente.

El citoplasma de las fibras musculares (sarcoplasma) está constituido por una sustancia coloidal intracelular en la cual interviene mayoritariamente en su composición el agua ya que ésta representa del 75-80%, pero también se encuentran gránulos de glucógeno, gotas de lípidos, ribosomas, numerosas proteínas, compuestos nitrogenados no proteicos y numerosos constituyentes inorgánicos. Suspendidas en el sarcoplasma se encuentran

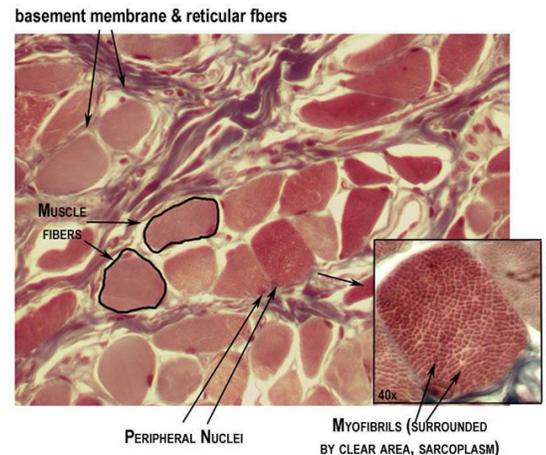


Figura 1.6. Imagen en la que muestra un corte transversal del músculo esquelético (http://missinglink.ucsf.edu/lm/IDS_101_histo_re source/nerves_muscle.html)



las miofibrillas que conforman el aparato contráctil, ordenadas longitudinalmente, rodeadas por una red fina de microtúbulos denominada retículo sarcoplásmico. El retículo sarcoplásmico es un sistema membranoso de túbulos y cisternas que contienen Ca^{2+} (Figura 1.7).

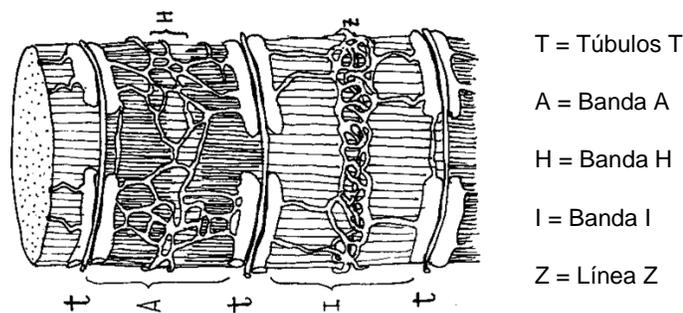


Figura 1.7. Representación esquemática del retículo sarcoplásmico y Túbulos T (Universidad Católica de Chile, 2011).

El color del tejido muscular estriado es heterogéneo, incluso dentro de un mismo músculo, debido a que existen varios tipos de fibras musculares, las cuales están distribuidas de forma irregular en función de la respuesta a un estímulo nervioso. Se clasifican como: fibras tipo I o de contracción lenta, fibras tipo II A o de contracción oxidativa rápida y fibras tipo II B o de contracción glucolítica rápida. Las fibras tipo I son rojas debido a que contienen mioglobina y un gran número de mitocondrias, su metabolismo es aerobio en el que se requieren grandes cantidades de oxígeno para producir energía.

Las fibras rojas se contraen lentamente, pero mantienen una contracción sostenida durante un largo periodo. A diferencia de las fibras tipo II B o blancas que carecen de mioglobina, tienen pocas mitocondrias y poseen una gran proporción de enzimas glucolíticas, por lo que están adaptadas a un metabolismo anaerobio. En este sentido las fibras blancas presentan una rápida respuesta aunque el tiempo de contracción es corto (Ponce, 2006).

El tejido conectivo está formado principalmente por fibras de colágeno y elastina, y entre ellas se encuentra inmerso el tejido adiposo, conformado por adipositos. (Figura 1.8)

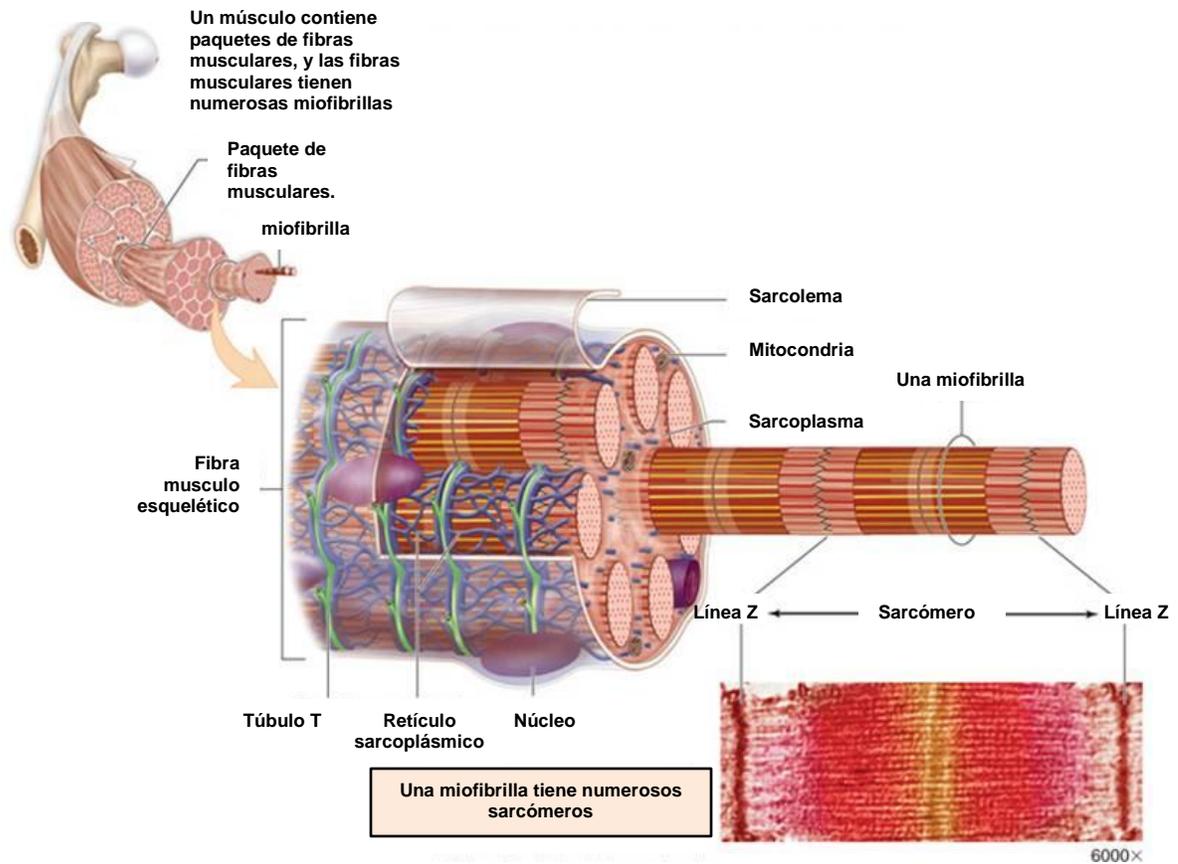


Figura 1.8. Representación esquemática de la fibra muscular esquelética (Mader, S. 2008).

1.2.4.1 Sistema contráctil

El sistema contráctil está constituido por las miofibrillas, tienen la longitud de la fibra muscular y un diámetro de 1 μm y, están cubiertas por el retículo sarcoplásmico. Una característica peculiar de las fotografías de las secciones longitudinales de músculos esqueléticos cuando son observadas al microscopio es la presencia alternada de bandas claras y bandas oscuras que dan la ya conocida apariencia estriada del músculo.



Estas bandas son el resultado del traslape de dos tipos de filamentos, que no sólo difieren en dimensiones (gruesos y delgados), sino en composición, propiedades y situación en el sarcómero. La sucesión de los filamentos gruesos es densa y es el responsable de la aparición de la banda A; la cual presenta doble refringencia (anisotrópica) bajo la luz polarizada. Los filamentos delgados se presentan en la zona menos densa y se le denomina banda I; ópticamente son bandas monorrefringentes describiéndose como isótropas. En el centro de la banda A se encuentra una zona menos densa llamada zona H, en cuya mitad se encuentra a su vez una línea oscura conocida como línea M. La banda I está dividida en dos por una línea oscura llamada línea Z (Figura 1.9).

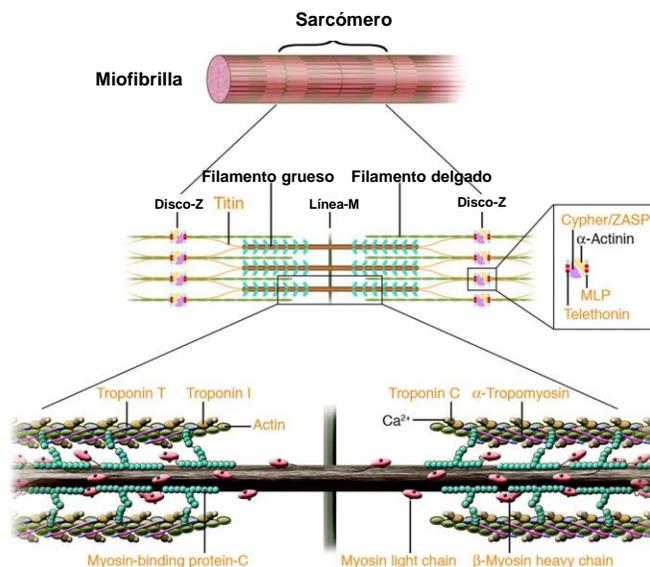


Figura 1.9. Representación esquemática del sarcómero (Morita H. y Col., 2005).

El sarcómero es una unidad de contracción y se define como la región entre dos líneas Z adyacentes que se repite a lo largo de la miofibrilla. Gracias al análisis de la organización estructural del sarcómero permite la comprensión del mecanismo de contracción de las fibras musculares estriadas, el cual se basa en el deslizamiento de los filamentos gruesos sobre los delgados. (Ponce, 2006).

Los filamentos gruesos están constituidos principalmente por miosina, miden 15 nm de diámetro y 1.6 μm de largo; se localizan a lo largo de la banda A y están anclados en su centro a la línea M. Los filamentos delgados (de 8 nm de diámetro y 1.0 μm de largo) corresponden a los filamentos de actina. Están anclados a la línea Z formando la banda I, para finalmente penetrar la banda A donde corren paralelos a los filamentos gruesos hasta el inicio de la banda H, que sólo contiene filamentos gruesos.

Los filamentos gruesos y delgados se traslapan entre sí por el establecimiento de puentes cruzados entre la actina y la miosina formando el complejo actomiosina, con la consecuente reducción en la distancia en dos líneas Z. El tamaño del sarcómero varía desde 1 500 a 2 300 nm según se encuentre el estado de contracción (Figura 1.10).

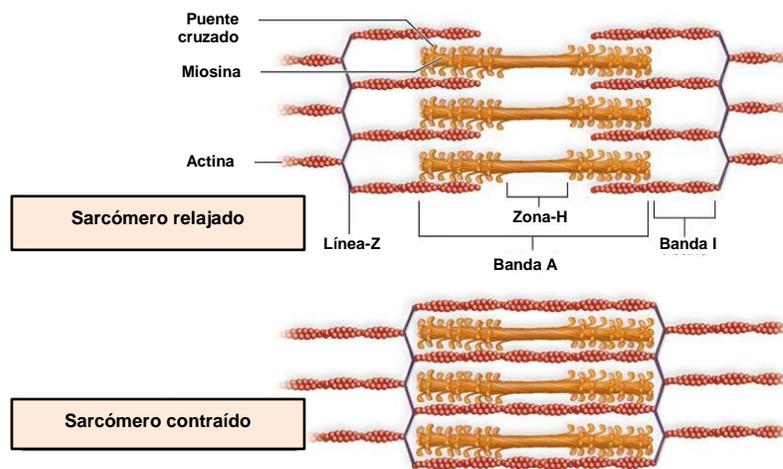


Figura 1.10. Representación esquemática en la que se compara el cambio en la longitud del sarcómero durante el proceso de relajación (A) y contracción (B). (Mader, S. 2008)

1.2.4.2 Proteínas contráctiles y otras proteínas que componen el tejido muscular esquelético

El músculo esquelético tiene como componentes tres grupos de proteínas clasificados por la solubilidad y su ubicación en el tejido muscular. Está representado por las proteínas



sarcoplásmicas, miofibrilares y del estroma, que constituyen aproximadamente el 35, 60 y 15% respectivamente (Lametsch y Bendixen, 2001).

Proteínas de la fracción sarcoplásmica o solubles. Tienen como componentes al menos 500 proteínas individuales, incluyendo mayormente enzimas metabólicas, las cuales son solubles en agua o en soluciones salinas diluidas (fuerza iónica $\rho = 0-0.2$) (Pearson y Young, 1989). La mayoría de las proteínas sarcoplásmicas poseen una estructura globular con una alta densidad de cadenas polares expuestas y cadenas laterales cargadas. También en este grupo se encuentran las catepsinas, la creatinquinasa, mioglobina, citocromos y flavoproteínas. La mioglobina, una proteína de 17 kDa, es probablemente el miembro mejor conocido de esta superfamilia ya que juega un importante papel como la principal proteína de pigmentación en la carne (Figura 1.11).

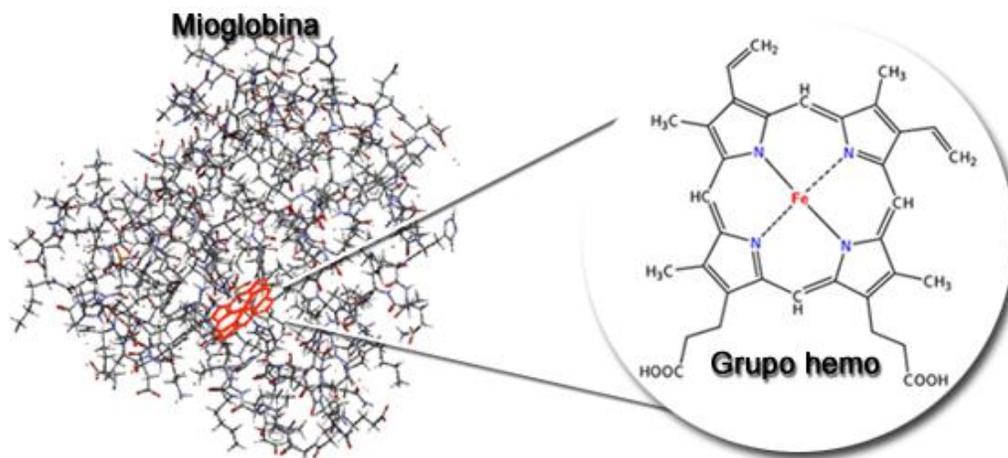


Figura 1.11. Estructura molecular de la Mioglobina con su correspondiente grupo Hemo. (Adaptado de Harada, Y. y cols., 2009).

Proteínas miofibrilares o contráctiles. Son las que conforman estructuralmente el tejido muscular y, además, las que transforman la energía química en mecánica durante la contracción y relajación de los distintos músculos. Son las proteínas más abundantes de la fracción que conforma la miofibrilla, se componen de pocas proteínas, pero el número

total bien puede ser de cien (Lametsch y Bendixen, 2001), sus principales componentes son la miosina, la actina, la troponina y la actinina. Este grupo de proteínas pueden ser solubles en soluciones salinas concentradas ($>2\%$ o $\Gamma = 0-0.2$).

La miosina representa un porcentaje alto de las proteínas miofibrilares, tiene una estructura helicoidal con 55% de α -hélice, integrada por dos cadenas fibrosas rígidas semejantes enrolladas entre sí, que terminan en una doble cabeza constituida a su vez por cuatro cadenas polipeptídicas. Tienen actividad enzimática para hidrolizar ATP, que se favorece por la presencia de calcio y magnesio.

La actina es la segunda proteína miofibrilar de importancia que se presenta dos formas: la G (actina globular monomérica) y la F (actina fibrosa).

El complejo de actomiosina se disocia en presencia de ATP y de iones magnesio, esta molécula está directamente relacionada con el fenómeno de la contracción y de relajación muscular.

Proteínas del estroma o insolubles. Solubles únicamente en soluciones concentradas ácidas o alcalinas pero también pueden ser solubilizadas aplicando un tratamiento térmico y humedad en ausencia de compuestos ácidos o alcalinos. Este grupo es muy abundante de polipéptidos; conforman el tejido conectivo fuerte de los tendones, la piel, el hueso y las capas más rígidas que envuelven y soportan los músculos, como el endomisio, el perimisio y el epimisio. En conjunto este grupo de compuestos representa aproximadamente 35% de las proteínas totales de un animal vivo, pero en cuanto a tejido muscular solo equivale al 3%.

El colágeno que es la proteína más abundante, está constituido por diversas fracciones: contiene 30% de glicina y 25% de prolina e hidroxiprolina; cuanto más abundante en estos aminoácidos, más rígido y resistente es el colágeno (Cheftel y Cheftel, 1992). Es deficiente en aminoácidos indispensables, principalmente lisina y triptófano. Posee un monómero llamado, tropocolágeno.



1.2.5 Conversión de músculo a carne

La conversión del músculo es un proceso sumamente complejo dónde todos los mecanismos responsables de la calidad de la carne pueden ser mutuamente dependientes. La exanguinación marca el inicio de una serie de cambios *post-mortem* en el músculo (Ponce y Quintero, 2006). El proceso posterior a la muerte lleva a la transformación gradual de músculo a carne, que se caracteriza por tres etapas: a) *pre-rigor* el músculo aún es elástico, b) *rigor mortis* rigidez sostenida y es inextensible y c) *post-rigor* recuperación de la elasticidad y formación de compuestos precursores de la carne (Figura 1.12).

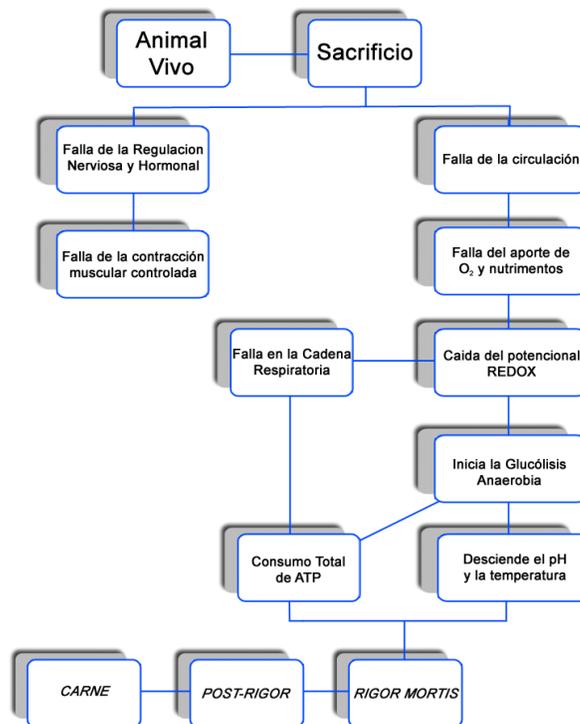


Figura 1.12. Diagrama de los principales cambios *postmortem* (Ponce, A. 2006).



El proceso de acondicionamiento es un proceso natural en el cual la carne es almacenada *post-rigor*. El ablandamiento podría ser atribuido a dos tipos de procesos: cambios en los componentes del tejido conectivo de la carne o debilitamiento de las miofibrillas.

Se ha sugerido que el acondicionamiento tiene lugar en dos fases. Hay una primera fase rápida causada por cambios en el componente miofibrilar y una segunda fase más lenta provocada por el debilitamiento estructural del tejido conectivo intramuscular (Nishimura y col, 1998). Sin embargo, de estas dos, generalmente se considera que los cambios en el componente miofibrilar son más importantes y evidentes en comparación con la ruptura de los enlaces cruzados del colágeno apreciándose estos pequeños cambios estructurales al microscopio electrónico después de tiempos de maduración prolongados.

(Tablas 1.4 y 1.5)

Tabla 1.4. Ritmo de ablandamiento de carnes de diferentes especies (Warris, P.D. 2003)

Especie	Días a 1 °C para alcanzar un 80% de la terneza máxima
Vacuno	10.0
Conejo	9.5
Oveja	7.7
Cerdo	4.2
Pollo	0.3

Tabla 1.5. Tiempos de acondicionamiento recomendado para carne de cerdo, cordero y ternera (Warris, P.D. 2003)

Especie	Días
Cerdo	4-10
Cordero	7-14
Ternera	10-21

1.2.6 Enzimas endógenas involucradas en el ablandamiento de la carne

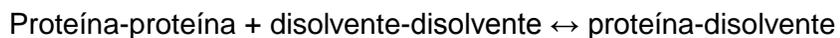
Se ha observado que después de 24 horas la suavidad de la carne aumenta gracias a la degradación de las estructuras musculares. La degradación proteolítica de las miofibrillas tiene cierta influencia en la suavidad de la carne en comparación con proteínas sarcoplásmicas (Lametsch y col, 2003). Esta degradación es producida por las proteínas proteolíticas: calpainas (m-calpainas y μ -calpainas) y las proteasas lisosomales.



Sin embargo, los científicos en la ciencia de la carne han trabajado en varias teorías: unos proponen que las calpainas son las únicas responsables, otras que son los dos sistemas los que trabajan y un tercer grupo que propone un proceso multienzimático que contiene estos dos sistemas, además de otros sistemas como son los proteosomas y las caspasas (Ouali, 2006).

1.2.7 Solubilidad de las proteínas

La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y proteína-disolvente:



Las interacciones iónicas e hidrofóbicas influyen de forma más destacada en la solubilidad de las proteínas; puesto que las interacciones hidrofóbicas promueven la asociación proteína-proteína y disminuyen la solubilidad, en tanto que las iónicas promueven las interacciones proteína-agua y aumentan la solubilidad (Fennema, 2000).

1.2.8 pH en la carne

A la muerte del animal el aporte de oxígeno al músculo cesa debido al fallo en el sistema circulatorio sanguíneo por lo que cualquier tipo de metabolismo subsiguiente debe ser anaeróbico, de tal manera que, el ATP sólo podrá regenerarse a través de la lisis del glucógeno y posterior glicolisis ya que la descarboxilación y la fosforilación oxidativa no pueden continuar funcionando.

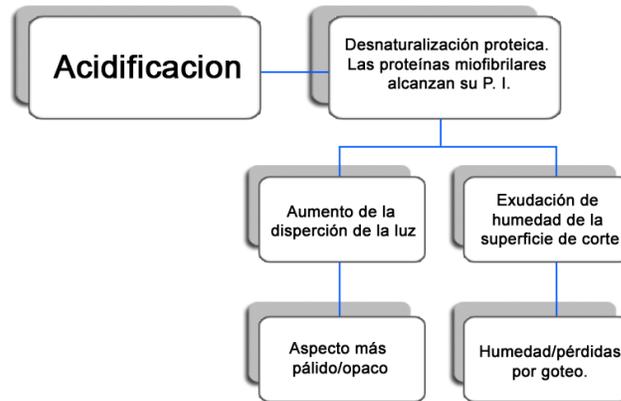
El metabolismo anaerobio del glucógeno implica que se comience a generar ácido láctico. Dado que éste no puede ya ser retirado por el sistema sanguíneo, el músculo se acidifica gradualmente. El pH final alcanzado varía entre los diferentes músculos, por ejemplo en un músculo como el *Longissimus dorsi* del vacuno, de un animal bien alimentado y no estresado, el valor típico de pH caerá desde aproximadamente 7.2 hasta más o menos 5.5; en algunos músculos rojos de canales de porcino el pH final puede ser cercano a 6.0.



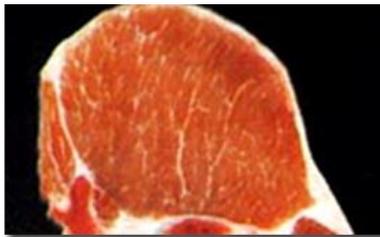
El proceso de acidificación dura normalmente 4-5 h en porcino, 12-24 h en ovino y 15-36 h en vacuno (Drandsfield, 1994). El pH final es inversamente proporcional a la concentración de lactato y la concentración de glucógeno se convierte en limitante para este pH final.

Muchos autores han indicado que las mediciones del pH final pueden estar relacionadas con muchos atributos de calidad como el color, la capacidad de retención de agua (CRA) y la suavidad.

Al descender el pH las proteínas tienden a desnaturalizarse. Esto conduce a una reducción en su capacidad de retener agua. Además, las proteínas miofibrilares, miosina y actina, alcanzan su punto isoeléctrico tendiendo a perder el agua unida a ellas. Estos dos fenómenos conducen a la exudación de fluidos de las fibras musculares produciendo pérdidas de peso. El cambio en las proteínas aumenta las propiedades de dispersión de la luz de los elementos contráctiles de la fibra muscular (Figura 1.13).



Carne PSE
(Pálida, Suave y Exudada)

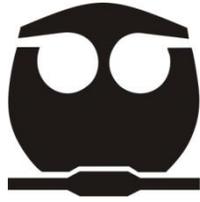


Carne Normal



Carne DFD
(Oscura, Firme y Seca)

Figura 1.13. Consecuencias de la acidificación del músculo sobre el aspecto y la retención de agua (Chambers, G. P. y Grandin T., 2001).



CAPITULO 2

JUSTIFICACIÓN



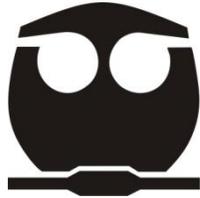
JUSTIFICACIÓN

Entre las actividades pecuarias, la ovinocultura ofrece ventajas en la producción de carne sobre la proveniente de otras especies animales, por su rápido crecimiento, fácil adaptación a diversos ambientes y sistemas de producción, desde la rural hasta el tecnificado así como una rápida recuperación de la inversión siendo una excelente opción no sólo por su aporte nutrimental sino como base para el desarrollo económico en zonas marginadas. Actualmente la ovinocultura nacional presenta una difícil problemática, ya que cada vez es más difícil satisfacer la mayor demanda de carne de ovino en México, en gran parte por los modelos productivos prevalecientes, en su gran mayoría, rebaños de traspatio con índices de producción muy deficientes.

Muchas de las características en la calidad de la carne, como la textura, ternera, jugosidad, así como su comportamiento ante los diversos sistemas de cocción y conservación, están ligados a la estructura del sistema proteico muscular, así como a las reacciones químicas que en él se realizan (Barberá y López, 2006).

Los avances realizados en los últimos 20 años han permitido conocer en profundidad la arquitectura del músculo, y uno de los objetivos primordiales en la mayoría de las investigaciones en la carne es relacionar el estado de los sistemas estructurales con los parámetros de calidad.

Sin embargo, existen pocos reportes referentes al estudio de los cambios que ocurren durante la refrigeración siendo esta una operación unitaria muy importante en la conservación de los alimentos. El presente trabajo se enfoca en evaluar los cambios presentados bajo condiciones de almacenamiento en refrigeración (4 °C) sobre la actividad proteolítica y en algunos parámetros fisicoquímicos en carne de ovino obteniendo así información sobre el ablandamiento *postmortem* y la solubilidad.



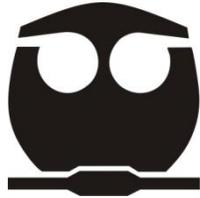
CAPITULO 3

HIPÓTESIS



HIPÓTESIS

El estudio de la hidrólisis de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas; así como, los sistemas enzimáticos de la carne de ovino permitirá obtener información en el proceso *postmortem*, lo cual conlleva a la transformación del músculo a carne. Para ello, los cambios en los parámetros fisicoquímicos y en actividad de las enzimas endógenas se verán reflejados en la solubilidad o en la degradación de dichas proteínas; esperando de esta forma conocer una parte de los procesos implicados en la etapa *postmortem*; cambios que podrían afectar la calidad final de la carne e incluso las propiedades tecnológicas siendo la solubilidad un indicador en la desnaturalización de las proteínas.



CAPITULO 4

OBJETIVO GENERAL

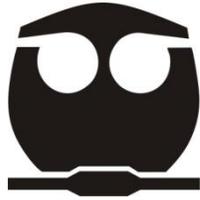


OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios en las características fisicoquímicas y la actividad proteolítica de la carne de ovino durante la refrigeración.

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la refrigeración en el pH de la carne y solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas, totales y miofibrilares.
- Evaluar la actividad enzimática de las proteasas neutras y ácidas durante la refrigeración.
- Evaluar la degradación de las proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares y totales durante el almacenamiento mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).
- Determinar la actividad proteolítica en la fracción sarcoplásmica mediante el uso de zimogramas.



CAPITULO 5

METODOLOGÍA



METODOLOGIA

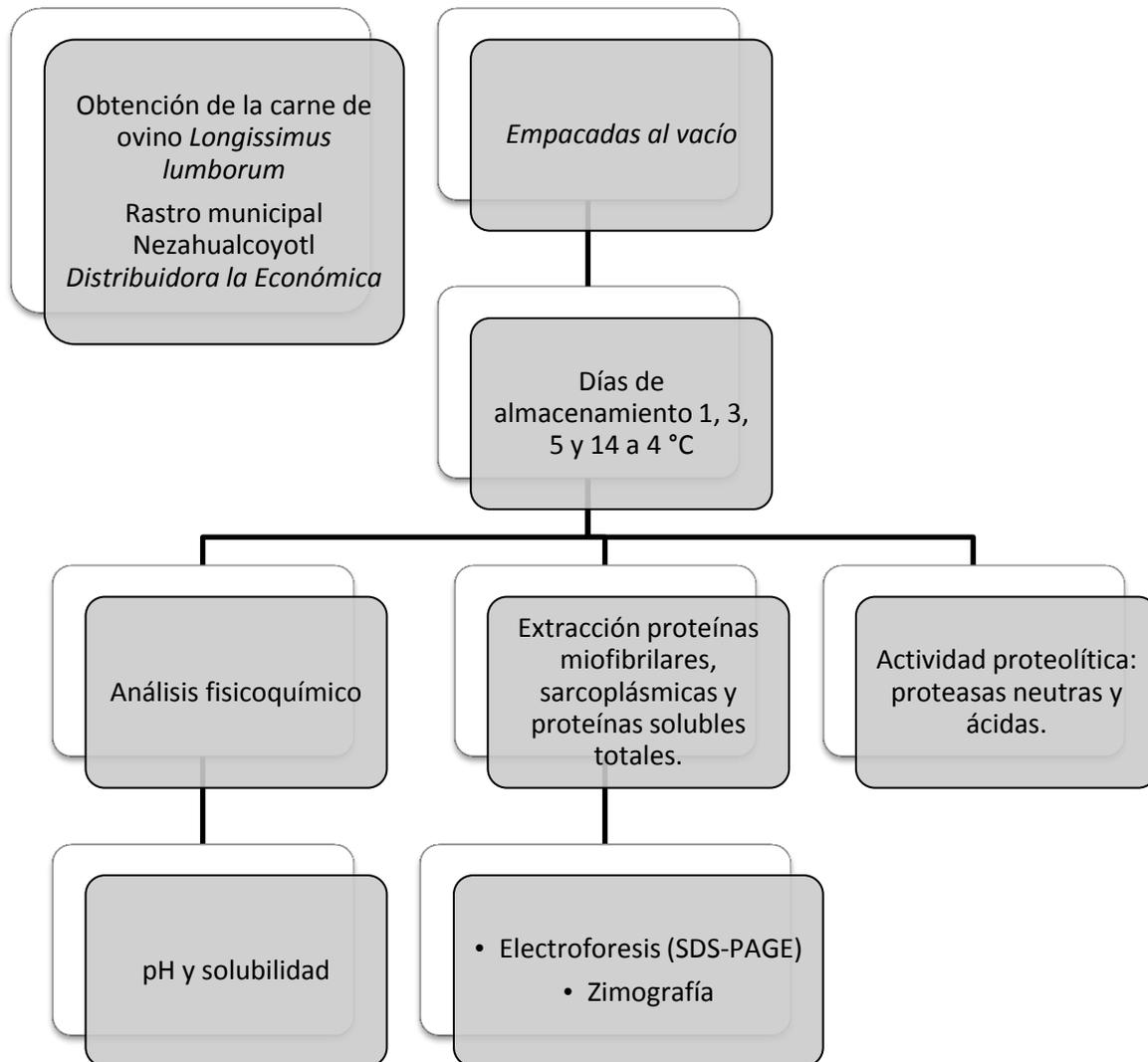


Figura 5.1. Diagrama general de trabajo



5.1 Obtención y preparación de la muestra

Se seleccionaron 12 animales machos Pellibuey de un año de edad, alimentados en pastoreo con suplemento; del cual se obtuvo el músculo *Longissimus lumborum* a las 6 horas del sacrificio. Enseguida fueron empacadas al vacío a una presión de -70 mbares durante 3 segundos en Multivac (d-8941, Koch, Kansas, EUA).

5.1.1 Condiciones de almacén de las muestras

Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de 4 °C durante 14 días. En los días 1, 3, 5 y 14 se realizaron los análisis enzimáticos y fisicoquímicos.

5.2 pH

Se analizó mediante la inserción del electrodo de penetración Hanna (HI 99163, Portugal). La determinación se realizó por triplicado (Guerrero y col., 2000).

5.3 Solubilidad

La solubilidad se determinó por el método propuesto por Schilling y col., (2002), en el cual para las proteínas sarcoplásmicas, se homogenizó 1 g de carne (mediante un procesador) con 10 mL de buffer de fosfatos 0.025 M, pH 7.2. El homogenizado se dejó reposando durante 12 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó y se filtró con papel filtro Whatman No. 1, para finalmente determinar proteína del sobrenadante por el método de Biuret (Gornall, 1949).



La solubilidad total se determinó en forma similar; sin embargo, se utilizó, una solución de KI 1.0 M en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2. La solubilidad de las proteínas miofibrilares se obtuvo de la resta entre la solubilidad de las proteínas totales y proteínas sarcoplásmicas.

5.4 Extracción de proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares se extrajeron de acuerdo a la metodología reportada por Ngapo (1992), modificada por García-Barrientos (2007). En la cual las muestras se homogenizaron durante 2 minutos con hielo y agua desionizada en proporciones 1:1:1 (p/ p /v). La mezcla anterior se mantuvo en agitación constante en un baño con hielo durante 10 min, posteriormente, se filtró 2 veces utilizando gasa. Al filtrado obtenido se le adicionó agua desionizada en proporción 1:1.5 (v/v), previamente enfriada a 4 °C. Posteriormente, se sometió a agitación durante 15 min. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min en una centrifuga Eppendorf (22331, Hamburgo, Alemania) a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en un buffer miofibrilar de fosfatos de sodio 50 mM pH 7, NaCl 0.6 M. Se realizó por triplicado.

5.5 Actividad proteolítica

Se estudiaron las proteasas ácidas y neutras endógenas de la carne de ovino.

- a) Proteasas ácidas: se usó como sustrato hemoglobina a pH 3 (Anson, 1983).
- b) Proteasas neutras: se utilizó como sustrato caseína a pH 7 (Kunitz, 1947; Yamaguchi y col., 1983).



5.5.1 Obtención del extracto enzimático

Primeramente, se tomó una muestra de 4 g de carne, se homogenizó con 8 mL de la solución de extracción (buffer de fosfatos 20 mM pH 7, 0.9% NaCl). Enseguida se centrifugó en una centrífuga Eppendorf (22331, Hamburgo, Alemania) durante 30 minutos a 2000 x g, a 4 °C; se recuperó el sobrenadante para ser almacenado a 4 °C hasta la determinación de su actividad proteolítica.

5.5.2 Evaluación proteolítica de proteasas ácidas y neutras

Se tomó 1 mL del sustrato, hemoglobina 1% (p/v), para las proteasas ácidas. Se incubó durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se agregó 250 µL de extracto enzimático, y se incubó por otros 15 minutos. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 50% (p/ v). La mezcla reposó durante 10 min a 4 °C, enseguida se centrifugó en una microcentrífuga Bio-Rad (14 K, Richmond, California, E.U.A.). Se midió la absorbencia del sobrenadante en un biofotómetro Bio-Rad (22331, Hamburgo, Alemania). La actividad enzimática se definió mediante la siguiente ecuación (Yamaguchi y col., 1983), siendo AP (actividad proteasa).

$$AP = \frac{(absorbencia * dilución empleada)}{(0.001 * tiempo * mL de extracto)}$$

Asimismo, se determinó la cantidad de proteína del extracto por el método de biuret (Gornall, 1949). Realizándose por triplicado.

Para las proteasas neutras se realizó la metodología descrita anteriormente; sin embargo, se usó caseína 1% (p/v) como sustrato.



5.6 Liofilización de las proteínas extraídas

Esta operación tuvo como objetivo concentrar las proteínas extraídas. Los sobrenadantes que contenían a las proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y totales se introdujeron por separado en la cámara del sistema liofilizador LABCONCO (Freezone® 4.5, EUA) hasta deshidratar el sobrenadante. Finalmente se almacenó a -80 °C en un REVCO Thermo Scientific Revco (ULT1386-5-D, EUA.) hasta su empleo.

5.7 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Se realizó en condiciones desnaturizantes usando SDS al 10% para las proteínas liofilizadas miofibrilares y totales, siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970) para electroforesis en gel de poliacrilamida. Para esta técnica se utilizó un gel de concentración de 4% T (anexo A) y un gel de separación 10% T (anexo A). Las proteínas miofibrilares se solubilizaron en un amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 7, NaCl 0.6 M; en el caso de las proteínas totales el liofilizado se disolvió en un buffer de fosfatos 10 mM a pH 7, 2% SDS; una vez diluidas se calentaron a 93 °C durante 2 min, se adicionó 0.1 mL de 2-β mercaptoetanol, se calentó nuevamente a 93 °C durante 2 min. Para la separación de ambas fracciones, el gel se cargó con 15 µL que contenían 200 µg de proteína. La separación electroforética se llevó a cabo en una cámara Mini-Protean Bio-Rad (3Cell, Richmond, California, EUA) a 150 V durante 1 h. Los geles se sumergieron en una solución teñidora con azul de Coomasie R-250 al 0.5%, etanol al 40% y ácido acético al 10%, para la visualización de las bandas. Posteriormente los geles se destiñeron con una solución 40% metanol, 10% ácido acético. Finalmente, el análisis de los geles se llevó a cabo en el equipo Gel Doc Bio-Rad (2000, Richmond, California, EUA.).



Los pesos moleculares de cada banda fueron calculados con la ayuda de estándares preteñidos para SDS-PAGE, de amplio rango (BioRad).

5.8 Zimogramas para la detección *in situ* de la actividad de las proteasas

Los zimogramas se realizaron a partir del extracto sarcoplásmico liofilizado (obtenido de los diferentes días de estudio) y disuelto en un buffer de fosfatos 0.025 M, pH 7.2.

Inicialmente se midió la actividad proteolítica usando la técnica mencionada en el punto 5.5.2. Se realizaron alícuotas a partir de las actividades medidas para obtener una dilución final de 1.5 UI en 15 μ L (Díaz, 2001). Se detectó la actividad proteolítica *in situ*, usando la técnica electroforética SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes (SDS al 0.1% en el gel). Se usó un gel de concentración de 4% T y un gel de separación 10% T. Las muestras fueron corridas en el sistema anteriormente mencionado a 150 V durante 1.30 h. Después de la corrida, la mitad del gel se utilizó para los zimogramas y el otro se tiñó con azul de Coomassie R-250 (0.5% p/ v).

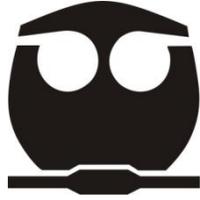
El gel de actividad se fijó durante 2 h en una solución 20% de propanol, 10% de ácido acético. Enseguida, se realizaron 3 lavados con agua desionizada; a continuación fueron sumergidos en Tritón X-100 2.5% (v/ v) durante 30 min. Posteriormente se lavaron con agua desionizada durante 2 horas haciendo recambios cada 15 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos en la segunda hora, con el fin de eliminar el SDS. Después de los lavados, los geles fueron incubados en 50 mL de una solución de gelatina al 1% en un agotador orbital (Lab-Line Orbit, EUA) durante 12 horas a 4 °C. Al finalizar este tiempo se aumentó la temperatura hasta llegar a 20 °C durante 2 horas. Después, el gel se tiñó y fijó en un solo paso en una solución 40% metanol, 10% ácido acético y 0.1%



azul de Coomasie R-250. Por último, se realizaron lavados en una solución con 40% metanol y 10% ácido acético. La actividad proteolítica se observó como las zonas claras al ser fotografiadas en un equipo Gel Doc Bio-Rad (2000, Richmond, EUA). Se usó un estándar preteñido de pesos moleculares de amplio rango (Bio-Rad).

5.9 Análisis estadístico

Se calcularon las medias y desviaciones estándar para la obtención de las gráficas. El análisis de varianza ANDEVA y la prueba de diferencia de medias por el método de diferencia mínima significativa DMS se realizaron en el paquete estadístico SPSS (versión 17.0).



CAPITULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS

Se trabajó con 12 ovinos Pellibuey machos de un año de edad, alimentados en pastoreo con suplemento; del cual se obtuvo el músculo *Longissimus lumborum* ya que este músculo es el más representativo de la canal, en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas debido a su composición tisular (72.6% humedad, 19.9% proteína, 5.9% grasa y 1.6% cenizas; Hernández, 2008), aunado a su valor nutrimental, organoléptico, pH y la capacidad de retención de agua (de Gea, 2005). Para cada muestra se realizó por triplicado cada determinación y la extracción de las proteínas.

6.1 Actividad proteolítica y pH

El pH de la carne cambió a lo largo de los días de almacenamiento (4 °C), lo cual se observa en la **Tabla 6.1**, se obtuvo el valor más alto el día 1 (6.5); cabe aclarar que en el presente estudio, se nombró al día 1 como el punto inmediato al sacrificio. En cuanto al menor valor de pH se encuentra en el día 5 (5.5); esto se atribuye a que durante este periodo de tiempo se acumuló ácido láctico en el tejido muscular puesto que después del sacrificio del animal se establece el metabolismo anaerobio donde la intensidad depende de la naturaleza y el estado del músculo en el preciso momento en el que la circulación cesa (Price 1994). Así mismo, existe un decremento gradual de pH considerándose entre los valores normales que van desde 7 hasta 5.3 a 5.7 (Ponce, 2006). Posteriormente al día 14 el pH aumentó hasta llevar el valor a 5.9 (**Tabla 6.1**), debido a la acumulación de amoniaco por la desaminación de los aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) y la acción proteolítica de las enzimas endógenas de la carne siendo este un fenómeno normal para las carnes almacenadas (Lea y col., 1969).

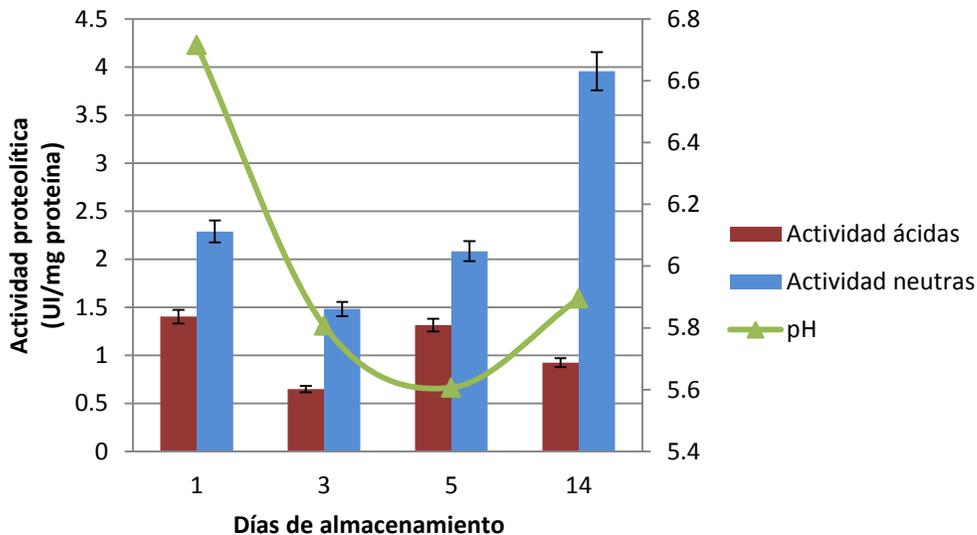


Tabla 6.1. Variación en el pH y en la actividad proteolítica de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días.

Días de almacén	pH	Actividad ácidas (UI/mg proteína)	Actividad neutras (UI/mg proteína)
1	6.53 ± 0.3	1.37 ± 0.3	2.02 ± 0.5
3	5.76 ± 0.2	0.62 ± 0.1	1.56 ± 0.2
5	5.58 ± 0.1	1.91 ± 0.3	1.94 ± 0.2
14	5.90 ± 0.3	1.20 ± 0.2	3.12 ± 0.6

De igual forma, en la **Gráfica 6.1** se muestra la variación de pH durante la refrigeración, y la actividad de las enzimas endógenas de la carne cuya actividad se centra en dos sistemas las proteasas ácidas y neutras. Algunas de estas enzimas proteolíticas endógenas cesan su función después de la muerte, mientras que otras permanecen activas a lo largo de todo el proceso de maduración, y contribuyen al sabor (exopeptidasas) o a la suavidad de la carne (endopeptidasas). Las proteasas endógenas causantes de la proteólisis en las proteínas miofibrilares (incluyendo nebulina, miosina, actina y tropomiosina) pertenecen a dos grupos de sistemas proteolíticos: las calpainas y las catepsinas (Roncalés y col., 1995).

El análisis estadístico ANDEVA mostró que hay diferencia significativa en el pH con respecto a los días con un $p < 0.000000$, siendo el día 1 (6.5) el valor más alto y el valor menor el día 5 (5.5). Para la actividad de las proteasas neutras y ácidas también se encontraron una diferencia significativa con un $p < 0,017869$ y $p < 0,000095$ respectivamente (**Anexo B**).



Gráfica 6.1. Variación del pH y de la actividad proteolítica de proteasas ácidas y neutras de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días.

En la actividad de las proteasas neutras se observó una mayor actividad en el día 14 (3.119 UI/mg proteína), en los primeros días los valores se encontraron cercanos entre ellos con un valor promedio de 1.8415 UI/mg; por lo que se puede sugerir que al día 14 hubo un incremento en la concentración *postmortem* de iones Ca^{2+} en el sarcoplasma debilitando así la estructura de las miofibrillas y la de los filamentos intermedios; por efecto de los cambios *postmortem*, las propiedades de membrana se ven alteradas, y el tejido es susceptible a reacciones de degradación autolítica por acción de enzimas endógenas y exógenas (Ponce, 2006). Existe un gran debate sobre la posibilidad de activar mediante la concentración de calcio libre en el músculo a las calpainas (proteasa neutra dependiente del calcio) bajo las condiciones *in vivo* o *in vitro*. Esta discusión se basa en el hecho de que la concentración de calcio que requieren las calpainas para su actividad proteolítica es mucho más alta (concentraciones milimolares),



que la concentración de calcio libre que se encuentra en los tejidos, generalmente $10 \mu\text{M}$ o menores (Weber y col., 1966). Por otra parte, la calpastatina (enzima endógena reguladora de la actividad de la calpaína) está presente en cantidad suficiente para bloquear completamente la actividad de ambas calpains (Pérez, 1998). Sin embargo, muchos de estos argumentos no son válidos bajo las condiciones *postmortem* como son los cambios de pH, temperatura y concentración de calcio libre (Koochmaraie, 1992). Por otro lado, después del agotamiento del ATP y de la instauración del *rigor mortis*, los sistemas de membrana del retículo sarcoplásmico y de las mitocondrias no son capaces de seguir absorbiendo o secuestrando iones calcio, debido a una mayor actividad de las proteasa neutras (Jeacocke, 1993). Del mismo modo, Warris (2003) mencionó que el aumento de la concentración de calcio activa las μ -calpaínas permitiendo el comienzo de la proteólisis. Las calpastatins pueden finalmente sufrir una lisis por acción de las calpaínas, por otra parte, la m-calpaína puede ser hidrolizada en μ -calpaína. Greesink (2000) indicó que el ablandamiento *postmortem* es causado principalmente por la μ -calpaína mediante la degradación de las proteínas estructurales claves del músculo (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina) y la m-calpaína no parece estar involucrada en el ablandamiento de carne a menos que ésta este tratada con calcio. En un estudio realizado por Huff-Lonergan (1995) se indicó que las calpaínas catalizan la degradación de la titina, la nebulina, la desamina, la cistamina, la troponina-T y la proteína costamérica vinculina *in vitro*. El sistema proteolítico calpaína tiene un papel más importante en la proteólisis que ocurre durante el estado *postmortem* de 0 a 4 °C.

En el sistema calpaína, la isoforma p94 (o calpaína 3) se expresa exclusivamente en el músculo esquelético, uniéndose, a las proteínas miofibrilares gigantes titina, en la línea, el sitio donde la proteólisis ha sido relacionado con la suavidad de la carne. Ilian, Moton, Kent Le Couteur, Hickford y Cowley (2001) reportaron que en



ovejas las variaciones en la calpaína 3 RNAm, y los niveles de proteína presentan una fuerte correlación con las variaciones de la suavidad.

Para la actina y miosina Kemp y col. (2010) afirmaron que no existe una gran degradación de ellas en el período de acondicionamiento *postmortem*, las cuales son el primer sustrato para la catepsina. Las catepsinas están localizadas en los lisosomas, y por lo tanto deben ser liberados para que tengan acceso a las miofibrillas, y de esta forma participar en el proceso de suavidad de la carne (Hopkins y Taylor, 2002).

La actividad de las proteasas ácidas presentó un incremento a partir del día 5 (1.938 UI/mg proteína), estas condiciones ligeramente ácidas son suficientes para que las catepsinas tengan una actividad máxima (Warris, 2003), esto concuerda con las condiciones de pH en este día (5.58). Finalmente se observó una disminución de la actividad en las proteasas ácidas hacia el día 14. Algunos científicos de la carne consideran la acción cooperativa de estos dos sistemas proteolíticos; otros autores sugieren la presencia de otros sistemas enzimáticos que juegan un papel en la alteración de la estructura muscular como son diferentes serinproteasas (miosinasas) o las caspasas (Kemp y col., 2010). Para este estudio no se puede atribuir la actividad de una proteasa específica, ya que se trabajó con el extracto crudo enzimático en donde existe la presencia de varios grupos de las enzimas; sin embargo, se pudo observar el comportamiento de las proteasas ácidas y neutras a lo largo de los días de estudio, gracias a que se emplearon sustratos específicos para cada una de ellas (hemoglobina y caseína). Por lo anterior, se puede sugerir que los dos sistemas proteolíticos actúan en conjunto en la degradación de la estructura de la carne, y que las proteasas neutras no actúan tempranamente en el estado *postmortem*.



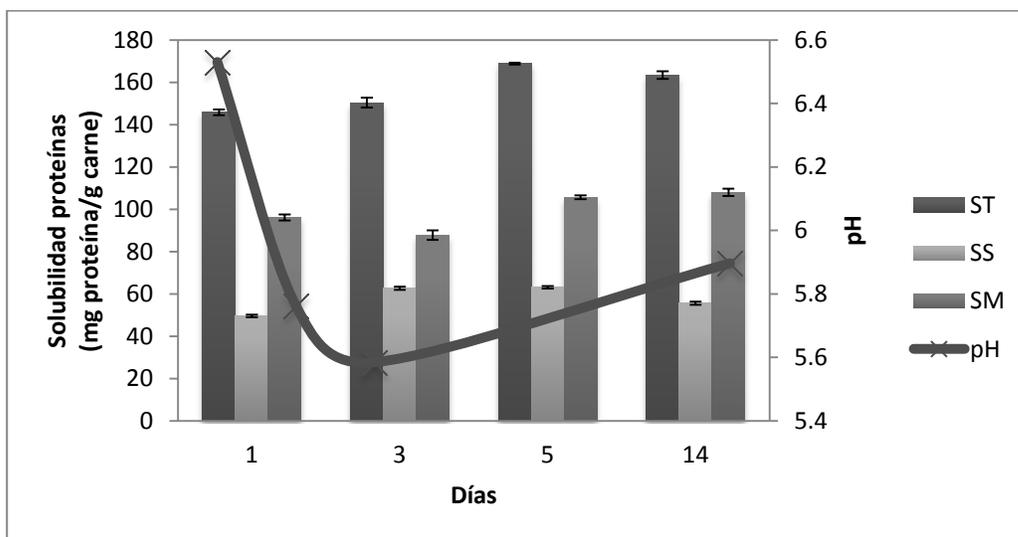
6.2 Solubilidad y pH

La solubilidad de las proteínas es un factor que afecta sus propiedades tecnológicas como son; la capacidad emulgente, de gelificación, etc. En las proteínas de la carne se pueden establecer categorías según su función biológica o sus propiedades químicas.

La solubilidad de las proteínas es un indicador de la desnaturalización de las proteínas y fundamentalmente muestra el balance hidrofobia / hidrofilia (Chan, y col., 2011), de igual forma está ligada al cambio de pH de la carne. En la **Gráfica 6.2** se observa la solubilidad de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento, la solubilidad mínima se da a un pH aproximadamente cercano al punto isoeléctrico (5.4), y a pH mayores aumentó la solubilidad debido a que se encuentran cargadas y existe una mayor repulsión electrostática entre ellas teniendo mayor interacción con el agua, por lo que la solubilidad de las proteínas miofibrilares decrece a pH bajos (Zayas, 1997). Al observar los valores entre la comparación de medias por DMS (**Anexo B**) del efecto de la refrigeración durante 14 días sobre la solubilidad de proteínas miofibrilares en la carne de ovino, los días que presentaron mayor solubilidad fueron los días 5 y 14 con valores de 105.637 y 107.909 (mg proteína/g carne), respectivamente; lo que concuerda con los días en que hubo mayor actividad en las proteasas ácidas (día 5); así como las proteasas básicas (día 5 y 14), esto motiva a pensar que la solubilidad aumentó después de la hidrólisis con las enzimas acrecentando el número de grupos ionizables teniendo como consecuencia el aumento de las características hidrofílicas y la carga neta del hidrolizado resultante.



El análisis de varianza (ANDEVA) mostró que hay diferencia significativa entre los días de estudio en la solubilidad de las proteínas totales $p < 0,00$, la solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas $p < 0,000001$ y la solubilidad de proteínas miofibrilares $p < 0,000000$.



Gráfica 6.2. Variación del pH y solubilidad de proteínas totales, sarcoplásmicas y miofibrilares de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días. **SM:** solubilidad de proteínas miofibrilares, **SS:** solubilidad de proteínas sarcoplásmicas, **ST:** solubilidad de proteínas totales.

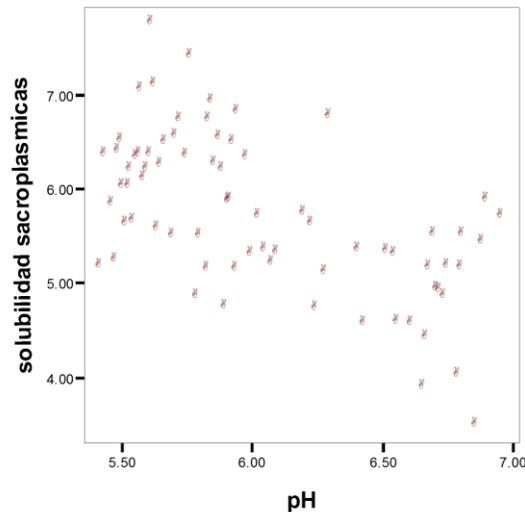
Igualmente, en el [Anexo B](#) la [Tabla I](#) se observa que los valores de la solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas son menores que los valores de solubilidad de las miofibrilares. Por lo que, la baja precipitación de las proteínas sarcoplásmicas no afecta la solubilidad de las proteínas miofibrilares.

Las proteínas sarcoplásmicas presentaron la mayor solubilidad en los días 3 y 5 con un promedio de 62.872 mg proteína/g carne; para las proteínas miofibrilares la

mayor solubilidad fueron los días 5 y 14 (106.773 mg proteína/g carne). Debido a que la fragmentación miofibrilar se incrementa con tiempos de almacenamiento.

Boyer-Berri y Greaser (1998) mencionaron que los cambios que se pueden observar en el componente miofibrilar es en las uniones del filamento delgado (actina) a los discos Z, y son los que muestran cierto grado de ruptura. En comparación con las proteínas no estructurales (sarcoplásmicas).

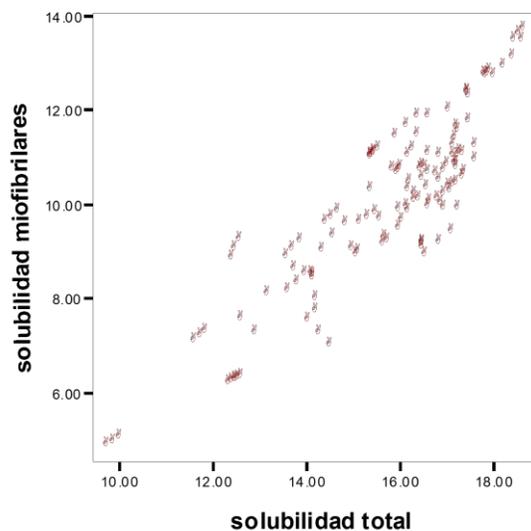
Se tuvo una correlación negativa entre la solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas y el pH con un $r = -0.507$ (Gráfica 6.3). Por otro lado, una correlación positiva entre la solubilidad de las proteínas miofibrilares y la solubilidad de las proteínas totales con un $r=0.882$ (Gráfica 6.4).



Gráfica 6.3. Correlación de la solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas (mg proteína/g carne) y pH de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días



Se observa en la **Gráfica 6.3** que a valores bajos de pH (5.5) existió una gran solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas, al haber un cambio en la carga neta provoca fuertes repulsiones electrostáticas intermoleculares determinando el hinchamiento y desplegamiento de las proteínas sarcoplásmicas (Damodaran, 2000). Además, las interacciones iónicas promueven la asociación proteína-agua aumentando la solubilidad. Por otra parte, se podrían relacionar las reacciones enzimáticas de las proteasas que se encuentran en la fracción sarcoplásmica, ya que se sabe que los efectos del pH en dichas reacciones son causados en gran parte por la ionización reversible del sustrato. Estos efectos se manifiestan como cambios en la actividad enzimática (catálisis), estabilidad, interacción con el sustrato o cambios en el equilibrio de la reacción (Nagodawithana y Reed, 1993).



Gráfica 6.4. Correlación de la solubilidad proteínas miofibrilares y la solubilidad total de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días.



En la **Gráfica 6.4** se observa una correlación positiva entre las proteínas miofibrilares y la solubilidad total, este comportamiento se puede explicar ya que las proteínas miofibrilares constituyen del 55 al 60% del total de la proteína del músculo (Pérez-Chabela, 1998) viéndose reflejado en esta relación; esto también se puede observar en la **Tabla I (Anexo B)**, en donde se observa que la mayor solubilidad de las proteínas totales se presentó al día 5 (168.786 mg proteína/g carne).

6.3 Electroforesis

Los cambios de las proteínas totales y miofibrilares entre 24 h a 14 días *postmortem* fueron seguidos a través de electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), y en el caso de las proteínas sarcoplásmicas se realizó en condiciones nativas. Para todas las proteínas se realizó el análisis por densitometría los geles correspondientes. Para identificar la localización de las proteínas por medio del peso molecular se utilizaron algunos marcadores de peso molecular conocido como son: (1) cadena pesada de la miosina (MHC) 200 kDa, (2) β -galactosidasa 116.25 kDa, (3) seroalbumina bovina 66.20 kDa, (4) albúmina de huevo 45 kDa, (5) anhidrasa carbónica 31 kDa, (6) inhibidor de la tripsina de soja 21.500, (7) lisozima 14.400 kDa y (8) aprotinina 6.50 kDa. Al analizar el perfil de electroforesis de las proteínas totales (**Figura 6.1**), se observa un amplio espectro de bandas con pesos moleculares que van desde los 7 kDa hasta los 200 kDa. En el día 14 se desarrolló una banda con un peso molecular de 200 kDa, la cual se puede atribuir a la cadena pesada de la miosina y a productos de la hidrólisis de proteínas con pesos moleculares mayores a 200 kDa; este producto puede proceder de la hidrólisis de las proteínas del tejido conectivo, siendo el colágeno el que se encuentra en mayor cantidad.



Existen dos clases de enzimas que degradan el colágeno de los mamíferos: colagenasas y las proteinasas neutras, capaces de catalizar la hidrólisis de las regiones telopéptidas del colágeno de la carne (Robinson, 1991).

Por otra parte, se podría pensar en la cadena pesada de miosina (MHC); sin embargo, esta posibilidad se reduce, ya que, contrario a lo que se muestra en el perfil de las proteínas totales, esta banda debería de aparecer durante todos los días puesto que estudios anteriores muestran que las principales proteínas contráctiles, miosina y actina no sufren una degradación durante el almacenamiento *postmortem* a 4 °C (Soltanizadeh y col., 2008). Hopkins y Thompson (2001) reportaron que la desnaturalización de la miosina ocurre a elevadas temperaturas. Por otra parte, cuando el músculo entra en *rigor mortis*, la cadena de miosina es protegida contra la desnaturalización por la combinación con la actina (Pietrzak y col., 1997). Dos bandas entre 142.74 y 130.72 kDa se volvieron visibles al día 14 lo que coincide con lo reportado por Bechtel y Parrish (1983), puesto que trabajaron con el músculo *Longissimus* almacenado a 4, 23 y 37 °C, en los días 3, 7 y 14, observando la aparición de proteínas que iban de 125 a 145 kDa, las cuales podrían ser proteínas de degradación de la proteína MHC. Las proteínas, que se han mostrado constantemente relacionadas en la fragmentación durante el periodo *postmortem*, incluyen a las proteínas reguladoras y del citoesqueleto (Choi y col., 2010). Por lo que, las bandas con un peso molecular de 80-86, 65-71, 26 y 16-17 kDa coinciden con los pesos de algunas proteínas de la fracción sarcoplásmica μ -calpaína (80 kDa), hemoglobina (65 kDa), subunidad de la calpaína (28 kDa) y mioglobina (17 kDa), y se observan proteínas de bajo peso molecular, se podría hacer referencia a péptidos (aproximadamente 7 kDa). En cuanto a la fracción miofibrilar se identificaron varias proteínas que podrían corresponder a la desmina, actina, troponina-T y miosina LC, debido a la comparación entre los pesos moleculares en dicha fracción; así como, la presencia de fragmentos de actina (bandas entre 40 y 41



kDa) y fragmentos de troponina-T los cuales se desarrollan en los días 1 y 3 al observarse bandas entre 33 y 32 kDa.

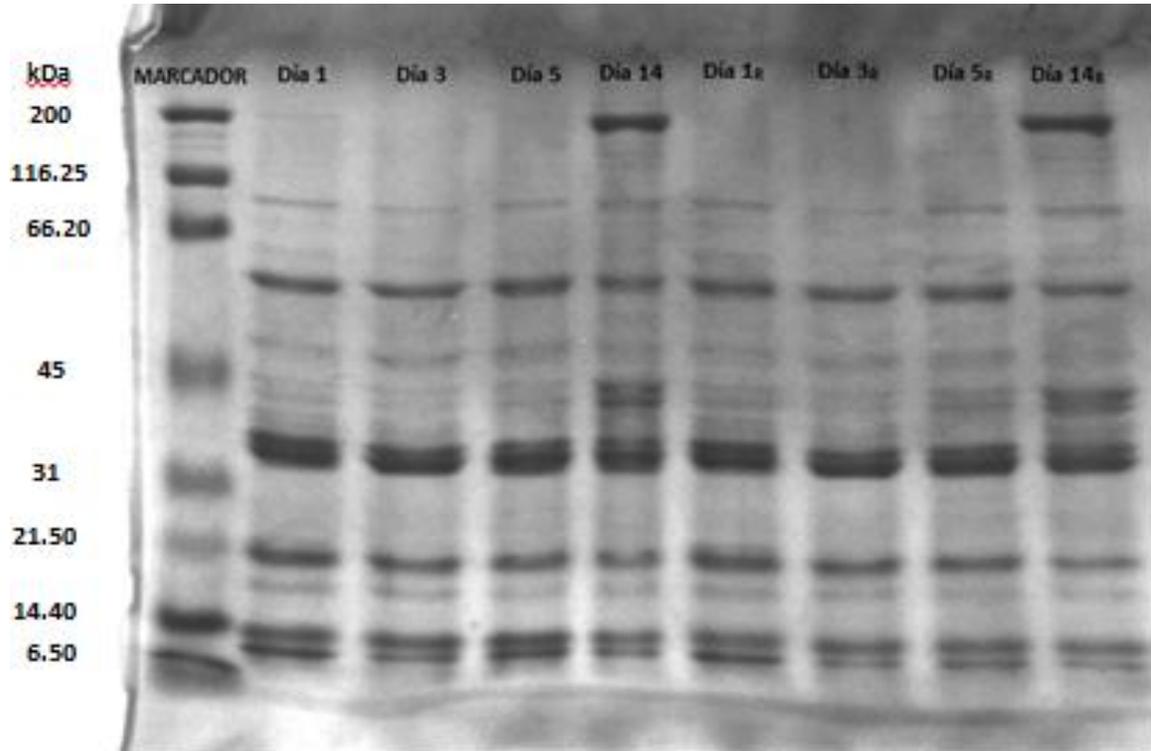


Figura 6.1. Perfil de electroforesis desnaturalizante 10%T de las proteínas totales de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días **R:** Repetición del día señalado.

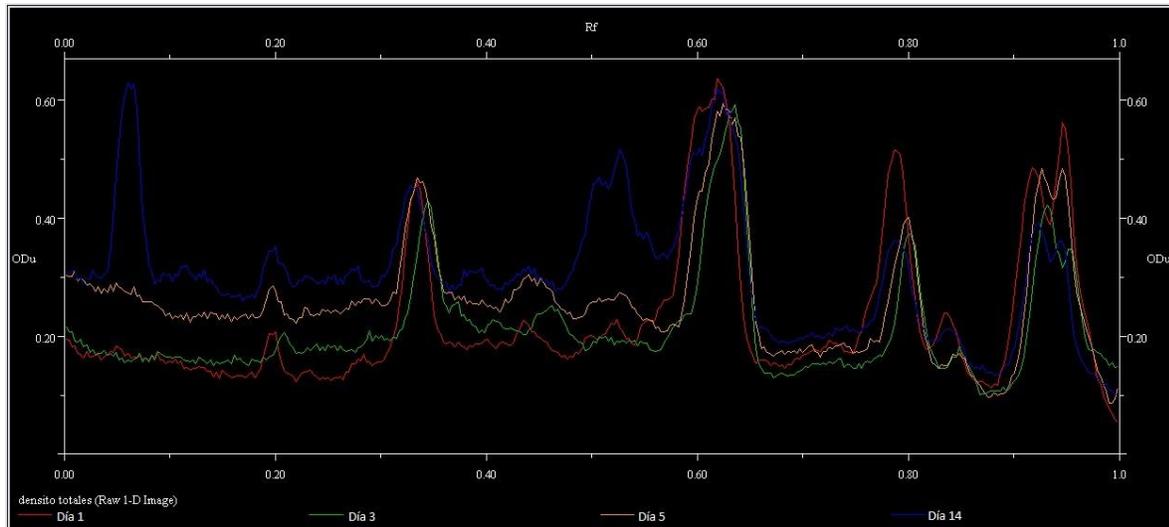


Figura 6.2. Densitogramas de la electroforesis de las proteínas totales de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días.

La localización y los cambios de las proteínas miofibrilares se muestra en las **Figuras 6.3 y 6.4**. El análisis del perfil electroforético mediante los densitogramas del estudio mostró un decremento prácticamente nulo en el número de bandas a lo largo del tiempo de estudio, los principales constituyentes de la miofibrilla, actina y miosina, muestran la poca o nula degradación a través de los días de almacenamiento a la temperatura de refrigeración del estudio 4 °C. Al observar el perfil electroforético del día 1 solo dos bandas alrededor de 95 y 17 kDa desaparecen en los días 3, 5 y 14. Bandas de bajos pesos moleculares se hacen evidentes en días recientes al sacrificio, así como, en el último día de estudio (día 14). Además de las bandas que se encuentran cerca de los pesos moleculares de la actina y miosina, otra proteína que presentó mayor concentración es la banda de aproximadamente 39 kDa, la concentración de las proteínas entre 186, 46, 39, 36, 30, 21 y 14 kDa, disminuyó de forma progresiva hasta el día 5. La **Figura 6.3** y **Tabla I (Anexo C)** muestran los pesos moleculares y la densidad óptica encontrados en la electroforesis realizada para las muestras almacenadas a 4 °C.



Algunos fragmentos con pesos moleculares cercanos a 155 kDa se han identificado en la carne almacenada, probablemente se originó a partir de la degradación de la cadena pesada de la miosina (Sentandreu, Coulis y Ouali, 2002).

Hopkins y Thompson (2001), mencionaron que la degradación de la vinculina se hace evidente al día 1 *postmortem* con la aparición de fragmentos de 90 kDa. Asimismo, Taylor y col. (1995) reportaron que esta proteína se degrada rápidamente en condiciones normales *postmortem* en refrigeración, por lo que en el gel de las proteínas miofibrilares se observó una banda con peso molecular cercano a los 95 kDa. Por otro lado, fragmentos de 46 y 39 kDa se hacen aparentes durante todo el tiempo de estudio (Figura 6.3), los cuales se pueden atribuir a productos de la degradación de la desmina (Huff-Lonergan y col., 1996). Se observó una banda de aproximadamente de 30 kDa (Figura 6.3) y la disminución en la intensidad de la banda de la proteína con un peso molecular de 36 kDa; la aparición de este fragmento ha sido identificado en numerosos documentos, algunos de estos reportes han relacionado la presencia y cantidad de este polipéptido como una indicador de la velocidad y grado de proteólisis *postmortem* (Ho, Stromer y Robson, 1994). La degradación de la troponina T (35 kDa) y el desarrollo de componentes de 30 kDa también ha sido atribuido a la acción de las calpainas (pH >6) y catepsinas (pH <6; Eskin, 1990; Jaarsveld y col., 1997). El resultado de los densitogramas refleja una evidencia de estos cambios en cada uno de los tiempos analizados bajo las temperaturas estudiadas. Sin embargo, para poder identificar y conocer el efecto de las enzimas sobre las proteínas miofibrilares habría sido necesario ocupar otra técnica que pudiese permitirlo, por ejemplo, la técnica de anticuerpos monoclonales.

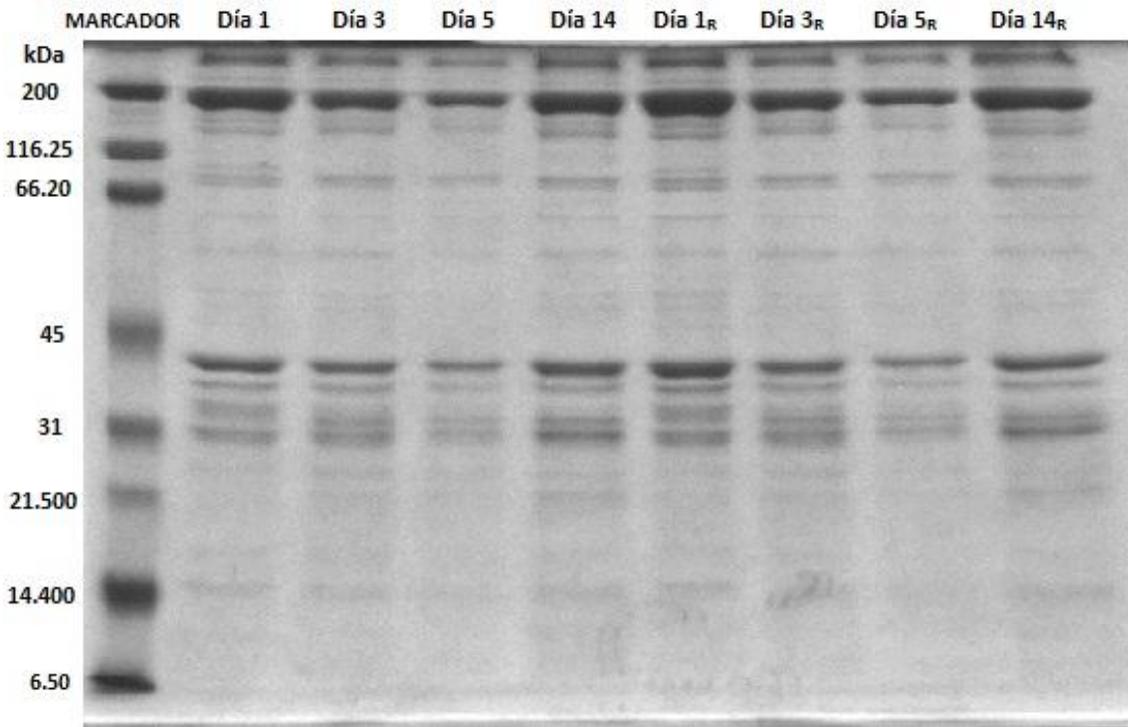


Figura 6.3. Perfil de electroforesis desnaturalizante 10% T de las proteínas miofibrilares de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días **R:** Repetición del día señalado.

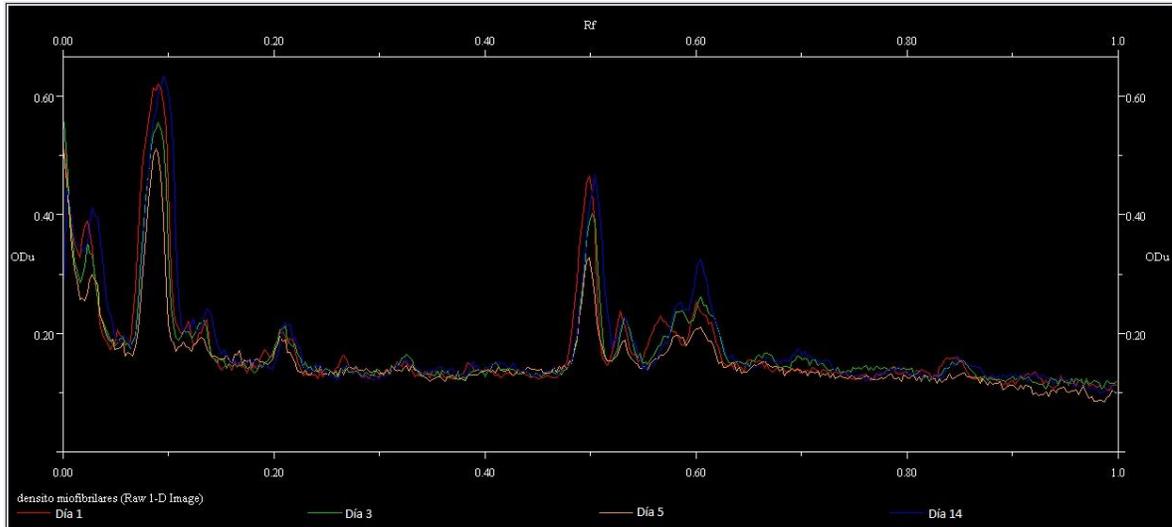


Figura 6.4. Densitogramas de las proteínas miofibrilares de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días.

En la **Figura 6.5** se muestra el perfil de electroforesis de las proteínas sarcoplásmicas extraídas de carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días. En la cual, se observaron proteínas con bajos pesos moleculares en comparación con los geles mostrados anteriormente, ya que se encuentran en un rango de 70 a 6 kDa. El estudio mostró el aumento en el número de bandas en los días 5 y 14, al observarse bandas con pesos moleculares de 17.8 y 17.7 kDa respectivamente. Las cuales pueden ser productos de degradación de alguna calpaína (m o μ -calpaína), específicamente de la subunidad 28 kDa como lo menciona Lonergan y col., (2010). Durante el tiempo de estudio disminuyó la intensidad de las bandas con un peso molecular alrededor de los 30 a los 56 kDa, aumentando la banda con el menor peso molecular (7 kDa). Asimismo, se presentó una intensidad mayor en la banda cercana a los 38 kDa. Cabe mencionar que la fracción sarcoplásmica consta de por lo menos 500 proteínas individuales (Xiong, 2004), importantes por su actividad enzimática, de transporte y almacenamiento de oxígeno (García, 2001).



Se pueden identificar 8 proteínas al comparar sus pesos moleculares con el trabajo realizado por Bowker y col. (2007), por lo que posiblemente podrían corresponder a la fosfoglucomutasa (65 kDa), fosfoglucosa isomerasa (57 kDa), enolasa (46 kDa), gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (38 kDa), lactato deshidrogenasa (36 kDa), fosfoglicerato mutasa (31 kDa), tirofosfato isomerasa (29 kDa) y mioglobina (19 kDa); para esta última, los densitogramas muestran la degradación a lo largo de los días.

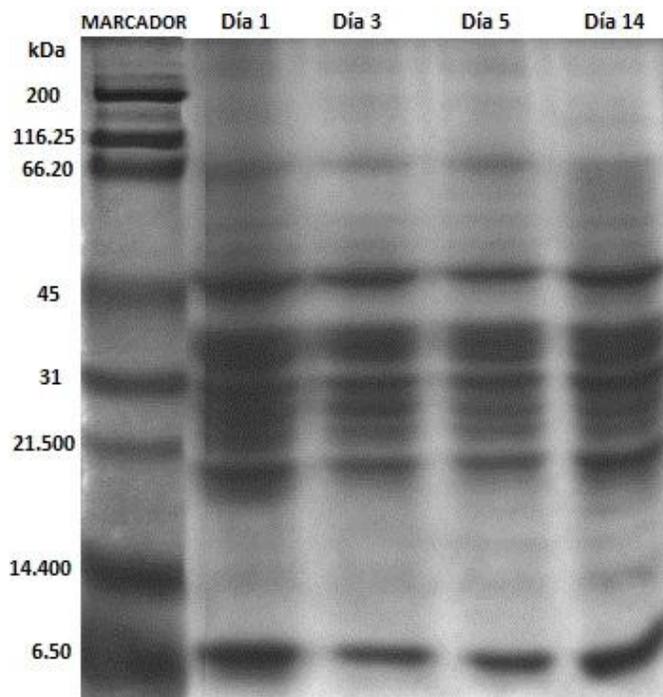


Figura 6.5. Perfil de electroforesis no desnaturalizante de proteínas sarcoplásmicas de la carne de ovino almacenada a 4 °C durante 14 días. **R:** Repetición del día señalado.

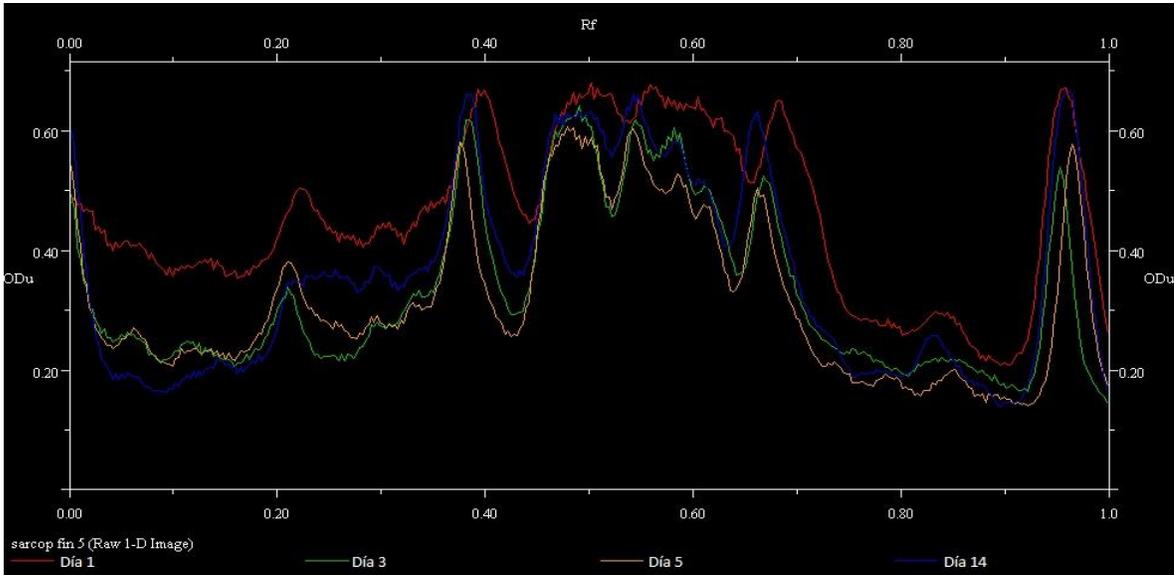


Figura 6.6. Densitogramas de las proteínas sarcoplásmicas de la carne de ovino almacenada a 4 °C por 14 días.

6.4 Zimografía

Esta técnica representa una herramienta muy útil para determinar el efecto del almacenamiento *postmortem* sobre la actividad proteolítica de las proteasas endógenas de la carne de ovino (Veiseth, 2001). Los resultados presentados en la **Figura 6.7** muestran que existen dos bandas activas con distintos pesos moleculares. Al comparar la mitad del gel que se destinó a tinción con el gel de actividad, se determinó que el peso molecular de la banda más pesada fue de aproximadamente 25 kDa y la otra 20 kDa. En una de ellas se observó la declinación gradual de la actividad después de 3, 5 y 14 días *postmortem*: otra en la que su actividad desaparece completamente al día 5. La aparición de bandas biológicamente activas, se lograron observar al usar como sustrato gelatina, detectando de esta forma la actividad de la fracción sarcoplásmica,



cabe mencionar que durante el desarrollo de esta técnica se empleó caseína, sin embargo, no se observó reacción enzimática alguna, lo que podría sugerir que la facilidad de hidrólisis (en comparación con la caseína) del uso de la gelatina ante las proteasas presentes en la fracción sarcoplásmica liofilizada fue mayor.

Por otra parte, el zimograma muestra la estabilidad de estas proteasas en el almacenamiento, sin embargo, no se podría saber específicamente la responsable de los resultados mostrados puesto que no se realizó la purificación de alguna o algunas proteasas de interés. Sin embargo, en dicha técnica, se trabajó bajo condiciones en las que se pudiese observar la actividad proteolítica de las proteasas neutras (pH del sustrato). Por lo que se podría sugerir que el tipo de proteasa encontrada podría pertenecer al grupo de las calpainas.

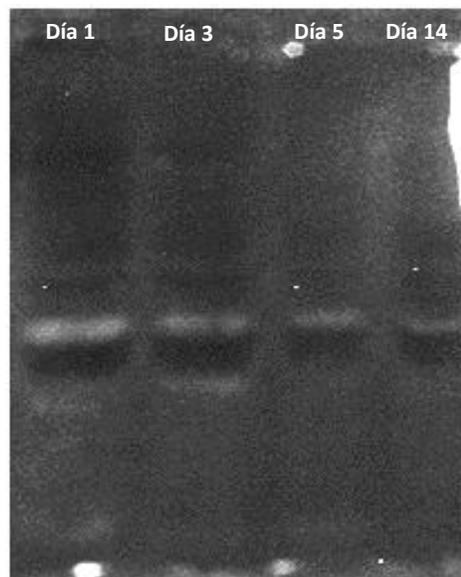


Figura 6.7. Zimograma en gelatina

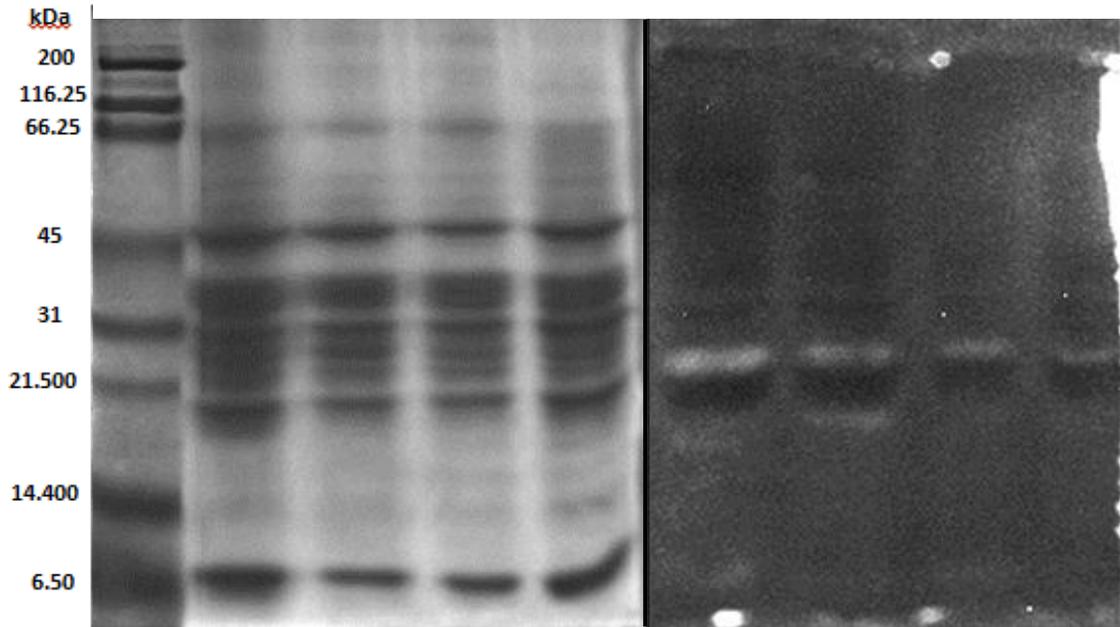
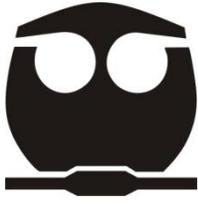


Figura 6.8. Comparación gel teñido y gel de actividad.



CAPITULO 7

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ❧ Se encontraron diferencias significativas para los parámetros de pH así como la actividad entre proteasas neutras y ácidas con respecto al tiempo.
- ❧ La temperatura de almacenamiento en el estado *postmortem* es un factor importante en la extracción de las proteínas miofibrilares.
- ❧ Las enzimas endógenas del músculo esquelético actúan en la proteólisis *postmortem* activadas por el pH.
- ❧ La degradación de proteínas afecta la solubilidad de éstas durante el almacenamiento debido a los cambios de pH, así como en la estructura de las posibles proteínas relacionadas con la textura (SDS-PAGE).
- ❧ Se puede sugerir que los dos sistemas proteolíticos actúan en conjunto en la degradación de la estructura de la carne, sin embargo, la mayor actividad de las proteasas neutras no se observa tempranamente en el estado *postmortem*.
- ❧ Con base en los resultados observados, entre proteasas ácidas y neutras, éstas últimas están más relacionadas con la proteólisis a temperatura de refrigeración durante el almacenamiento.
- ❧ El zimograma muestra la presencia de actividad proteolítica de la fracción sarcoplásmica, en dos bandas que van de los 20 a 25 kDa, las cuales degradan gelatina.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Barberá, S. E. y López, F. J. 2006. Ultraestructura e histología. Cap. 3. En: Ciencia y tecnología de carnes. Hui, Y.H., Guerrero, L. I. y Rosmini, R. M. Edit. Limusa, S.A. de C.V., México. 89-107.

Bekhit, El-Din.A., Bickerstaffe, R., Ilian, A.M., Morton, D.J., Palmer, B., Roberts, N. y Sorimachi, H., 2001. Effect of Preslaughter Feed Withdrawal Period on Longissimus Tenderness and the Expression of Calpains in the Ovine. J. Agric. Food Chem. 49: 1990-1996.

Belitz, H.D. y Grosch, W. 1997. Carne. Cap. 12. En: Química de los alimentos. Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 603-617, 629-632.

Bowker, B.C., Botrel, C., Swartz, D.R., Grant, A.L., Gerrard, D.E. 2004. Influence of myosin heavy chain isoform expression and postmortem metabolism on the ATPase activity of muscle fibers. J. Meat Sci. 68: 587-594.

Bowker, B. C., Fahrenholz, T. M., Paroczay, E. W. y Solomon, M. B. 2007. Effect of hydrodynamic pressure processing and aging on sarcoplasmic proteins of beef strip loins. J. Muscle Foods. 19: 175-193.

Chan, T.Y., Omana, A. y Betti, M. 2011. Effect of ultimate pH and freezing on the biochemical properties of proteins in turkey breast meat. J. Food Chem. 127: 109-117.

Mendoza, M., Quiroz, B. y Pacheco, P. Tecnología de productos cárnicos. Cap. 3. En: Introducción a la Tecnología de Alimentos. Bedolla, B., Dueñas, G., Esquivel, I., Favela, I., Guerrero, H., Mendoza, M., Navarrete, L., Olgún, M., Ortiz, G., Pacheco, P., Quiroz, B., Ramírez, S. y Trujillo, C. Edit. Limusa, S.A. de C.V., México. 68.

Damodaran, S. 2000. Aminoácidos, péptidos y proteínas. Cap. 4. En: Química de los alimentos. Fennema, O. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 433-440.

de Gea, S. G. 2005. Características de la canal y de la carne en cabritos tipo criollo. Cap. 5. En: El ganado caprino en la argentina. de Gea, S. G., Petryna, M. A., Mellano, A., Bonvillani, A. y Turiello, P. Edit. U.N.R.C. Buenos Aires, Argentina. 116 y 126.

Díaz, G.G. 2001. Comparación de la producción de las enzimas exopectinasas de *Aspergillus niger* obtenidas por fermentación sólida y sumergida. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. México. D.F. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Foegeding, A.E. y Hultin, H.O. 2000. Características de los tejidos musculares comestibles. Cap. 15. En: Química de los alimentos. Fennema, O., Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 1072-1094.



García, B. R. 2001. Efecto de las enzimas endógenas sobre las propiedades fisicoquímicas y estructurales de carne de bovino durante la maduración. Tesis Maestría en Biotecnología. México. D.F. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

González, C. Y. 2012. Propuesta para el desarrollo de la biotecnología agroecológica en la Ciudad de México, a partir de las experiencias de Beijing y Shanghai. En línea. Disponible en: <http://www.economia.unam.mx/cechimex/BECAS%20CH-MX/AnexoPropuestaparalaformaciondeunacomisiondebiotecnologiaagricola.pdf>. Consultado en agosto 20, 2012.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. 1949. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction, J. Biol. Chem. 177: 751.

Hernandez, P. V. 2008. Composición química y calidad tecnológica de carne de cordero producida en la región centro del país. Tesis Licenciatura en Química de Alimentos. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hopkins, D. L., Taylor, R.G. 2004. Post-mortem muscle proteolysis and meat tenderisation. Cap. 17. En: Muscle development of livestock animals. te Pas, M., Everts, M. y Haagsman, H., Edit. CAB International, Cambridge, EUA. 363-389.

Hopkins, D.L., Thompson, J.M. 2001. The degradation of myofibrillar proteins in beef and lamb using denaturing electrophoresis-an overview. J. Muscle Foods. 13: 81-102.

Huff-Lonergan, E., Parrish, F.C. y Robson, M.R. 1995. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. J. Anim. Sci. 73:1064-1073.

Kemp, M., Sensky, L., Bardsley, G., Buttery, J. y Parr, T. 2009. Tenderness-An enzymatic view. J. Meat Sci. 84: 248-256.

Koohmaraie, M. 1992. Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain. J. Anim. Sci. 70:3071-3080.

Lametsch, R. y Bendixen, E. 2001. Proteome analysis applied to meat science: characterizing post mortem changes in porcine muscle. J. Agric. Food Chem. 49:4531-4537.

Lea, C., Parr, J. y Jackson, F. 1969. Chemical and organoleptic changes in poultry meat resulting from the growth of psychrophilic spoilage bacteria at 1 °C: 3 glutamine, glutathione, tyrosine ammonia, lactic acid, creatine, carbohydrate, heam pigment and hydrogensulphide. Br. Poult. Sci. 10:229.



Link, B.A., Cassens, R.G., Kauffman, R.G. y Bray, R.W. Changes in the solubility of bovine muscle proteins during growth. Universidad de Wisconsin.

Lonergan, H. E., Zhang, W. y Lonergan, M. S. 2010. Biochemistry of postmortem muscle Lessons on mechanisms of meat tenderization. J. Meat Sci. 86: 184-195.

Martínez, A.I. 2009. Cambios en las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la carne de ovino durante el almacenamiento. Tesis Maestría en Biotecnología. México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Merkel, R.A., 1994. Química de los tejidos animales. Cap. 3. En: Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Price, F.J. y Schweigert, S.B. Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 70-73.

Ouali, A., Herrera, C., Coluis, G., Becilia, S., Boudjellal, A., Aubry, L. y Sentandreu, M. 2006. Revising the conversion of muscle into meat and the underlying mechanism. J. Meat Sci. 74: 44-58.

Parkin, L.K. 1993. Environmental Effects on Enzyme Activity. Cap. 3. En: Enzymes in Food Processing. Nagodawithana, T. y Reed, G. Edit. Academic Press, Inc., Londres, Inglaterra. 39-54.

Pearson, A.M. 1994. La función muscular y los cambios postmortem. Cap. 4. En: Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Price, F.J. y Schweigert, S.B. Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 139-144.

Pearson, A. y Young, R. 1989. Muscle and Meat Biochemistry. Edit. Academic Press, Inc, San Diego, CA.

Pérez-Chabela, M.L. 1998. Efecto de las calpaínas sobre las propiedades fisicoquímicas, ultraestructurales y sensoriales de carne roja. Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas. D.F. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Pierre, G. J. 2010. Análisis del mercado mundial de la carne de ovino. En línea. Disponible en: <http://www.eurocarne.com/boletin/imagenes/18409.pdf>. Consultado en mayo 17, 2010.

Pietrzak, M., Greaser, M.L., Sosnicki, A.A. 1997. Effect of rapid rigor mortis processes on protein functionality in Pectoralis major muscle of domestic turkeys. J. Anim. Sci. 75, 2106–2116.

Ponce, A. E. 2006. Cambios bioquímicos *pre* y *postmortem*. Cap. 4. En: Ciencia y tecnología de carnes. Hui, Y. H., Guerrero, L. I. y Rosmini, R. M. Edit. Limusa, S.A. de C.V., México. 111-131.



Ponce, A.E. y Quintero S.B., Effects of post mortem conditions on meat quality. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.

Rocha, M.A. 2010. México alcanza récord en producción de carne, dice SAGARPA. En línea. Disponible en: <http://www.carnetec.com/MembersOnly/webNews/details.aspx?item=15027>. Consultado en mayo 12, 2010.

Robinson S. D. 1991. Estructura molecular y propiedades funcionales de los alimentos proteicos. Cap. 5. En: Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 184-193.

Soltanizadeh, N., Kadivar, M., Keramat, K. y Fazilati, M. 2008. Comparison of fresh beef and camel meat proteolysis during cold storage. J. Meat Sci. 80: 893-895.

University of California. Corte transversal del músculo esquelético. En línea. Disponible en: http://missinglink.ucsf.edu/lm/IDS_101_histo_resource/nerves_muscle.html. Consultado en enero 19, 2011.

Warris, P.D. 2003. Cambios postmortales en el músculo y su transformación en carne. Cap. 5. En: Ciencia de la carne. Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 101-109.

Warris, P.D. 2003. Efecto del manejo del animal vivo sobre la canal y la calidad de la carne. Cap. 7. En: Ciencia de la carne. Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 149-150.

Warris, P.D. 2003. Medida de la composición y de las características de la carne. Cap. 11. En: Ciencia de la carne. Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 250-253.

Welsch, U. 2010. Tejidos. Cap. 3. En: Histología. Edit. Médica Panamericana, S. A., Madrid, España. 157.

Xiong, Y. L., Muscle proteins. Universidad de Kentucky. EUA.

Zayas, F. J. 1997. Solubility of Proteins. Cap. 1. En: Functionality of Proteins in Food. Edit. Springer, New York, EUA. 9-22.

ANEXOS



ANEXOS

ANEXO A

Preparación de reactivos empleados

I. Solubilidad

Para la preparación de los diferentes buffers de fosfatos, se deberán preparar por separado las soluciones (mono y di fosfato de sodio), ya que, se deberá adicionar poco a poco el monofosfato de sodio al difosfato de sodio hasta alcanzar el pH deseado (7.2).

Cuadro A.1 Buffer de fosfatos 0.025 M, pH 7.2
(Solubilidad proteínas sarcoplásmicas)

	Cantidad (g)	Aforo (mL)	pH final
Monofosfato de sodio	1.72	500	7.2
Difosfato de sodio	3.35	500	

Cuadro A.2 Solución de KI 1.0 M en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2
(Solubilidad total)

	Cantidad (g)	Aforo (mL)	pH final
Monofosfato de sodio	2.75	200	7.2
Difosfato de sodio	5.36	200	
Yoduro de potasio (KI)^a	4.15	25	

^a Añadir esta solución a los buffers antes de llegar al pH deseado, ya que, de lo contrario podría haber variaciones en el pH final.



II. Extracción de proteínas miofibrilares

Cuadro A.3 Buffer miofibrilar de fosfatos de sodio 50 mM pH 7, NaCl 0.6 M

	Cantidad (g)	Aforo (mL)	pH final
Monofosfato de sodio	3.89	500	
Difosfato de sodio	6.70	500	7
Cloruro de sodio (NaCl) ^{a,b}	35.06	1000	

^b En el aforo a 1000 mL se está completando la suma de los volúmenes de los buffers de fosfatos.

III Actividad proteolítica

Preparación buffers

Cuadro A.4 Buffer de fosfatos de sodio 20 mM pH 7, 0.9% NaCl

	Cantidad (g)	Aforo (mL)	pH final
Monofosfato de sodio	1.55	500	
Difosfato de sodio	2.68	500	7
Cloruro de sodio (NaCl) ^{a,b}	9	1000	

Cuadro A.5 Buffer universal (0.025 M Ácido bórico, 0.025 M Ácido forsfórico y 0.025 M Ácido acético)

	Cantidad	Volumen final (mL)
Ácido bórico	1.54 (g)	1000
Ácido forsfórico	6.70 (mL)	1000
Ácido acético	1.43 (mL)	1000



Preparación de sustratos

Preparación de hemoglobina al 1% (p/v)

El sustrato se preparó de acuerdo a la técnica de Anson (1938) con modificaciones de García (2001) y Dublán (2006). La hemoglobina se preparó en un buffer universal 0.025 mM. Se ajustó a pH 3 hasta su utilización.

Preparación de caseína al 1% (p/v)

Se preparó caseína al 1% (p/v) de acuerdo a la técnica de Kunitz (1947) reportada por Yamaguchi y col. (1983) en un buffer de fosfatos 20mM, 0.9% NaCl. Ajustándose a pH 7 hasta su utilización.

IV SDS-PAGE

Soluciones y buffers para geles de poliacrilamida

Cuadro A.4 Buffers para geles de poliacrilamida

	Tris (M)	Glicina (M)	pH	SDS (%)
Buffer del gel separador	1.5	---	8.8 ^c	---
Buffer del gel compactador	0.5	---	6.8 ^c	---
Buffer de corrida, 5X		0.4	8.3 ^d	5.4

Cuadro A. 5 Mezcla acrilamida/bis-acrilamida

Mezcla acrilamida/bis-acrilamida ^e	Acrilamida (%)	Bis-acrilamida (%)
30% T, 2.67% C	29.2	0.8

^c Ajustar con HCl.

^d No realizar corrección de pH, ya que se encuentra alrededor de 8.25.

^e Almacenar a 4 °C.



ANEXO B

Análisis Estadístico

I Análisis de Varianza ANDEVA

- Variable dependiente pH

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
Día	3	18,32555	6,108517	92,48	0,000000
Error	140	9,247505	6,605361E-02		
Total ajustado	143	27,57306			
Total	144				

Significancia $\alpha = 0.05$

- Variable dependiente Actividad Proteasas neutras

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
Día	3	48,34743	16,11581	3,47	0,017869
Error	140	649,7433	4,641023		
Total ajustado	143	698,0907			
Total	144				

Significancia $\alpha = 0.05$

- Variable dependiente Actividad Proteasas ácidas

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
Día	3	30,4879	10,16263	7,61	0,000095
Error	140	187,0252	1,335894		
Total ajustado	143	217,5131			
Total	144				

Significancia $\alpha = 0.05$



- Variable dependiente Solubilidad Totales

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
Día	3	126,2599	42,08663	15,52	0,000000
Error	140	379,7238	2,712313		
Total ajustado	143	505,9837			
Total	144				

Significancia $\alpha= 0.05$

- Variable dependiente Solubilidad Sarcoplásmicas

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
Día	3	92,56115	30,85372	11,55	0,000001
Error	140	374,0165	2,671546		
Total ajustado	143	466,5776			
Total	144				

Significancia $\alpha= 0.05$

- Variable dependiente Solubilidad Miofibrilares

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
Día	3	44,5894	14,86313	32,72	0,000000
Error	140	63,59835	0,4542739		
Total ajustado	143	108,1877			
Total	144				

Significancia $\alpha= 0.05$



II. Correlación

		solubilidad total	solubilidad sarcoplásmicas	solubilidad miofibrilares	actividad proteasas ácidas	actividad proteasas neutras	pH
solubilidad total	Correlación de Pearson	1	.315(**)	.889(**)	.124	.079	-.269(**)
	Sig. (bilateral)		.000	.000	.138	.344	.001
	N	144	144	144	144	144	144
solubilidad sarcoplásmicas	Correlación de Pearson	.315(**)	1	-.153	-.156	.128	-.507(**)
	Sig. (bilateral)	.000		.067	.063	.127	.000
	N	144	144	144	144	144	144
solubilidad miofibrilares	Correlación de Pearson	.889(**)	-.153	1	.204(*)	.021	-.036
	Sig. (bilateral)	.000	.067		.014	.802	.667
	N	144	144	144	144	144	144
actividad proteasas ácidas	Correlación de Pearson	.124	-.156	.204(*)	1	.198(*)	-.114
	Sig. (bilateral)	.138	.063	.014		.018	.175
	N	144	144	144	144	144	144
actividad proteasas neutras	Correlación de Pearson	.079	.128	.021	.198(*)	1	-.019
	Sig. (bilateral)	.344	.127	.802	.018		.825
	N	144	144	144	144	144	144
pH	Correlación de Pearson	-.269(**)	-.507(**)	-.036	-.114	-.019	1
	Sig. (bilateral)	.001	.000	.667	.175	.825	
	N	144	144	144	144	144	144

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).



ANEXO C

Molecular y Densidad Óptica

I. Peso Molecular y Densidad Óptica correspondiente a las Proteínas Miofibrilares

Día 1			Día 3			Día 5			Día 14		
Número de banda	Peso molecular kDa	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu
1	271,615	0.290	1	267,862	0.261	1	223,545	0.172	1	14,400	0.139
2	229,853	0.189	2	223,545	0.186	2	264,161	0.235	2	21,366	0.160
3	186,561	0.417	3	186,561	0.358	3	186,561	0.309	3	23,663	0.151
4	155,695	0.203	4	155,695	0.198	4	155,695	0.176	4	29,938	0.216
5	141,247	0.178	5	145,233	0.176	5	145,233	0.175	5	31,962	0.228
6	95,663	0.153	6	82,207	0.189	6	82,207	0.171	6	36,337	0.185
7	82,207	0.183	7	73,771	0.158	7	77,036	0.145	7	39,101	0.270
8	75,386	0.151	8	62,075	0.133	8	62,342	0.136	8	47,785	0.141
9	62,342	0.139	9	56,003	0.144	9	56,003	0.136	9	50,093	0.138
10	56,486	0.139	10	49,879	0.132	10	49,453	0.127	10	56,003	0.138
11	50,525	0.135	11	48,197	0.138	11	47,990	0.136	11	62,075	0.132
12	49,031	0.134	12	45,779	0.130	12	39,582	0.194	12	139,296	0.193
13	46,372	0.130	13	39,341	0.236	13	36,560	0.161	13	178,935	0.465
14	39,824	0.261	14	36,337	0.181	14	33,155	0.154	14	151,423	0.213
15	36,784	0.185	15	33,155	0.168	15	31,962	0.191	15	260,512	0.346
16	33,358	0.192	16	31,767	0.221	16	30,200	0.185	16	78,723	0.180
17	32,752	0.199	17	29,938	0.211	17	24,078	0.143	17	73,771	0.161
18	30,200	0.218	18	24,078	0.155	18	21,688	0.136	18	223,545	0.189
19	24,932	0.147	19	21,232	0.148	19	14,400	0.124	19	33,155	0.157
20	22,457	0.137	20	14,400	0.138						
21	17,053	0.133									
22	14,673	0.144									



II. Peso Molecular y Densidad Óptica correspondiente a las Proteínas Totales

Día 1			Día 3			Día 5			Día 14		
Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu
1	200,000	0.170	1	194,220	0.157	1	197,089	0.261	1	185,861	0.438
2	149,162	0.152	2	149,162	0.161	2	144,851	0.230	2	155,871	0.297
3	86,932	0.158	3	80,840	0.173	3	86,932	0.249	3	142,742	0.308
4	69,907	0.133	4	65,315	0.178	4	65,608	0.237	4	130,720	0.287
5	61,890	0.148	5	60,516	0.190	5	61,612	0.254	5	86,932	0.304
6	56,830	0.262	6	55,819	0.275	6	56,576	0.331	6	71,189	0.294
7	51,026	0.186	7	50,344	0.213	7	51,951	0.252	7	62,448	0.299
8	48,134	0.192	8	46,436	0.218	8	47,704	0.268	8	57,343	0.350
9	43,230	0.185	9	42,008	0.191	9	42,493	0.250	9	52,185	0.295
10	41,292	0.207	10	40,125	0.186	10	40,821	0.262	10	47,919	0.295
11	38,768	0.210	11	37,243	0.183	11	38,546	0.219	11	42,737	0.368
12	37,243	0.247	12	35,778	0.225	12	34,370	0.431	12	40,821	0.478
13	35,370	0.417	13	34,174	0.360	13	33,208	0.428	13	38,546	0.341
14	33,784	0.367	14	32,829	0.374	14	26,319	0.175	14	35,168	0.480
15	26,319	0.163	15	26,319	0.144	15	23,673	0.178	15	33,399	0.399
16	24,603	0.182	16	23,902	0.153	16	19,575	0.249	16	26,066	0.195
17	20,082	0.313	17	19,409	0.218	17	16,789	0.139	17	23,447	0.207
18	17,372	0.174	18	16,789	0.144	18	9,493	0.267	18	20,082	0.268
19	11,046	0.305	19	9,140	0.229	19	7,563	0.273	19	17,224	0.172
20	7,563	0.272	20	6,751	0.214				20	10,240	0.258
									21	7,855	0.192



III. Peso Molecular y Densidad Óptica correspondiente a las Proteínas Sarcoplásmicas

Día 1			Día 3			Día 5			Día 14		
Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu	Número de banda	Peso molecular	Densidad óptica ODu
1	259.254	0.393	1	271.779	0.241	1	271.779	0.241	1	271.779	0.18
2	161.743	0.371	2	161.743	0.228	2	173.604	0.224	2		
3			3			3			3	147.178	0.192
4	65.82	0.428	4	73.571	0.259	4	71.027	0.295	4	68.571	0.261
5	59.336	0.428	5	61.423	0.25	5	61.778	0.269	5	62.135	0.352
6	56.014	0.454	6	56.337	0.298	6	56.663	0.272	6	56.337	0.353
7	51.081	0.557	7	51.972	0.433	7	52.574	0.291	7	51.673	0.492
8	46.315	0.554	8	47.395	0.419	8	47.944	0.383	8	47.395	0.483
9	37.797	0.65	9	38.706	0.574	9	37.797	0.468	9	38.401	0.611
10	34.915	0.646	10	36.327	0.556	10	35.193	0.547	10	35.473	0.606
11	29.421	0.636	11	31	0.557	11	31.496	0.539	11	31.247	0.554
12	26.5	0.582	12	27.345	0.447	12	26.779	0.501	12	27.06	0.475
13	23.133	0.453	13	24.12	0.355	13	24.374	0.414	13	24.889	0.389
14	19.891	0.271	14	20.495	0.204	14	20.742	0.347	14	20.866	0.194
15	18.962	0.257	15	18.672	0.257	15	17.861	0.197	15	17.754	0.22
16	16.328	0.436	16	16.23	0.198	16	16.35	0.177	16	16.426	0.165
17	14.573	0.234	17	14.148	0.286	17	15.942	0.175	17	14.661	0.36
18			18			18	13.656	0.151	18	11.648	0.285
19	6.854	0.331	19	6.976	0.288	19	6.5	0.315	19	6.854	0.389

