



TESIS DE DOCTORADO

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA
CARNE DE VACUNO MEDIANTE
PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS,
SENSORIALES Y PROTEÓMICOS**

Raquel Rodríguez Vázquez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN DEL MEDIO
NATURAL. DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA, GENÉTICA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA.
FACULTAD DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA CARNE DE VACUNO MEDIANTE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS, SENSORIALES Y PROTEÓMICOS

Dña. **Raquel Rodríguez Vázquez**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 30 de noviembre de 2020

Fdo.: Raquel Rodríguez Vázquez





AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES / TUTORES DE LA TESIS

D. **José Carlos Zapata Babío**, Catedrático del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física y D. **Daniel José Franco Ruiz**, Jefe de Investigación Agroalimentaria del Centro Tecnológico de la Carne. En condición de **directores** de la Tesis: **Evaluación de la calidad de la carne de vacuno mediante parámetros fisicoquímicos, sensoriales y proteómicos.**

INFORMA:

*Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Raquel Rodríguez Vázquez**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 30 de noviembre de 2020

Fdo.: José Carlos Zapata Babío

Fdo.: Daniel José Franco Ruíz





Dña. Raquel Rodríguez Vázquez declara no tener ningún conflicto de intereses en relación con la Tesis Doctoral titulada:

Evaluación de la calidad de la carne de vacuno mediante parámetros fisicoquímicos, sensoriales y proteómicos.

En Santiago de Compostela, 30 de noviembre de 2020

Fdo. Raquel Rodríguez Vázquez



AGRADECEMENTOS

Agora que estou a piques de rematar esta Tese Doutoral, boto a vista atrás e teño claro que non podería ser posible sen as persoas que me acompañaron nesta viaxe. Por elo, gustaríame dedicarlle unhas palabras de agradecemento polo seu apoio, axuda e confianza que me permitiron chegar ata aquí.

En primeiro lugar, gustaríame comezar cos meus directores de Tese: o Catedrático Carlos Zapata e o Dr. Daniel Franco. Ambos me permitiron iniciarme nesta liña de investigación, a cal me apaixonou, desfrutei e aprendín tanto. A Daniel quérolle agradecer a súa dedicación e o estar sempre disposto a ensinarme coa súa maior das vontades. E en especial, quero agradecer esta Tese a Carlos, contigo non soamente aprendín a rigorosidade e a profesionalidade na ciencia, que me transmitiches ca túa ampla experiencia, senón que tamén crecín a nivel persoal. Grazas por compartir comigo a paixón por esta profesión durante todos estes anos.

Gustaríame tamén agradecer enormemente ós meus compañeiro/as de laboratorio: Sen vós teríame sido imposible acabar esta Tese. Grazas por o voso apoio constante nos bos e nos malos momentos, e polas innumerables risas que botamos xuntos, que quedaron inmortalizados nas numerosas “*frases célebres*” que me levarei sempre comigo. A María, quería agradecerlle ser esa voz que todos necesitamos para vencer os medos e seguir adiante. Grazas polo teu apoio e os teus consellos todos estes anos. A ti Javier, agradézoche ser un exemplo de boa persoa e estar sempre disposto a axudar e a dar o teu gran de área para que todo vaia mellor. Grazas por compartir e ensinarme a ver a vida dende distintos puntos de vista. A ti Ariadna, quero agradecerche que me recibiras cos brazos abertos dende o inicio e por ensinarme durante os meus primeiros pasos no laboratorio ca túa amabilidade e paciencia. Grazas por tantos momentos de comprensión nas diferentes etapas desta Tese e por estar sempre que o necesitei. E a ti Daniel, grazas. Grazas por todos eses momentos que pasamos xogando o xadrez, por ter conversacións de horas sobre calquera tema (porque contigo sempre é interesante) e por ter sempre un momento para facerme rir (con memes, vídeos, puzzles que

non era tan fáciles de resolver, e un sinfín de cousas que non podería recoller nestas liñas). Que sorte coincidir contigo nesta viaxe, espero que non sexa a última. Agora tócanos loitar por a seguinte, pero sei de antemán que o conseguiremos. Moitas gracias ós catro por os momentos compartidos todos estes anos.

I would like to thank all the colleagues from the Wilson Lab- York University who welcomed me warmly during my stay in Toronto. I especially wanted to thank the kindness and generosity of Dr. Dereck Wilson for allowing me to stay in his laboratory at York University in Toronto. Thanks also to Dr. Peter, who with patience and a kind smile showed me the intricacies of mass spectrometry. And thank you to Cristina, Esther and Luci, for giving me so many fun and endearing moments. E, por suposto, grazas Marta, esta estadía non tería sido o mesmo sen ti. Grazas por ser a mellor compañeira de viaxes que se poida ter, pois aínda que escoitamos tantas veces iso de “*I will try to do my best*” e todo o que supoñía, sempre mantivemos a calma é acabábamnos rindo coma nunca.

Nesta Tese tamén quería adicar un agradecemento especialmente ós meus amigos, que fixeron destes anos unha experiencia marabillosa. Gustaríame darlle as gracias a todos os meus compañeiros de bioloxía, en especial a Sandra e Lara, porque con vós, xuntarnos, sempre é unha aventura (literal); a Sabela, por ser un apoio constante, por a túa amabilidade e humildade e por compartir comigo tantos momentos “*viejoven*” que tanto nos gustan; e a ti Laura, por ser o exemplo de que a distancia non importa, vía *online* ou presencial, sempre farás que acabe o día cunha sonrisa na cara. Grazas por as túas conversacións de horas e por sempre estar.

Grazas Mónica, a miña gaditana favorita, por compartir comigo o teu optimismo, a túa visión da vida tan bonita e a túa alegría. Gracias por facerme ver que a distancia non importa e que volver o sur, é volver a casa. E a miña mostoleña Amara, gracias por as largas conversacións, o teu apoio e as reflexións sobre a vida que tanto me gusta compartir contigo.

Marta, gracias por ser a dulzura personificada e ter sempre unha sorriso e tempo para min. Esas longas conversacións por Orzán ou por

Santiago lévomas como tesouros en frascos pequenos. E a ti Ainara, grazas pola túa amizade. Grazas por empuxarme e animarme a seguir adiante, pola comprensión absoluta, por ser esa persoa que sempre está cando se necesita e porque o final, co teu apoio, “todo sempre acaba fluíndo”. Grazas a ambas, por tantos anos xuntas e moitos máis que virán.

Por último, gustaríame tamén dar as grazas ás persoas coas que convivín, e fixeron que volver a casa, sempre fora chegar a un fogar. A ti Camino, grazas por regalarme unha segunda convivencia contigo e por compartir a túa risa comigo, que alegraban ata os días máis “*crunchi, crunchi*”. A ti Vittoria, por traer un pouco de Nápoles a nosa casa, por ser unha fonte inesgotable de risas e porque se teño que pensar en alguén con quen vivir outra cuarentena volvería ser contigo e con Sara. Gracias por estes anos. Que saibas, que sempre que Vittoria pregunte, Raquel contestará. E a ti Sara, dar as grazas quédase curto. Que dicirche a ti se xa pensamos como unha mesma persoa. Grazas por estar sempre, por ser alguén a quen contarlle todo e sentir que eres casa, grazas polas longas conversacións sobre calquera tema e tantas e tantas risas, grazas por ser un exemplo de xenerosidade e humildade (non sabes canto teño aprendido de ti) e grazas por presentarme a xente tan marabillosa como Celia, Alejandra e Sarai. E en especial quero agradecer a Sarai, a túa honestidade e o teu cariño, que saibas que espero seguir tendo longas charlas contigo sobre temas de conversación moi aleatorios, moitos anos máis (intentarei que non sexan a hora da sesta, que xa sabemos o que pasa).

Por último, esta Tese quería agradecerlla a miña familia. A Maite e a Juan, por ser un apoio absoluto nesta etapa da miña vida, por ser serenidade e alegría. Grazas por saber que sempre vos terei aí. Así mesmo, esta Tese quería non só agradecerlla senón dedicarlle ós meus pais. A ti papá e mamá, gracias por o voso cariño, apoio e ánimo incondicional. Grazas por ser co voso exemplo un referente de humildade, traballo e bondade. Oxalá algún día esteades a metade de orgullosos de min do que estou eu de que sexades os meus pais. Esta Tese Doutoral é por e para vós.

Gracias de todo corazón, a todos os que estivestes nesta viaxe.



Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria (INIA, RTA 2014-00034-C04), España; y por la Xunta de Galicia y la Unión Europea (ESF) para la beca predoctoral de Raquel Rodríguez Vázquez.





ABREVIATURAS

2-DE PAGE:	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Two-dimensional electrophoresis</i>)
2-DE:	Electroforesis bidimensional (<i>Two-dimensional electrophoresis</i>)
ANOVA:	Análisis de la varianza (<i>Analysis of Variance</i>)
AV:	Asturiana de los Valles
BSA:	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDA:	Análisis discriminante canónico (<i>Canonical Discriminant Analysis</i>)
CI:	Intervalo de confianza (<i>Confidence Interval</i>)
CK:	Creatina quinasa (<i>Creatine Kinase</i>)
CLA:	Ácido linoleico conjugado (<i>Conjugated linoleic acid</i>)
D.O.P.:	Denominación de Origen Protegida (<i>Protected Designation of Origin</i>)
DFD:	Oscura, firme y seca (<i>Dark, Firm, Dry</i>)
DTT:	Ditiotreitol (<i>Dithiothreitol</i>)
E.T.G.:	Especialidades Tradicionales Garantizadas
E:	Extensivo (<i>Extensive</i>)
ESI:	Ionización por electroespray (<i>Electrospray Ionization</i>)
FAME:	Ácidos grasos metil ésteres (<i>Fatty acids methyl esters</i>)
FAOSTAT:	Bases de datos de alimentación y agricultura de organización estadística (<i>Food and Agriculture Organization Statistical Database</i>)

FC:	<i>Fold Change</i>
FDR:	Tasa de falso descubrimiento (<i>False discovery rate</i>)
FF:	Alimentación de acabado (<i>Finishing feeding</i>)
FWHM:	Anchura a media altura (<i>Full Width at Half Maximum</i>)
GLM:	Modelo general lineal (<i>General Linear Model</i>)
GO:	Ontología Génica (<i>Gene Ontology</i>)
HSP:	Proteínas de choque térmico (<i>Heat shock proteins</i>)
I.G.P.:	Indicación Geográfica Protegida (<i>Protected Geographical Indication</i>)
I:	Intensivo (<i>Intensive</i>)
IEF:	Isoelectroenfoque (<i>Isoelectrofocusing</i>)
IMAC:	Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>)
IMF:	Grasa intramuscular (<i>Intramuscular fat</i>)
IPG:	Gradiente de pH inmovilizado (<i>Immobilized pH gradient</i>)
iTRAQ:	Etiqueta isobárica para cuantificación relativa y absoluta (<i>Isobaric tag for relative and absolute quantitation</i>)
LC-MS/MS:	Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LSM:	Media de mínimos cuadrados (<i>Least-square mean</i>)
LT:	<i>Longissimus thoracis et lumborum</i>
MALDI:	Desorción/Ionización láser asistida por matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
M_r:	Masa molecular relativa (<i>Relative molecular mass</i>)

MS:	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)
MUFA:	Ácido graso monoinsaturado (<i>Monounsaturated fatty acid</i>)
PAC:	Política Agrícola Común (<i>Common Agricultural Policy</i>)
PCA:	Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Analysis</i>)
pI:	Punto isoeléctrico (<i>Isoelectric point</i>)
pQTL:	Loci proteicos de caracteres cuantitativos (<i>Protein quantitative trait loci</i>)
PS:	Sistema de producción (<i>Production Systems</i>)
PSE:	Pálida, blanda y exudativa (<i>Pale, soft, exudative</i>)
PTM:	Modificación postraduccional (<i>Post-translational modification</i>)
PUFA:	Ácido graso poliinsaturado (<i>Polyunsaturated fatty acid</i>)
QD:	Distancia cuantitativa (<i>Quantitative Distance</i>)
QDA:	Análisis descriptivo cuantitativo (<i>Quantitative descriptive analysis</i>)
QTL:	Loci de caracteres cuantitativos (<i>Quantitative trait loci</i>)
RC:	Cambio relativo (<i>Relative Change</i>)
RE:	Retinta de Extremadura
RG:	Rubia Gallega
ROS:	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
SDS:	Dodecil sulfato de sodio (<i>Sulphate Dodecyl Sodium</i>)

SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (<i>Sulphate Dodecyl Sodium-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SE:	Error estándar (<i>Standard Error</i>)
SFA:	Ácido graso saturado (<i>Saturated fatty acid</i>)
SNP:	Polimorfismo de nucleótido único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SWATH:	Adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de fragmentos de iones teóricos (<i>sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra</i>)
TBA:	Ácido Tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid</i>)
TBARS:	Substancias Reactivas del ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substance</i>)
TOF:	Tiempo de vuelo (<i>Time of Flight</i>)
TPA:	Análisis de perfil de textura (<i>Texture Profile Analysis</i>)
UPGMA:	Método de grupo de pares no ponderado con promedio aritmético (<i>Unweighted pair-group method with arithmetic mean</i>)
WBSF:	Fuerza de cizalla Warner-Braztler (<i>Warner-Braztler shear force</i>)
WHC:	Capacidad de retención de agua (<i>Water Holding Capacity</i>)



RESUMEN



RESUMEN

La carne de vacuno es una de las principales fuentes de proteínas de alta calidad estableciéndose como uno de los productos pecuarios de mayor valor nutricional. En concreto, tres de las razas bovinas autóctonas españolas más importantes en la industria cárnica son la Asturiana de los Valles (AV), la Retinta de Extremadura (RE) y la Rubia Gallega (RG). Factores como el sistema de producción, el tipo de alimentación o la maduración pueden influir en la calidad de la carne. La evaluación del peso de estos efectos sobre parámetros fisicoquímicos, sensoriales o nutricionales permite obtener una visión general sobre la calidad de la carne, la cual tendrá una fuerte influencia en la percepción final del consumidor, que afectará a su decisión de compra. Décadas de estudio han permitido obtener un conocimiento más profundo de como estos factores extrínsecos e intrínsecos afectan a la calidad de la carne. Sin embargo, los trabajos orientados a un estudio simultáneo de la influencia de estos son todavía escasos. La raza es uno de los factores más importantes, ya que muchos de los atributos de calidad de carne están influenciados por variaciones en el proteoma, mostrando diferencias entre las poblaciones. Las distancias proteómicas pueden ser una poderosa herramienta para evaluar la diversidad proteómica y diferenciación del genoma funcional entre poblaciones. Sin embargo, solo unos pocos estudios han usado las distancias proteómicas cualitativas entre perfiles proteómicos basadas en proteínas compartidas y no compartidas, las cuales presentan la desventaja de no considerar las diferencias de abundancia entre las proteínas. Según nuestro conocimiento, no hay estimaciones de distancias basadas en la abundancia diferencial de proteínas entre perfiles proteómicos a nivel cuantitativo para esas razas. Asimismo, las tecnologías proteómicas son una importante herramienta para identificar biomarcadores diagnósticos/trazabilidad de la carne de diferentes razas de *Bos taurus*, permitiendo obtener marcadores para las variaciones de la calidad de la carne entre razas. Estos avances recientes en el área de la proteómica en la búsqueda de biomarcadores también son de gran utilidad para evaluar cómo afecta el estrés pre-sacrificio en la calidad de la carne de vacuno.

Este trabajo tiene por objetivos la evaluación de diferentes sistemas de producción y la alimentación de acabado de terneros de raza Rubia Gallega en términos de la calidad de la carne; el estudio de los parámetros fisicoquímicos y perfil sensorial de la carne de terneros de las razas AV, RE y RG criados bajo diferentes sistemas de producción (extensivo e intensivo), condiciones de manejo pre-sacrificio (mezcla y no-mezcla con individuos no familiares a tiempo *pre-mortem*) y el efecto del tiempo de maduración (7 y 14 días); la estimación de las distancias proteómicas cuantitativas (mediante la medida *QD*, *quantitative distance*) entre estas tres razas bovinas españolas a partir de los perfiles de la electroforesis bidimensional (2-DE) acoplada a la espectrometría de masas (MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF) en muestras del músculo *longissimus thoracis* (2 h *post-mortem*), la identificación de biomarcadores diagnóstico de la calidad carne para AV, RE y RG y la evaluación bibliográfica sobre el uso de la proteómica para predecir la calidad de carne de ternera, cerdo y pollo relacionada con el bienestar animal. Los resultados del estudio de la influencia de los sistemas de producción y la dieta de acabado en la raza RG demostraron que la carne de los terneros criados en sistemas extensivos son los más saludables, respecto al contenido total de grasa y la composición de ácidos grasos en concordancia con los requerimientos de los consumidores. Por otra parte, los análisis sensoriales y fisicoquímicos en la carne de las tres razas bovinas mostraron que la raza es el factor de mayor efecto, permitiendo la diferenciación entre AV, RE y RG cuando se emplean métodos factoriales de reducción como componentes principales y análisis discriminantes. Además, el sistema de producción fue el segundo parámetro más importante, afectando al olor, sabor y perfil textural. Esta diferenciación entre razas también se demostró a nivel proteómico a través de los resultados de las distancias cuantitativas usando la nueva medida *QD*. Esta primera evidencia de la distancia *QD* entre poblaciones, reveló que las mayores distancias, estadísticamente significativas, tiene lugar entre AV/RG y la raza RE. En total, 18 proteínas/isoformas miofibrilares y sarcoplásmicas (identificadas por MS en tándem) con diferencias en abundancia fueron las que contribuyeron a las distancias proteómicas entre las razas. La cadena

ligera regulatoria de miosina esquelética rápida 2, seguida de otras cinco proteínas de interacción, exhibieron los cambios relativos más pronunciados entre razas. Además, la mayoría de las proteínas con representación diferencial pueden ser asociadas con variaciones de terneza en la carne. Por lo tanto, dichas proteínas podrían ser biomarcadores candidatos para programas de mejora molecular y autenticación de las tres razas de ganado vacuno española. Además, el estudio de revisión reveló que la proteómica ha desempeñado un papel clave en proveer listas de biomarcadores para el control del bienestar animal a nivel industrial.

Palabras Clave: carne de vacuno, parámetros fisicoquímicos, perfil de ácidos grasos, dieta final, maduración, sabor, olor, textura, proteómica de la carne, proteómica poblacional, medidas de distancia proteómica, medida *QD*, biomarcadores de terneza de la carne de vacuno, biomarcadores de autenticidad de carne de vacuno, estrés, ontología génica, metaproteómica.



ABSTRACT

Beef is one of the main sources of high-quality protein, establishing itself as one of the livestock products with the highest nutritional value. Specifically, three of the most important Spanish native cattle breeds in the meat industry are Asturiana de los Valles (AV), Retinta de Extremadura (RE) and Rubia Gallega (RG). Factors such as the production system, the type of feeding or the maturation can influence the quality of the meat. The evaluation of the weight of these effects on physicochemical, sensory or nutritional parameters allows to obtain an overview of the quality of the meat, which will have a strong influence on the final perception of the consumer, which will affect their purchase decision. Decades of study have allowed us to obtain a deeper understanding of how these extrinsic and intrinsic factors affect the quality of meat. However, studies aimed at a simultaneous study of these are still scarce. Breed is one of the most important factors, since many of the meat quality attributes are influenced by variations in the proteome, showing differences between populations. Proteomic distances can be a powerful tool to assess proteomic diversity and functional genome differentiation between populations. However, only a few studies have used qualitative proteomic distances between proteomic profiles based on shared and non-shared proteins, which have the disadvantage of not considering differences in abundance between proteins. To our knowledge, there are no estimates of distances based on the differential abundance of proteins between proteomic profiles at the quantitative level for these breeds. Likewise, proteomic technologies are an important tool to identify diagnostic / traceability biomarkers of meat from different *Bos taurus* breeds, allowing to obtain markers for variations in meat quality between breeds. These recent advances in the area of proteomics in the search for biomarkers are also very useful to evaluate how pre-slaughter stress affects the quality of beef.

The objectives of this work are the evaluation of different production systems and the finishing feeding of Rubia Gallega calves in terms of the quality of the meat; the study of the physicochemical parameters and sensory profile of the meat of calves of the AV, RE and

RG breeds raised under different production systems (extensive and intensive), pre-slaughter handling conditions (mixing and non-mixing with unfamiliar individuals to pre-mortem time) and the effect of the maturation time (7 and 14 days); the estimation of the quantitative proteomic distances (by means of the QD measure, quantitative distance) between these three Spanish cattle breeds from the profiles of two-dimensional electrophoresis (2-DE) coupled to mass spectrometry (MALDI-TOF and MALDI-TOF /TOF) in samples of the *longissimus thoracis* muscle (2 h *post-mortem*), the identification of diagnostic biomarkers of meat quality for AV, RE and RG and the bibliographic evaluation on the use of proteomics to predict the quality of beef, pork and chicken related to animal welfare. The results of the study of the influence of the production systems and the finishing diet in the RG breed showed that the meat of the calves reared in extensive systems are the healthiest, with respect to the total fat content and the composition of fatty acids in concordance with consumer requirements. On the other hand, the sensory and physicochemical analyzes in the meat of the three bovine breeds showed that the breed is the factor with the greatest effect, allowing the differentiation between AV, RE and RG when factorial reduction methods are used as main components and discriminant analyzes. In addition, the production system was the second most important parameter, affecting odor, flavor and textural profile. This differentiation between breeds was also demonstrated at the proteomic level through the results of quantitative distances using the new QD measure. This first evidence of the QD distance between populations, revealed that the greatest distances, statistically significant, take place between AV/RG and the RE breed. In total, 18 myofibrillar and sarcoplasmic proteins/isoforms (identified by tandem MS) with differences in abundance were those that contributed to the proteomic distances between the breeds. The fast skeletal myosin regulatory light chain 2, followed by five other interacting proteins, exhibited the most pronounced relative changes between breeds. Furthermore, most proteins with differential representation can be associated with variations in tenderness in meat. Therefore, these proteins could be candidate biomarkers for molecular breeding and authentication programs for the three Spanish cattle breeds.

Furthermore, the review study revealed that proteomics has played a key role in providing lists of biomarkers for the monitoring of animal welfare at the industrial level.

Key Words: beef, physicochemical parameters, fatty acid profile, final diet, maturation, flavor, odor, texture, meat proteomics, population proteomics, proteomic distance measurements, *QD* measure, biomarkers of beef tenderness, beef authenticity biomarkers, stress, gene ontology, metaproteomics





RESUMO

A carne de vacún é unha das principais fontes de proteínas de alta calidade establecéndose como un dos produtos pecuarios de maior valor nutricional. En concreto, tres das razas bovinas autóctonas españolas máis importantes na industria cárnica son a Asturiana dos Valles (AV), a Retinta de Extremadura (RE) e a Rubia Galega (RG). Factores como o sistema de produción, o tipo de alimentación ou a maduración poden influír na calidade da carne. A avaliación do peso destes efectos sobre parámetros fisicoquímicos, sensoriais ou nutricionais permite obter unha visión xeral sobre a calidade da carne, a cal terá unha forte influencia na percepción final do consumidor, que afectará á súa decisión de compra. Décadas de estudo permitiron obter un coñecemento máis profundo de como estes factores extrínsecos e intrínsecos afectan á calidade da carne. Con todo, os traballos orientados a un estudo simultáneo da influencia destes son aínda escasos. A raza é un dos factores máis importantes, xa que moitos dos atributos da calidade de carne están influenciados por variacións no proteoma, mostrando diferenzas entre as poboacións. As distancias proteómicas poden ser unha poderosa ferramenta para avaliar a diversidade proteómica e diferenciación do xenoma funcional entre poboacións. Sen embargo, só uns poucos estudos usaron as distancias proteómicas cualitativas entre perfís proteómicos baseadas en proteínas compartidas e non compartidas, as cales presentan a desvantaxe de non considerar as diferenzas de abundancia entre as proteínas. Segundo o noso coñecemento, non hai estimacións de distancias baseadas na abundancia diferencial de proteínas entre perfís proteómicos a nivel cuantitativo para esas razas. Así mesmo, as tecnoloxías proteómicas son unha importante ferramenta para identificar biomarcadores diagnósticos/ trazabilidade da carne de diferentes razas de *Bos taurus*, permitindo obter marcadores para as variacións da calidade da carne entre razas. Estes avances recentes na área da proteómica na procura de biomarcadores tamén son de gran utilidade para avaliar como afecta o estrés pre-sacrificio na calidade da carne de vacún.

Este traballo ten por obxectivos a avaliación de diferentes sistemas de produción e a alimentación de acabado de tenreiros de raza Rubia

Galega en termos da calidade da carne; o estudo dos parámetros fisicoquímicos e perfil sensorial da carne de tenreiros das razas AV, RE e RG criados baixo diferentes sistemas de produción (extensivo e intensivo), condicións de manexo pre-sacrificio (mestura e non-mestura con individuos non familiares a tempo *pre-mortem*) e o efecto do tempo de maduración (7 e 14 días); a estimación das distancias proteómicas cuantitativas (mediante a medida QD, *quantitative distance*) entre estas tres razas bovinas españolas a partir dos perfís da electroforese bidimensional (2-DE) acoplada á espectrometría de masas (MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF) en mostras do músculo *longissimus thoracis* (2 h *post-mortem*), a identificación de biomarcadores diagnóstico da calidade carne para AV, RE e RG e a avaliación bibliográfica sobre o uso da proteómica para predicir a calidade de carne de tenreira, porco e polo relacionada co benestar animal. Os resultados do estudo da influencia dos sistemas de produción e a dieta de acabado na raza RG demostraron que a carne dos tenreiros criados en sistemas extensivos son os máis saudables, respecto ao contido total de graxa e a composición de ácidos graxos en concordancia cos requirimentos dos consumidores. Por outra banda, as análises sensoriais e fisicoquímicos na carne das tres razas bovinas mostraron que a raza é o factor de maior efecto, permitindo a diferenciación entre AV, RE e RG cando se empregan métodos factoriais de redución como compoñentes principais e análises discriminantes. Ademais, o sistema de produción foi o segundo parámetro máis importante, afectando o olor, sabor e perfil textural. Esta diferenciación entre razas tamén se demostrou a nivel proteómico a través dos resultados das distancias cuantitativas usando a nova medida QD. Esta primeira evidencia da distancia QD entre poboacións, revelou que as maiores distancias, estatisticamente significativas, ten lugar entre AV/ RG e a raza RE. En total, 18 proteínas/ isoformas miofibrilares e sarcoplásmicas (identificadas por MS en tándem) con diferenzas en abundancia foron as que contribuíron ás distancias proteómicas entre as razas. A cadea lixeira regulatoria de miosina esquelética rápida 2, seguida doutras cinco proteínas de interacción, exhibiron os cambios relativos máis pronunciados entre razas. Ademais, a maioría das proteínas con representación diferencial poden ser asociadas con variacións de

terneza na carne. Por tanto, ditas proteínas poderían ser biomarcadores candidatos para programas de mellora molecular e autenticación das tres razas de gando vacún española. Ademais, o estudo de revisión revelou que a proteómica desempeñou un papel cruce en prover listas de biomarcadores para o control do benestar animal a nivel industrial.

Palabras chave: carne de vacún, parámetros fisicoquímicos, perfil ácidos graxos, dieta final, maduración, sabor, olor, textura, proteómica da carne, proteómica poboacional, medidas de distancia proteómica, medida *QD*, biomarcadores de terneza da carne de vacún, biomarcadores de autenticidade de carne de vacún, estrés, ontoloxía xénica, metaproteómica.







ÍNDICE



ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 ORIGEN, DOMESTICACIÓN E I.G.P. DE LAS RAZAS	
BOVINAS.....	3
1.1.1 Asturiana de los Valles	5
1.1.2 Retinta	5
1.1.3 Rubia Gallega.....	6
1.2 FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA CARNE.....	7
1.2.1 Sistemas de producción y alimentación	7
1.2.1.1 <i>Sistema de producción extensivo</i>	8
1.2.1.2 <i>Sistema de producción intensivo</i>	8
1.2.1.1 <i>Sistema de producción semiextensivo</i>	9
1.2.1.2 <i>Sistema de producción tradicional</i>	10
1.2.2 Condiciones de manejo pre-sacrificio.....	11
1.2.3 La maduración	12
1.2.4 El estrés y el bienestar animal.....	13
1.3 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LA CALIDAD DE LA	
CARNE	14
1.3.1 pH.....	14
1.3.2 Color	16
1.3.3 Capacidad de retención de agua.....	17
1.3.4 Textura de la carne.....	18
1.3.5 Oxidación lipídica y proteica	19
1.3.6 Composición química	20
1.4 ÁCIDOS GRASOS.....	21
1.5 ANÁLISIS SENSORIAL DE LA CALIDAD DE LA CARNE	23
1.6 PROTEÓMICA.....	25

1.7	PROTEÓMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA CARNE: VISIÓN GENERAL	28
1.8	PROTEÓMICA COMPARATIVA: DIFERENCIACIÓN BOVINA ENTRE RAZAS	29
1.9	DISTANCIAS PROTEÓMICAS	31
1.10	APLICACIÓN PROTEÓMICA RELACIONADA CON EL BIENESTAR ANIMAL Y LA CALIDAD DE LA CARNE	33
2	OBJETIVOS	37
3	CAPÍTULO I: INFLUENCIA DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN Y LA ALIMENTACIÓN DE ACABADO EN LA CALIDAD DE LA CARNE DE TERNEROS DE RAZA DE RUBIA GALLEGA	43
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1.1	Diseño experimental y manejo animal	43
3.1.2	Color, capacidad de retención de agua y textura instrumental	45
3.1.3	Perfil de ácidos grasos e índices	46
3.1.4	Análisis sensorial de la carne	47
3.1.5	Análisis estadístico	48
3.2	RESULTADOS.....	49
3.2.1	Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en los parámetros fisicoquímicos de la carne	49
3.2.2	Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en la capacidad de retención de agua, fuerza de corte y el análisis de perfil de textura en la carne	51

3.2.3	Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en el perfil de ácidos grasos de la carne	53
3.2.4	Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en los parámetros sensoriales de la calidad de la carne	57
3.2.5	Análisis discriminante.....	59
3.3	DISCUSIÓN	62
3.3.1	Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en los parámetros fisicoquímicos de la carne	62
3.3.2	Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en la capacidad de retención del agua, fuerza de corte y el análisis de perfil de textura en la carne.....	63
3.3.3	Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en el perfil de ácidos grasos de la carne	64
3.3.4	Influencia de sistema de producción y de la alimentación de acabado en los parámetros sensoriales de la calidad de la carne	68
3.3.5	Análisis discriminante.....	70
4	CAPÍTULO II: ANÁLISIS SENSORIAL Y FISICOQUÍMICO DE LA CARNE DE RAZAS BOVINAS EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN, CONDICIONES MANEJO PRE-SACRIFICIO Y TIEMPOS DE MADURACIÓN	73

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
4.1.1 Animales y muestreo	73
4.1.2 Análisis fisicoquímico	75
4.1.3 Análisis sensorial.....	76
4.1.4 Análisis estadísticos	77
4.2 RESULTADOS.....	78
4.2.1 Efecto de la raza, sistema de producción y manejo pre-sacrificio en los parámetros fisicoquímicos de la carne	78
4.2.2 Efecto de la raza, sistema de producción y manejo pre-sacrificio en los atributos sensoriales de la carne	81
4.2.3 Análisis discriminante de componentes principales para el factor raza	84
4.3 DISCUSIÓN.....	90
4.3.1 Efecto de la raza, sistema de producción y el manejo pre-sacrificio en los parámetros fisicoquímicos de la carne	90
4.3.2 Efectos de la raza, sistema de producción y manejo pre-sacrificio en los atributos sensoriales de la carne.....	92
4.3.3 Análisis discriminante de componentes principales para el factor raza	96
5 CAPÍTULO III: MEDIDA DE DISTANCIA PROTEÓMICA CUANTITATIVA ENTRE CARNE DE RAZAS BOVINAS ESPAÑOLAS.....	101
5.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
5.1.1 Razas bovinas y muestras de carne	101
5.1.2 Extracción de proteínas y cuantificación.....	102
5.1.3 Electroforesis bidimensional	102
5.1.4 Análisis de imagen	103
5.1.5 Identificación proteica por espectrometría de masas	104

5.1.6	Análisis estadístico.....	105
5.1.7	Medidas de las distancias proteómicas	106
5.1.8	Análisis bioinformático.....	106
5.2	RESULTADOS	109
5.2.1	Comparación de perfiles de 2-DE entre las razas bovinas	109
5.2.2	Identificación de las proteínas con cambios diferenciales	113
5.2.3	Cuantificación del grado de cambio en la abundancia de proteínas entre las razas	122
5.2.4	Análisis bioinformático de las proteínas identificadas	124
5.2.5	Distancia proteómica entre razas	126
5.3	DISCUSIÓN	129
5.3.1	Estimación de las distancias proteómicas entre las razas bovinas	129
5.3.2	Identificación de proteínas que contribuyen a la distancia proteómica entre las razas y posibles proteínas candidatas a biomarcadores para caracteres de la calidad de la carne	130
5.3.3	Identificación de biomarcadores candidatos de proteínas para la autenticación de las tres razas de carne de vacuno española.....	132
6	CAPÍTULO IV: APLICACIÓN PROTEÓMICA PARA PREDECIR LA CALIDAD DEL ALIMENTO RELACIONADO CON EL BIENESTAR ANIMAL. REVISIÓN	137
6.1	MATERIALES Y MÉTODOS	137

6.1.1 Metodología de búsqueda bibliográfica	137
6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	139
6.2.1 Indicadores bioquímicos del estrés: cortisol, creatina quinasa y lactato.....	139
6.2.1.1 <i>Cortisol</i>	139
6.2.1.2 <i>Creatina quinasa</i>	140
6.2.1.3 <i>Lactato</i>	140
6.2.2 Enfoque proteómico para controlar la calidad de la carne y la leche en respuesta al estrés	141
6.2.2.1 <i>Carne de vacuno, estrés y proteómica</i>	142
6.2.2.2 <i>Leche de vacuno, estrés y proteómica</i>	146
6.2.2.3 <i>Otras fuentes y estrés en bovinos</i>	147
6.2.2.4 <i>Enriquecimiento funcional para proteínas del tejido muscular</i>	148
6.2.3 Enfoque proteómico para monitorizar la calidad del cerdo en respuesta al estrés.....	149
6.2.3.1 <i>Gen halotano</i>	150
6.2.3.2 <i>Calor térmico</i>	157
6.2.3.3 <i>Manejo pre-sacrificio</i>	157
6.2.3.4 <i>Enriquecimiento funcional de proteínas estresadas en cerdo</i>	158
6.2.4 Enfoque proteómico para monitorizar la calidad del pollo en respuesta al estrés	160
6.2.4.1 <i>Estrés térmico</i>	161
6.2.4.2 <i>Manejo pre-sacrificio</i>	165

7 DISCUSIÓN GENERAL.....	169
8 CONCLUSIONES	177
9 BIBLIOGRAFÍA	183
10 ANEXOS.....	237





INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

1.1 ORIGEN, DOMESTICACIÓN E I.G.P. DE LAS RAZAS BOVINAS

La población de ganado bovino es una de las más importantes en todo el mundo rondando los 1,5 billones de animales en 2018 (FAOSTAT, 2018). La subfamilia Bovinae comprende varias especies domesticadas, siendo *Bos taurus* la más expandida a nivel global (FAO, 2015). Actualmente un total de 1019 razas de ganado local están inscritas en el Banco de Datos Global para Recursos de Animales Genéticos (FAO, 2015). Aunque hoy en día hay controversia sobre el origen de las razas bovinas, se sabe que el ganado fue introducido en Europa durante la revolución de la agricultura en el Neolítico, a través de aquellas razas procedentes del Oriente Próximo. Las razas bovinas europeas alcanzaron la península ibérica, donde tuvieron lugar cruzamientos con animales provenientes del continente africano (Ajmone-Marsan *et al.*, 2010; Beja-Pereira *et al.*, 2006; Decker *et al.*, 2014; Sevane *et al.*, 2015). En concreto los procesos de diferenciación de *Bos taurus*, así como de selección y adaptación a entornos locales, dieron lugar a una amplia gama de razas, como las razas bovinas autóctonas españolas que actualmente se consideran importantes reservorios de una amplia y valiosa variabilidad genética (Beja-Pereira *et al.*, 2006; González-Rodríguez *et al.*, 2017).

Aunque inicialmente las razas bovinas autóctonas españolas estaban orientadas a una triple función (trabajo, producción de leche y carne), hoy en día su mayor actividad reside en la producción de carne (González-Rodríguez *et al.*, 2017). Un total de 46 razas bovinas aparecen registradas en el catálogo de razas de España (MAPAMA, 2020), presentando una gran variabilidad en las características de la canal (Piedrafita *et al.*, 2003) y de la carne al ser criados bajo su sistema de producción típico (López-Pedrouso *et al.*, 2020; Serra *et al.*, 2008). Por otro lado, en el sector de la carne se ha demostrado que los

consumidores están dispuestos a pagar un mayor precio por la misma con el fin de garantizar las máxima cotas de calidad (Lusk *et al.*, 2001; Shackelford *et al.*, 2001).

Desde 1992 la Política Agrícola Común (PAC) promueve la carne de calidad bajo diferentes sellos de calidad como la Denominación de Origen Protegida (D.O.P.), Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) o Especialidades Tradicionales Garantizadas (E.T.G.) (MAPAMA, 2020). El sello de una I.G.P. se caracteriza por presentar alguna característica específica de calidad o de reputación del producto que pueda ser atribuible a su origen geográfico (Europea, 2020; MAPAMA, 2020). En España hay registradas once denominaciones de carne de vacuno I.G.P., de las cuales tanto la I.G.P. Ternera Gallega como la I.G.P. Ternera Asturiana presentan los valores más altos a nivel de comercialización como económicos (Fig. 1) (MAPAMA, 2018). La Ternera Gallega, que puede comercializar animales de la raza Rubia Gallega junto con la Ternera Asturiana, que incluye animales de la raza Asturiana de los Valles y la ternera de Extremadura, donde está presente la raza Retinta, comercializan un 74,69% del total de carnes de vacuno autóctono en España (MAPAMA, 2018). De todas las carnes de vacuno, que se comercializan bajo I.G.P, la de Ternera Gallega destaca por ser la única frente al resto de I.G.P.s que exporta a terceros países (120,00 t). Asimismo, se exporta 521,08 t a nivel de la UE, siendo la única junto a la ternera de Extremadura (que solamente exporta 1,00 t). El resto de las carnes con sello de I.G.P. únicamente comercializan a nivel nacional. Todo esto se traduce en un valor de un total de 150,38 millones de €, para las tres razas, lo que supone el 77,9% sobre el total del valor económico (Fig. 1) (MAPAMA, 2018). Por todo esto, en la presente Tesis Doctoral, se obtuvieron muestras de las razas Rubia Gallega, Asturiana de los Valles y Retinta para la evaluación de calidad de carne a nivel fisicoquímico, sensorial y proteómico, debido a su importancia económica en el ámbito español.

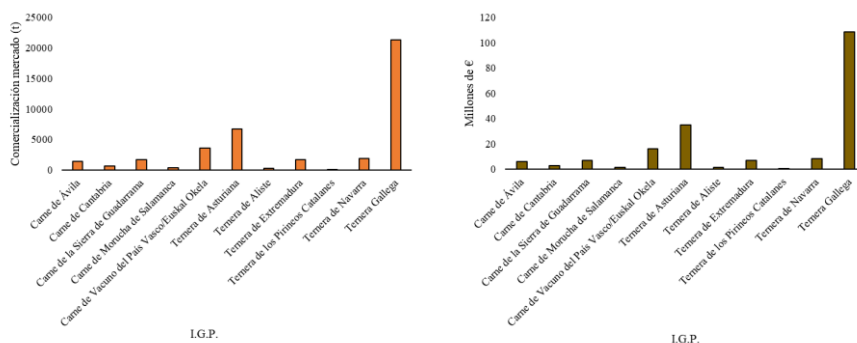


Figura 1. Datos de comercialización de mercado (izq.) y valor económico (dcha.) respecto del total de Carnes de Vacuno autóctono de España (MAPAMA, 2018).

1.1.1 Asturiana de los Valles

Asturiana de los Valles (AV) es una raza de carne de vacuno adaptada a sistemas de producción extensivos en el norte de España (Fig. 2). Esta raza está acogida dentro de la I.G.P. de “Ternera Asturiana”, teniendo una producción de más de 25.000 animales sacrificados por año y un valor económico de 35,05 millones de euros (Fig. 1) (MAPAMA, 2018). Esta raza se caracteriza por presentar un color de pelo castaño (mezclado con pelos negros y rojos), un tamaño medio y un buen desarrollo esquelético y muscular (MAPAMA, 2020). Además, es una raza de maduración tardía con una alta tasa de crecimiento (Albertí *et al.*, 2008), un alto porcentaje muscular (Piedrafita *et al.*, 2003) y un alto nivel de fibras blancas en el músculo *longissimus dorsi* (Gil *et al.*, 2001). Son también animales con alta frecuencia de hipertrofia muscular (fenómeno de doble musculatura) (Oliván *et al.*, 2004) y un bajo nivel de grasa intramuscular (Aldai *et al.*, 2007, 2006).

1.1.2 Retinta

La Retinta (RE) es la raza de carne de vacuno autóctona más importante del suroeste de España (Morales *et al.*, 2013) y se puede

comercializar bajo la denominación I.G.P. de Ternera de Extremadura. Se caracteriza por tener un gran carácter maternal y rústico adaptado a los sistemas de producción extensivos en el ecosistema de las dehesas, los cuales se refieren a pastizales con árboles dispersos, donde los arbustos han sido principalmente eliminados (Bellido *et al.*, 2001; Milán *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2013; Fig. 2). Esta raza se caracteriza por un color de pelo rojo, con tonalidades oscuras y por una gran capacidad corporal (MAPAMA, 2020). Además, la RE es una raza de maduración intermedia (Avilés *et al.*, 2013) que alcanza grandes tamaños cuando crece completamente (Albertí *et al.*, 2005). La carne de esta raza se caracteriza por tener un bajo contenido de grasa intramuscular (2-3%) y un gran contenido en ácidos grasos saludables (Horcada *et al.*, 2016).

1.1.3 Rubia Gallega

La Rubia Gallega (RG) es una de las razas locales más importantes en España, con más de 40.000 cabezas, que se produce en la región de Galicia, al Noroeste de España, y está dentro de la I.G.P. de la “Ternera Gallega” (ACRUGA, 2020). Es una raza que tiene una gran rusticidad, por lo que se ha adaptado a los bosques gallegos, alimentándose de los recursos estacionales y naturales (Domingo *et al.*, 2015; Fig. 2). Se caracteriza por tener principalmente una capa de color rubio uniforme (MAPAMA, 2020). Esta raza se cría a través de una producción tradicional y de explotación familiar basada en el pastoreo, con un ciclo de producción de 7-9 meses de edad por ternero (Bispo *et al.*, 2010a). Además, esta raza se caracteriza por tener una maduración tardía con una gran tasa de crecimiento y un periodo de alimentación de acabado complementado con pienso comercial que produce un bajo nivel de grasa en la canal (Brea *et al.*, 1998; Montserrat & Sánchez, 2000).



Figura 2. Lugar de origen de las razas Asturiana de los Valles (arriba), Rubia Gallega (izq., arriba) y Retinta (izq., abajo).

1.2 FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA CARNE

Como observamos en el apartado anterior, las razas tienen una influencia directa en la calidad de la carne, pero además de los factores genéticos existen otros, entre los que destacan el sistema de producción y la dieta (Dunne *et al.*, 2009; Mennecke *et al.*, 2007), el manejo pre-sacrificio (Grigor *et al.*, 2004; Probst *et al.*, 2013), el tiempo de maduración (Khan *et al.*, 2016) o el estrés pre-sacrificio (Xing *et al.*, 2019).

1.2.1 Sistemas de producción y alimentación

En los últimos años ha habido un incremento en la demanda de productos procedentes del sector ganadero, en especial de aquellos con mayor calidad proteica (Millen *et al.*, 2011; Webb & Erasmus, 2013). Como consecuencia se han producido mejoras significativas en los diferentes sistemas de producción en términos de cruzamiento, alimentación y manejo del ganado con el fin de aumentar la eficiencia en la producción animal (Webb & Casey, 2010). Además, a lo largo del

tiempo, las razas de ganado han sido seleccionadas por su capacidad de adaptación al ambiente y al sistema productivo específico, en el que muestran sus mejores resultados económicos (Guerrero *et al.*, 2013). Debido a las condiciones agroclimáticas en España, los sistemas de producción más comunes son los extensivos, intensivos, semiextensivos y tradicionales (Avilés *et al.*, 2015; Bispo *et al.*, 2010b; García-Torres *et al.*, 2016; Humada *et al.*, 2012; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2020b) (Fig. 3).

1.2.1.1 Sistema de producción extensivo

Los sistemas extensivos se basan en un aprovechamiento de los recursos naturales mediante el pastoreo, a través de las especies ganaderas, normalmente autóctonas. Estas especies son capaces de adaptarse al medio natural, minimizando el uso de productos químicos y permitiendo criarse en este entorno natural (Bellido *et al.*, 2001; Napolitano *et al.*, 2001). En este sistema los terneros permanecen siempre en las praderas, se alimentan de la leche de la madre y de pasto hasta su destete. Entre los 6-8 meses previos al sacrificio los animales pueden ser suplementados con pienso comercial o ensilado (Endres & Schwartzkopf-Genswein, 2018; Guerrero *et al.*, 2013) (Fig. 3).

Este sistema se caracteriza, de manera general, porque no compromete al medioambiente (equilibrio producción-conservación) (Bragaglio *et al.*, 2018; Martín *et al.*, 1997; Toutain *et al.*, 2010), presenta altos niveles de bienestar animal (mayor actividad física, espacio, comportamiento natural etc.) (Del Campo *et al.*, 2008; García-Torres *et al.*, 2016; Marino *et al.*, 2006, Dunne *et al.*, 2011) y necesita un menor aporte de piensos (Del Campo *et al.*, 2008; Nemecek *et al.*, 2011). Sin embargo, su carne presenta un mayor coste (García-Torres *et al.*, 2016).

1.2.1.2 Sistema de producción intensivo

Los sistemas intensivos se basan en una organización en la que los animales son confinados en una alta densidad, y cuya alimentación se

produce a través de piensos comerciales *ad libitum* y cereales de paja, sin acceso a pastos. Este sistema genera una alta producción por unidad de área superficial (García-Torres *et al.*, 2016; Guerrero *et al.*, 2013; Menzi *et al.*, 2013) (Fig. 3).

Se caracteriza a su vez por un mayor impacto en la naturaleza (aporte de subproductos al medio) (Menzi *et al.*, 2013; Scherr & McNeely, 2012, Nemecek *et al.*, 2011), así como problemas relacionados con el bienestar animal (hacinamiento, enfermedades etc.) (Blanco-Penedo *et al.*, 2012). Sin embargo, presenta una alta eficacia en la obtención de carne por espacio/unidad de tiempo/animal (García-Torres *et al.*, 2016, Millen *et al.*, 2011).

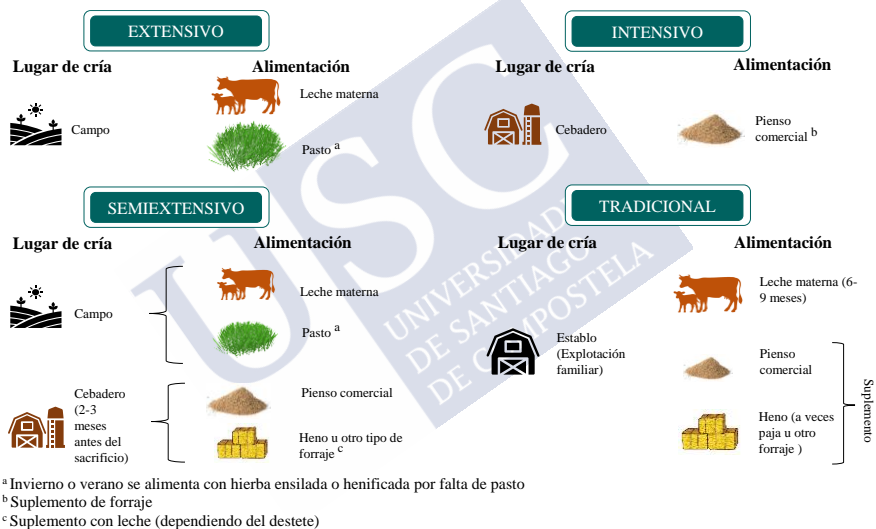


Figura 3. Representación de las características de la cría y alimentación de los sistemas de producción: extensivo (arriba, izq.), intensivo (arriba, dcha.), semiextensivo (abajo, izq.) y tradicional (abajo, dcha.).

1.2.1.1 Sistema de producción semiextensivo

En los sistemas de producción semiextensivos el ganado está bien adaptado al medio ambiente, teniendo acceso al pasto y a los recursos naturales. Los terneros permanecen en el campo con las madres,

alimentándose de la leche materna y de pasto. Sin embargo, estos terneros se trasladan a los cebaderos o son rematados en campo (a los 2-3 meses antes del sacrificio), con pienso comercial (Humada *et al.*, 2014). Además, modalidades alternativas incluyen suplementación con pienso comercial y ensilaje o con recursos de la granja (heno) o leche (dependiendo del destete) durante el periodo de alimentación de acabado (Endres & Schwartzkopf-Genswein, 2018; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2020b). Este sistema de producción cárnica se asocia generalmente con sistemas de producción locales compatibles con las exigencias de la PAC, para combatir la despoblación rural, ayudar a diversificar las actividades agrícolas y aumentar las prácticas respetuosas con el medioambiente (Commision, 2020; Milán *et al.*, 2006) (Fig. 3).

1.2.1.2 Sistema de producción tradicional

El sistema tradicional se basa en vacas que salen en pastoreo y terneros que se destetan sobre los 7 meses de edad y posteriormente son suplementados con pienso comercial o recursos de granja (heno y pienso) en el establo, hasta el sacrificio (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2020b). Los terneros se destetan antes del sacrificio, debido a que el periodo de acabado en el establo dificulta la lactancia materna (Bispo *et al.*, 2010b). Sin embargo, este tipo de sistemas sería insostenibles en animales con edad superior a 12 meses. Debido a esto se desarrollan alternativas sostenibles en sistemas de pastoreo que permiten un menor coste de alimentación y manejo (Brea *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 2006; Varela *et al.*, 2004). Estas alternativas permiten aumentar el tamaño del rebaño siguiendo la normativa de la UE permitiendo la cría de los animales en un ambiente más natural (Decision 97/182/EC, Directive 97/2/EC). En concreto, la raza Rubia Gallega se ha criado en el sistema tradicional basado en pequeños rebaños, donde las vacas salen en pastoreo mientras que las crías no se destetan hasta el sacrificio (6-9 meses de edad) y se manejan en el establo, con una lactancia materna y una dieta complementada con pienso comercial (heno y pienso) (Monserrat, 1990; Moreno *et al.*, 2006; Sánchez & Monserrat, 2000) (Fig. 3).

1.2.2 Condiciones de manejo pre-sacrificio

Las condiciones de manejo pre-sacrificio son una de las variables más importantes para el bienestar del ganado y consecuentemente para la calidad de la carne (Grigor *et al.*, 2004; Probst *et al.*, 2013). El manejo pre-sacrificio inadecuado puede conducir a un estrés físico, así como psicológico (Pearce *et al.*, 2011). Este estrés pre-sacrificio se produce durante el transporte: carga, descarga, mezcla con animales no familiares, contacto con el ser humano, privación de agua y comida, cambios sociales etc. (Ferguson & Warner, 2008; Grandin, 1997; Mouzo *et al.*, 2020; Pearce *et al.*, 2011; Van De Water *et al.*, 2003). Todos estos escenarios conducen a cambios en la homeostasis de los animales, los cuales pueden reaccionar de manera diversa dependiendo de factores intrínsecos (ej. genéticos, edad, sexo, estado psicológico etc.) o por conductas de aprendizaje (Ferguson & Warner, 2008).

El estrés que se origina durante el manejo pre-sacrificio provoca cambios en la calidad de la carne, tanto a nivel de parámetros fisicoquímicos como sensoriales, y, por consiguiente, un incremento en las pérdidas económicas (Grandin, 2007). Una de las condiciones de manejo pre-sacrificio que puede afectar a la calidad de la carne es la mezcla o no mezcla con individuos no familiares, como se ha estudiado en la presente Tesis. En el periodo *ante mortem*, durante el transporte, el ganado suele mezclarse con animales que no son de la misma explotación (no familiares), para homogenizar los lotes por peso antes del sacrificio (Appleby *et al.*, 2008; Šimová *et al.*, 2016). Sin embargo, esto puede afectar a los animales, en especial al ganado vacuno, pues este necesita una zona de escape entre 150 a 170 cm para sentirse seguro (Moran, 2002). Además, el ganado tiene una gran memoria jerárquica que le permite recordar su posición exacta entre 50 y 70 animales (Fraser & Broom, 1990). Esto provoca que el reagrupamiento social puede ser un factor estresante en los mataderos que afecta al bienestar animal (von Holleben *et al.*, 2003). El hecho de mezclar animales no familiares durante el transporte, provocando la disrupción jerárquica y nuevas situaciones, causa estrés en el ganado (Miranda-de la Lama *et al.*, 2014).

En las reses de vacuno se comprobó que el reagrupamiento de grupos provocaba un aumento en las interacciones sociales (con un incremento de conductas agresivas, de comportamientos sexuales y exploratorios) (Tarrant, 1990). En otras especies como el cerdo, se observó que la mezcla con otros cerdos no familiares aumentaba sus comportamientos agresivos, conduciendo a un aumento de biomarcadores de estrés como el cortisol, lactato, glucógeno, etc. (D'Eath *et al.*, 2010; Dokmanovic *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la mezcla de vacuno con animales no familiares se traduce en una situación estresante, donde la dominancia por la jerarquía está presente, provocando carnes defectuosas, conocidas como carnes DFD (*dark, firm, dry*) (Warriss, 2000). La forma en la que vayan a responder ante este factor estresante va a estar influenciado no solo por la edad, categoría y sexo del animal, sino también por su temperamento y raza (Šímová *et al.*, 2016). De ahí la importancia de poder conocer cómo responde cada tipo de raza bovina ante la mezcla y no mezcla de animales.

1.2.3 La maduración

La maduración (*ageing*) es un proceso en el cual las piezas cárnicas son almacenados durante un tiempo específico bajo unas condiciones de refrigeración controladas, para que se produzca la conversión del músculo en la carne (Khan *et al.*, 2016). Usualmente se emplean dos tipos comerciales de maduración de la carne: en seco o en húmedo. En el primero la carne se madura en condiciones refrigeradas sin envasar mientras que en el segundo es envasada al vacío y almacenada (Smith *et al.*, 2008). Ambas presentan diferencias a nivel fisicoquímico y sensorial y microbiológico como se recoge en la revisión de Khan *et al.* (2016). La maduración permite mejorar muchas de las propiedades de la carne de vacuno, como son la terneza y el sabor, lo que afectará positivamente a la satisfacción del consumidor (Dashdorj *et al.*, 2016).

En la maduración de la carne ocurren procesos proteolíticos *post-mortem* que provocan la degradación de proteínas miofibrilares en los músculos de tejido conectivo, así como otros cambios enzimáticos. Estos fenómenos provocan un aumento de la terneza (Khan *et al.*, 2016,

Destefanis *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2013; Leroy *et al.*, 2004), de la capacidad de retención del agua (Bruce *et al.*, 2004; Dashdorj *et al.*, 2016; Koutsidis *et al.*, 2008), cambios en el color (Jayasooriya *et al.*, 2007) y a nivel sensorial como puede ser en el sabor, jugosidad, salinidad o sabor a tostado, entre otras (Dashdorj *et al.*, 2016; Gorraiz *et al.*, 2002; Irurueta *et al.*, 2008). La degradación lipídica facilita la hidrólisis y oxidación de los ácidos grasos, dando lugar a peróxidos que reaccionan con péptidos formando compuestos aromáticos (Zhou & Zhao, 2007), que aumentan durante la maduración. La formación de péptidos durante el proceso de maduración favorece el desarrollo de precursores del sabor y la evolución de sabores (Koochmaraie *et al.*, 1988; Troy & Kerry, 2010). Por eso se ha demostrado un aumento de la intensidad general del sabor, del sabor uniforme, así como un aumento del sabor ácido cuanto mayor sea la maduración (Smith *et al.*, 1978; Spanier *et al.*, 1997). Si bien es necesaria la oxidación lipídica pues conduce a productos que pueden reaccionar con otros de degradación proteica, aumentando la intensidad de sabor de la carne madura, un exceso de oxidación puede dar lugar a carbonilos provocando el efecto contrario de un sabor menos deseable (ej. sabor metálico) (Yancey *et al.*, 2005).

Otros factores *pre-mortem* que afectan al proceso de maduración y consecuentemente al producto final son la raza, el sexo, la dieta, el tipo de músculo etc. (Khan *et al.*, 2016; Monsón *et al.*, 2005). Factores como la raza o la dieta influyen de manera directa en cuanto a diferencias en cantidad y solubilidad del colágeno, tipo y cantidad de grasa etc. Esto afectará al tiempo de maduración necesario, debido a que, dependiendo de la composición de esta, se necesitará más o menos maduración (Li *et al.*, 2014; Monsón *et al.*, 2005; Van Ba *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 1996).

1.2.4 El estrés y el bienestar animal

En los últimos años, la actitud de los consumidores hacia los animales de granja está cambiando, especialmente en los países occidentales, donde cada día se preocupan más por las condiciones de la cría de animales. De hecho, el bienestar animal y las cuestiones relacionadas con las prácticas agrícolas éticas son cada vez más

apreciadas. Este hecho podría contribuir a la disminución de la demanda de carne y al aumento de consumidores vegetarianos en los últimos años (De Backer & Hudders, 2015).

El estrés se define como el estado alterado que presenta un animal a nivel emocional, de comportamiento y fisiológico al enfrentarse a una situación que difiere de su estado habitual y es percibida como amenazadora. Se pueden clasificar en dos tipos, el estrés psicológico, desarrollado por factores como el manejo, la separación del grupo social, contacto con nuevos individuos etc.; y el estrés físico, provocado por factores como la deshidratación, hambre, fatiga etc. (Terlouw *et al.*, 2008).

Independientemente del tipo de estrés que sufra el animal, este puede tener consecuencias adversas en la industria cárnica, porque podrían afectar a los procesos bioquímicos durante la transformación del músculo en carne. Además, se ha demostrado una relación entre el estrés y el sistema inmunológico, por lo que algunos problemas sanitarios relacionado con brotes de enfermedades podrían evitarse mejorando las condiciones higiénicas y de bienestar animal (Xing *et al.*, 2019).

Como resultado de esta creciente toma de conciencia, hay muchas investigaciones en curso que están examinando en detalle los principales factores que provocan estrés ya sean intrínsecos (como el sexo, la genética y la edad) o extrínsecos (como el transporte pre-sacrificio y las actividades de manejo) (Xing *et al.*, 2019). El estrés pre-sacrificio, el cual comprende el período de tiempo desde el momento en el que el animal deja la granja de cría hasta el matadero (Ferguson & Warner, 2008) causa efectos negativos en la calidad de la carne en términos de los parámetros sensoriales, fisicoquímicos y tecnológicos.

1.3 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LA CALIDAD DE LA CARNE

1.3.1 pH

El pH es uno de los parámetros más importantes ya que influye en otros atributos de calidad de la carne como son la capacidad de

retención del agua, el color, el sabor, la ternura etc. (Borggaard, 2014; Hartung *et al.*, 2009). Este parámetro está directamente relacionado con la acidificación de la carne, la cual ocurre durante la conversión del músculo en carne. Este proceso empieza una vez que se sacrifica al animal, cuando la circulación sanguínea cesa y por consiguiente también el aporte de oxígeno y nutrientes. Debido a esto, una vez que acaba la fase de *pre-rigor* (3-6 horas), donde el músculo aún tiene ATP que se sintetiza a partir de la creatina fosfato, el metabolismo cambia de aerobio a anaerobio (D'Alessandro & Zolla, 2013; Lana & Zolla, 2016). La glucólisis anaerobia (a partir del glucógeno) forma ácido láctico que se acumula en el músculo debido a la ausencia de circulación sanguínea. Este proceso provoca una caída de pH, que en el músculo *longissimus thoracis*, pasa de un pH a 24 h *post mortem* de 7,2 a un pHu (último) de 5,5 (Warriss, 2000). El pH < 5,8 se considera normal y da lugar a carnes de alto valor comercial (Romero *et al.*, 2017).

El glucógeno es el principal sustrato metabólico para la acumulación del ácido láctico durante el período *post mortem*. Durante una situación de estrés pre-sacrificio las reservas de glucógeno se consumen antes del sacrificio por lo que disminuye, alterando la acidificación normal de la carne y provocando un pHu mayor que 6,0, obteniéndose carnes defectuosas DFD (*Dark, firm, dry*) (Adzitey & Nurul, 2011; Romero *et al.*, 2017). Se ha observado que el sistema de producción y alimentación afecta al pH, pues diversos estudios muestran como el ganado alimentado en sistemas extensivos presenta mayores valores de pH que aquellos alimentados en sistemas más intensivos, debido a que estos últimos propician un mayor contacto con el ser humano, sufriendo menos estrés pre-sacrificio que aquellos criados en sistemas extensivos, donde sus niveles de glucógeno disminuyen más por el estrés pre-sacrificio conduciendo a un pHu más alto (Muir *et al.*, 1998; Priolo *et al.*, 2001). El pHu puede también estar influenciado por el tipo de raza, pues el distinto temperamento y comportamiento social implica una diferente respuesta al manejo pre-sacrificio y por tanto diferente pHu (Marino *et al.*, 2014).

1.3.2 Color

El color es uno de los factores clave en la toma de decisiones por parte de los consumidores para la compra, pues le permite percibir frescura en la carne y una apariencia saludable (Carpenter *et al.*, 2001; Glitsch, 2000; Muchenje *et al.*, 2009a; Smith *et al.*, 2000).

Este parámetro está influenciado por la concentración y el estado químico de los pigmentos (hemoglobina y mioglobina) y por las propiedades físicas de la carne, como la dispersión de la luz y las propiedades de absorción. La mioglobina es la principal proteína que influye en el color de la carne, estando en una concentración de entre el 50% y el 90% del total de pigmentos musculares (Mancini & Hunt, 2005; Warriss, 2000). Cuando la mioglobina no presenta ligando el hierro hemo está en forma reducida, por lo que se obtiene la deoximioglobina ($\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})$). Esta presenta un color rojo-púrpura o rosa púrpura y ocurre cuando la concentración de oxígeno es muy baja. Una vez que la carne se expone al aire, ocurre un proceso llamado *blooming* u oxigenación, donde se desarrolla un color rojo brillante representativo de la carne fresca. Durante este proceso se oxigena la mioglobina transformándose en oximioglobina ($\text{Fe}^{2+}(\text{O}_2)$). Un tercer paso es la oxidación de la deoximioglobina o la oximioglobina, en forma de metamioglobina ($\text{Fe}^{2+}(\text{OH}^-)$), de color marrón. Otro estado, menos estudiado de la mioglobina es la carboximioglobina, la cual une monóxido de carbono en vez de oxígeno ($\text{Fe}^{2+}(\text{CO})$), obteniendo un color rojo brillante (Fig. 4). La concentración relativa de la deoximioglobina, la oximioglobina y la metamioglobina son los factores que van a afectar en el color de la carne (Mancini & Hunt, 2005; Suman & Joseph, 2013). Para poder determinar el color de la carne es necesario exponer esta durante al menos una hora al aire (López-Bote, 2017; Warriss, 2000). El color de la carne se ve afectado por muchos factores, como los asociados con el manejo, la dieta y la genética (Faustman & Cassens, 1990).

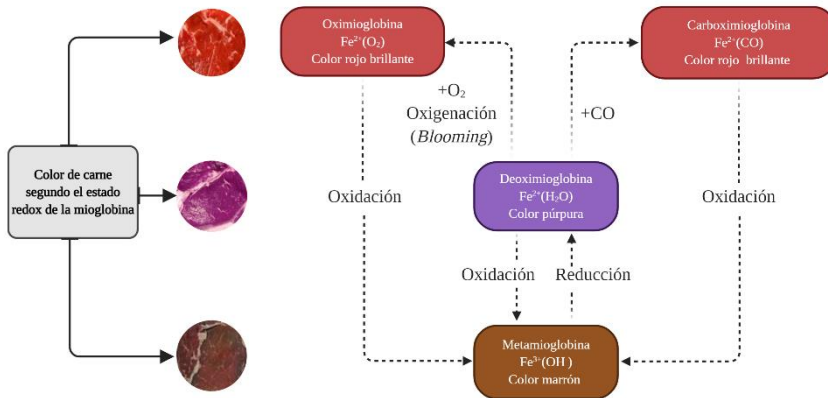


Figura 4. Esquema del color de la carne y del estado redox de la mioglobina.

1.3.3 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua o WHC (abreviado en inglés *Water Holding Capacity*), es definida como la capacidad de la carne o algún producto cárnico para retener el agua después de aplicar algún tipo de fuerza (picar, rebanar y cortar) (Bowker, 2017; Pearce *et al.*, 2011; Warner, 2017). Este parámetro está relacionado con la aceptabilidad de los consumidores pues afecta a la jugosidad lo que permite obtener mayor valor económico (Warner, 2017). El 75% del músculo está formado por agua que se puede encontrar en tres fracciones diferentes. 1) Agua de unión, que constituye un 1% y que debido al carácter dipolar del agua está estrechamente unida a las proteínas a través de los grupos hidrofílicos cargados de los aminoácidos. Esta fracción tiene una movilidad muy reducida y no se desplaza a otros compartimentos en el músculo incluso aplicando factores externos como pueden ser el calor o el frío. Como consecuencia, esta fracción permanece constante en el músculo *postrigor* y tiene poca influencia en la WHC. 2) Agua inmovilizada o atrapada. Esta comprende el 85% del agua total, y se caracteriza por ser agua que es retenida por sus efectos estéricos dentro de la estructura muscular. Esta fracción de agua está sujeta por atracciones débiles entre las proteínas musculares y el agua. Esta agua no tiene una gran

movilidad, pero durante el proceso de conversión del músculo en carne y en la maduración se puede movilizar debido a cambios estructurales de la proteína y del pH. 3) El agua libre es el agua que puede moverse sin obstáculos y está únicamente restringida por las membranas celulares y fuerzas capilares, siendo independiente de los grupos cargados. Esta se puede movilizar fácilmente y perderse durante el procesamiento tecnológico de la carne (Warner, 2017).

Durante la conversión del músculo en carne, muchos procesos bioquímicos y cambios estructurales ocurren en el músculo afectando a la WHC (bajada de pH, desintegración de membranas celulares, degradación de proteínas etc.). Factores como la dieta o el tipo de raza afectan al crecimiento muscular, la fisiología o la composición influyendo indirectamente en la WHC (Bowker, 2017). Para evaluar la WHC se mide la cantidad de agua exudada después de aplicar una fuerza, bien sea natural, externa, o a través de métodos indirectos. Entre los métodos más usados destacan las pérdidas por goteo (*drip loss*) que no aplican una fuerza externa, o bien a través de la aplicación de calor para la determinación de las pérdidas por cocción (*cooking loss*) (Bowker, 2017; Warner, 2017; Warriss, 2000).

1.3.4 Textura de la carne

La textura de la carne y en concreto la ternura es uno de los atributos más valorados de la calidad de la carne por parte del consumidor (Shackelford *et al.*, 2001). La ternura está influenciada por factores inherentes a la propia carne durante el proceso de transformación del músculo en carne como la longitud del sarcómero, la cantidad y composición del tejido conectivo y los cambios proteolíticos (Warriss, 2000). Además de estos factores que afectan durante el acondicionamiento *post mortem* (maduración), existen otros factores con un gran impacto en la ternura como son el genotipo, dieta, sexo, estrés pre-sacrificio, etc. (Hui *et al.*, 2012). Las tasas glucolíticas de los diferentes músculos, el tipo de fibras musculares, el nivel de grasa intramuscular, entre otros, pueden variar dependiendo del tipo de raza y por consiguiente afectar a la ternura.

Los métodos de evaluación de la textura y/o terneza de la carne se pueden realizar a diferentes niveles, ya sea mediante técnicas instrumentales o sensoriales. De entre los métodos instrumentales más usados destacan el método de Warner-Braztler donde se determina la fuerza de corte con una sonda tipo Warner-Braztler (*Warner-Braztler shear force*, WBSF (Honikel, 1997) y también destaca el análisis de perfil de textura (*texture profile analysis*, TPA), que se basa en comprimir la carne con una sonda cilíndrica, simulando una masticación. El TPA permite evaluar diferentes parámetros como son la dureza (la fuerza requerida para alcanzar una determinada deformación), gomosidad (energía necesaria para desmenuzar un alimento semisólido a un estado adecuado para ser deglutido), masticabilidad (energía necesaria para masticar un alimento semisólido a un estado adecuado para ser deglutido), cohesividad (es la fuerza de atracción intramolecular por la que un cuerpo se mantiene unido) o elasticidad (proporción en la que un material deformado vuelve a su estado normal al eliminar la fuerza deformante) (Novaković & Tomašević, 2017).

1.3.5 Oxidación lipídica y proteica

Los procesos de oxidación pueden tener lugar tanto en los lípidos como en las proteínas. Los lípidos son esenciales para la nutrición humana y las características de la calidad carne (Purriños *et al.*, 2011), pero sufren procesos de degradación oxidativa. En este estado de oxidación tienen efectos negativos en el color, textura, olor y sabor o incluso tener compuestos tóxicos (Alfaia *et al.*, 2010; Karre *et al.*, 2013; Pereira & Abreu, 2018; Purriños *et al.*, 2011). La oxidación puede ocurrir por tres vías distintas: autooxidación; enzimática y fotooxidación, siendo la primera una de las más importantes. (Sammet *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2014). La velocidad de inicio de la oxidación se ve afectada por diferentes factores intrínsecos, como son la composición de la carne (en la que el tipo de ácidos grasos (AG) tiene gran peso al ser el sustrato principal de la oxidación lipídica), proteínas hemo, metales etc. (Ahmed *et al.*, 2016; Falowo *et al.*, 2014). Estos factores varían en función del genotipo, sistema de producción, alimentación de acabado

o tipo de musculo (Králová, 2015; Min *et al.*, 2008; Min & Ahn, 2005). También pueden verse afectados por factores extrínsecos, como las condiciones de almacenamiento o tipo de procesado (Chaijan & Panpipat, 2017).

En cuanto a la oxidación proteica esta es definida como la modificación covalente de una proteína provocada por una reacción de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) de manera directa o de manera indirecta por productos secundarios provenientes del estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2013). La oxidación de las proteínas provoca cambios en la propia estructura de esta, cambios en las cadenas laterales de los aminoácidos, formación de carbonilos etc. (Lund *et al.*, 2011; Stadtman, 1990). La formación de carbonilos implica una de las modificaciones más importantes de las proteínas oxidadas, teniendo alto impacto en la calidad de la carne (Estévez, 2011; Stadtman & Levine, 2003; Xiong, 2000).

1.3.6 Composición química

La composición química aproximada de la carne se corresponde a los principales componentes químicos: proteína, lípidos, agua (humedad) y cenizas. Las proteínas que forman sobre el 20 % de la composición química realizan diversas funciones (estructurales, enzimas, contráctiles etc.). Los aminoácidos que componen las proteínas se subdividen en esenciales, las cuales no pueden ser sintetizadas por los animales, y no esenciales, las cuales se pueden sintetizar a partir de una fuente proteica. Los lípidos son una importante fuente de almacenamiento de energía, que también forman parte de las membranas celulares. El contenido en agua se mide por secado a 103-105°C, que causa las pérdidas de agua y algunas otras sustancias volátiles. Por último, las cenizas nos permiten evaluar el contenido mineral inorgánico y se obtienen a través de la incineración de la carne a 550°C una vez que toda la materia orgánica es calcinada (Warriss, 2000).

1.4 ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son moléculas compuestas por cadenas de átomos de carbono de diferentes longitudes con la siguiente estructura $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-COOH}$. La nomenclatura sistemática se fundamenta en base al número de átomos de carbono y el número y posición de dobles enlaces respecto al extremo carboxilo. Otra de las clasificaciones más usadas es el sistema ω o n , en la que se indica la posición del primer doble enlace respecto al grupo metilo (ej. 18:2 n -6; tiene 18 C, y contiene dos dobles, y el primero está en el sexto carbono (C 6) más alejado del grupo metilo). Los ácidos grasos a su vez se clasifican en función de número de dobles enlaces en: 1) Ácidos grasos saturados (SFA, *saturated fatty acid*), los cuales no presentan dobles enlaces, suelen ser volátiles (cadena corta) o sólidos (cadena larga) a temperatura ambiente y representan sobre un 40% en la carne. 2) Ácidos grasos insaturados, que presentan dobles enlaces y los cuales pueden ser líquidos a temperaturas ambiente y se subdividen en, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, *monounsaturated fatty acid*), los que presentan un único doble enlace y representa en la carne un 40%; y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, *polyunsaturated fatty acid*), los cuales tienen más de un doble enlace y representan sobre el 20% del total en la carne y en los cuales normalmente destacan los de tipo n -6 y n -3. A su vez los ácidos grasos insaturados se designan además de según el número de dobles enlaces que tengan, por su disposición, donde hay tipo *cis*, en donde los átomos de H se localizan en la misma dirección o de tipo *trans*, en donde están en posición opuesta (Lobb & Chow C.K., 2007; Wood *et al.*, 2007) (Fig. 5).

El valor nutricional de la grasa es uno de los factores que más preocupan a los consumidores a la hora de evaluar no sólo la calidad de la carne (textura, sabor etc.), sino los beneficios para la salud (Banović *et al.*, 2009; Calkins & Hodgen, 2007). De hecho, la ingesta de SFA está asociada con el aumento de colesterol y lipoproteínas de baja densidad, las cuales son factores causantes de enfermedades cardiovasculares y obesidad (Mapiye *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 2005), mientras que los MUFA y PUFA reducen los niveles de colesterol en sangre (Wood *et al.*, 2007). Las relaciones n -6/ n -3 y

PUFA/SFA son empleadas como los principales indicadores del valor nutricional de la grasa (Simopoulos, 2008), siendo deseables un valor bajo y alto de las relaciones $n-6/n-3$ y PUFA/SFA respectivamente, para reducir la presencia de enfermedades crónicas y de tipo coronario (Moloney *et al.*, 2001; Simopoulos, 2002). Por consiguiente, aquella carne con un contenido graso con mayor cantidad de PUFA (sobre todo ácidos grasos $n-3$) junto con un menor contenido en SFA tendrá efectos positivos en la prevención de enfermedades cardiovasculares y metabólicas, algunos tipos de cáncer y en la obesidad (EFSA, 2010; FAO, 2010). Desde este punto de vista, cambios en la dieta en la producción animal pueden variar el perfil de ácidos grasos de sus productos finales, haciéndolos más saludables (Scollan *et al.*, 2001).

Hay diversos factores que afectan a la composición de los ácidos grasos, como los genéticos, el tipo de músculo, manejo etc. (Martins *et al.*, 2018; Wood *et al.*, 2007). Los sistemas de producción y el tipo de alimentación afectan al contenido y la composición de ácidos grasos de las canales (Varela *et al.*, 2004; Webb & O'Neill, 2008) y de la carne (Wood *et al.*, 2003). Los terneros alimentados con pastos presentan mayor contenido en compuestos de ácidos grasos tipo $n-3$ y más PUFAs así como un bajo contenido en grasa intramuscular (IMF, *intramuscular fat*) y colesterol (Descalzo *et al.*, 2005; French *et al.*, 2000b; Guerrero *et al.*, 2013; Muchenje *et al.*, 2009b; Wood *et al.*, 2008). Los sistemas semiextensivos también proporcionan menor cantidad de SFA y mayores valores de ácidos grasos tipo $n-3$, ácido linoleico conjugado (CLA) y *trans* 11-18:1 (precursor del principal del CLA), considerado como positivos para la salud (Dilzer & Park, 2012; French *et al.*, 2000b; Humada *et al.*, 2012). El CLA es un isómero del ácido linoleico [PUFA tipo $n-6$], que presenta propiedades anticancerígenas y que aumenta la respuesta inmune, reduce la diabetes y aterosclerosis (Tricon & Yaqoob, 2006; Wood *et al.*, 2007), mientras que los animales alimentados con piensos comerciales producen carnes con mayor contenido de grasa intramuscular, MUFA, SFA y una mayor relación $n-6/n-3$, entre otros debido a que los piensos comerciales se basan en la fuente semillas oleaginosas (soja, maíz) que son ricas en 18:2 $n-6$ (Dannenberger *et al.*, 2005; Horcada *et al.*, 2017; Marino *et al.*, 2006; Van Elslyk & McNeill, 2014) (Fig. 5).

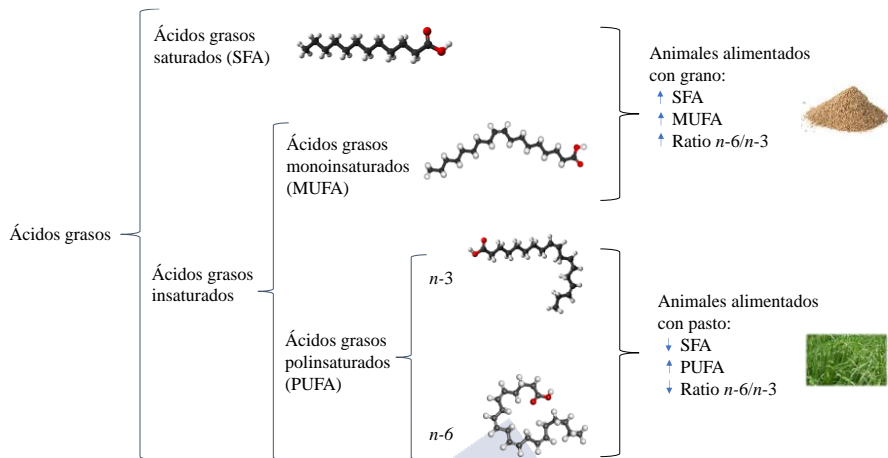


Figura 5. Clasificación de los ácidos grasos y representación de la influencia del tipo de alimentación en la concentración de estos en la carne de vacuno.

1.5 ANÁLISIS SENSORIAL DE LA CALIDAD DE LA CARNE

Dentro del amplio concepto de calidad de la carne, la cual es definida por la calidad composicional (relación magro-graso) y factores de palatabilidad como olor, firmeza, sabor, apariencia, jugosidad y ternura según la FAO, 2020, hay un creciente interés en la mejora de la calidad sensorial. La aceptabilidad sensorial es uno de los principales factores que conciernen a los consumidores y que afectan a sus decisiones de compra (McIlveen & Buchanan, 2001). Desafortunadamente, el perfil sensorial de los productos cárnicos ofrece con frecuencia una gran e incontrolable variabilidad debido a los diferentes factores productivos y tecnológicos, así como a las características intrínsecas de la carne propias de cada individuo. Efectivamente, estudios previos han informado que las características sensoriales de la carne se ven afectadas por factores *ante-mortem* (alimentación, manejo y transporte previo al sacrificio) y *post-mortem* (condiciones de maduración [tiempo y temperatura], envasado y cocinado), que implican una variabilidad significativa (Bonneau & Lebret, 2010; Resconi *et al.*, 2010; Villarroel *et al.*, 2003). Con la finalidad de satisfacer los gustos de los consumidores, no sólo hay que

tener en cuenta los factores psicológicos (creencias y expectativas) y factores ambientales (*marketing*), sino que los factores sensoriales del propio producto son los que más peso tienen (Font-i-Furnols & Guerrero, 2014; Torrico *et al.*, 2018). Por lo tanto, los análisis sensoriales, y en concreto, los análisis descriptivos desarrollados por panelistas calificados (catadores), pueden proveer de información objetiva en sabor, gusto y textura.

Los atributos sensoriales de la carne más importantes son los relacionados con factores organolépticos tales como la apariencia visual, la firmeza, el olor y la percepción en boca en términos de textura y sabor (Fig. 6). (Font-i-Furnols & Guerrero, 2014). Uno de los atributos más importantes es la textura, el cual es un atributo sensorial multiparamétrico conformado por la ternura, jugosidad, untuosidad, fibrosidad, y arenosidad. La ternura (que se define como la facilidad o la dificultad con que se puede masticar o cortar una carne) y la jugosidad (definida como la percepción de humedad durante el consumo) son los atributos más positivamente apreciados (O'Quinn *et al.*, 2012). Además, el sabor y olor de la carne se produce después de un proceso térmico de cocinado en el que los compuestos volátiles son liberados debido a reacciones de la degradación lipídica y de Maillard (Lorenzo & Domínguez, 2014; Miller, 2017). En el ganado estos atributos están influenciados por la genética y la alimentación, por ej. Font-i-Furnols & Guerrero (2014) mostró como animales alimentados en pasto presentan peores sabores que en aquellos con alimentación basada en cereal.

El análisis sensorial se puede realizar a diferentes niveles dependiendo de si las diferencias entre muestras son detectables o no. Si no lo son o quizás sean pequeñas, es recomendable hacer un test discriminante o descriptivo, preferentemente con panelistas, mientras que si lo son es recomendable hacer análisis sensoriales con consumidores (Belk *et al.*, 2015; Miller, 2017). Los atributos sensoriales, están influenciados por la edad del animal, raza, el régimen de alimentación, el manejo pre-sacrificio y la maduración (Moholisa *et al.*, 2017, Aaslyng & Meinert, 2017).

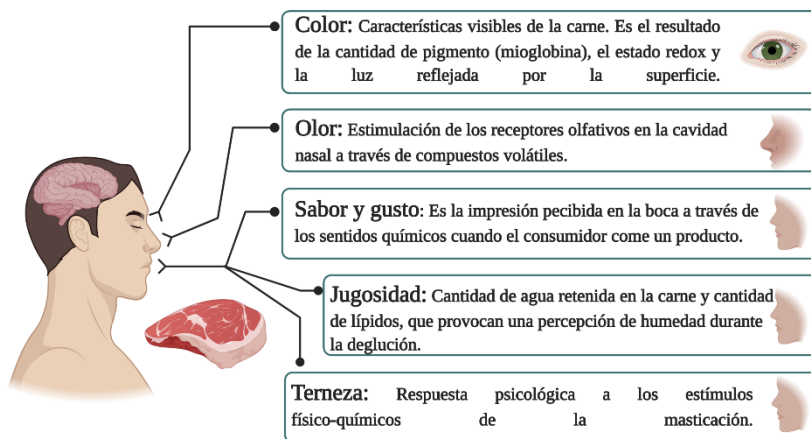


Figura 6. Principales atributos sensoriales que afectan a la aceptabilidad de la carne por parte del consumidor.

1.6 PROTEÓMICA

Las proteínas son las moléculas biológicas más complejas en términos de sus funciones y estructuras. En 1996, Mark Wilkins acuñó el término de proteoma resultante de la combinación de proteína y genoma (Wilkins *et al.*, 1996). Para el análisis del proteoma emergió la ciencia de la proteómica, la cual estudia el complemento entero de las proteínas expresadas en una célula en un tiempo concreto (Bendixen, 2005; Saraswathy & Ramalingam, 2011a; Wilkins *et al.*, 1996). Por otro lado, el proteoma es altamente dinámico, ya que depende del estado del órgano y la célula, en contrapartida el genoma es prácticamente fijo a lo largo de la vida del organismo. Esto hace de la proteómica un campo desafiante, debido a que las proteínas incluyen modificaciones y/o degradaciones, el *splicing* alternativo, interacciones proteína-proteína etc. (Tosto & Reitz, 2016). Por todo esto, la proteómica es altamente compleja debido al gran dinamismo que presentan las proteínas, lo que la hace dividirse en diferentes áreas de estudio: proteómica estructural, funcional, cuantitativa, glucoproteómica, fosfoproteómica, expresión proteómica o clínica (Saraswathy & Ramalingam, 2011a; Tosto & Reitz, 2016).

Uno de los métodos de la proteómica más desarrollados es la electroforesis bidimensional a través de los geles de poliacrilamida (2-DE PAGE), que debido a su reproducibilidad y robustez permite una separación óptima de las proteínas (Baudin, 2012; Mouzo *et al.*, 2018a; O'Farrell, 1975; Saraswathy & Ramalingam, 2011b; Tosto & Reitz, 2016). La electroforesis bidimensional se basa en una separación ortogonal en la que la primera dimensión se produce a través del isoelectroenfoque (IEF) y en la segunda dimensión por medio de geles de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE). La separación de las proteínas en IEF se realiza en función del punto isoelectrónico (pI) y en el SDS-PAGE en función de la masa molecular (M_r) (Baudin, 2012; Saraswathy & Ramalingam, 2011b). El uso de tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) durante la primera dimensión provee resultados más reproducibles ya que el gradiente de pH es fijo (Baudin, 2012; Görg *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 2014). Una vez que las proteínas desnaturalizadas migran a una localización específica en el gel de poliacrilamida, su visualización se realiza a través de tintes tradicionales como azul de *Comassie* o la tinción de plata. Sin embargo, el uso de tintes fluorescentes permite una mejora en la sensibilidad y un mayor rango dinámico a la hora de visualizar las proteínas. La visualización con tintes permite observar diferentes escenarios como el proteoma global (a través de SYPRO Ruby, Flamingo etc.), isoformas, procesos de modificación postraduccional (PTM) (fosforilación o glucosilación, mediante Pro-Diaomond, Pro-Q Esmeralda etc.) etc. (Agrawal & Thelen, 2009; Baudin, 2012; Berggren *et al.*, 2002; Chakravarti *et al.*, 2010; Saraswathy & Ramalingam, 2011b). En los últimos años la espectrometría de masas (MS) acoplada a la 2-DE se ha desarrollado de manera exponencial, permitiendo la identificación de los polipéptidos separados. Esta estrategia consiste en la separación del proteoma de la muestra a analizar a través de 2-DE, procediendo a continuación a la extracción en el gel de los *spots* de la proteína de interés, una posterior digestión (principalmente con tripsina) y finalmente, la identificación de los péptidos obtenidos a través de la MS (Baudin, 2012).

En las últimas décadas, el desarrollo de la proteómica basada en MS permitió ampliar el conocimiento del proteoma desde el punto de

vista descriptivo hasta el cuantitativo (Angel *et al.*, 2012). Existen dos tipos de métodos por los cuales se pueden analizar las biomoléculas, a través de la estrategia *bottom-up*, en la que la mezcla de proteínas se degrada bien enzimática o bien químicamente para obtener péptidos, o por otro lado, la técnica de *top-down*, donde se identifican las proteínas intactas mediante MS (Drabovich *et al.*, 2013). Para el análisis de las proteínas y péptidos se necesita ionizar la carga del analito en la fase gaseosa. En proteómica dos de los principales métodos de ionización que más se utilizan son la ionización por *electrospray* (ESI) y la ionización por desorción laser asistida por matriz (MALDI). Una vez ionizados se analizarán por MS siendo el instrumento TOF (*time of flight*) uno de los más usados en combinación con MALDI, el cual permite evaluar la masa del analito según el tiempo de vuelo de cada ion, desde su aceleración en la fuente hasta el impacto con un detector. Los espectros obtenidos corresponden a péptidos individuales y estos se comparan con bases de datos de secuencias genómicas o proteicas para adquirir las proteínas presentes en la muestra (Drabovich *et al.*, 2013).

En los últimos años ha habido un rápido crecimiento en el campo de la proteómica, en concreto, de técnicas *gel free*; iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*); un aumento en el desarrollo de cromatografía líquida (LC-MS) y en la instrumentación de MS como el *orbitrap* (Baiwir *et al.*, 2018; Hardman & Makarov, 2003; Niessen, 2003; Wood *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de que los métodos de MS intentan desplazar a la técnica basada en geles 2-DE, esta aún tiene un peso muy importante en el campo de la proteómica. La presente técnica tiene ventajas muy importantes frente a la MS como por ejemplo caracterizar las isoformas de las proteínas, modificaciones postraduccionales etc. Además, actualmente emergen nuevas variaciones en este método que potencian la 2-DE (ej. zimografía, análisis proteómico serológico etc.) (Lee *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2014; Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2013).

1.7 PROTEÓMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA CARNE: VISIÓN GENERAL

A lo largo de los últimos años ha habido un gran interés por el uso de las técnicas proteómicas en el área de la ciencia de la carne, puesto que permite, a diferencia de métodos tradicionales, abordar el estudio de grandes cantidades de proteínas de manera simultánea (Hollung *et al.*, 2007; Paredi *et al.*, 2012). Alguno de los propósitos más ilustrativos de la proteómica en esta área fueron, entre otros, el aumento de la calidad de los productos (Hollung *et al.*, 2007), la especificidad de las especies (Picard *et al.*, 2010; Sentandreu & Sentandreu, 2011) o la obtención de alimentos seguros y su autenticación (Paredi *et al.*, 2013; Sentandreu & Sentandreu, 2011), ya que el proteoma es un puente entre el genoma y los caracteres funcionales de la carne. Sin embargo, como se ha visto en esta Tesis, la calidad de la carne es un carácter muy complejo que puede estar influenciado por muchos factores, de ahí que el auge de la proteómica en esta área se haya centrado en el estudio de los mecanismos biológicos que subyacen a estos parámetros con el fin de mejorarlos (D'Alessandro & Zolla, 2012). Entre otros caracteres, se ha intentado encontrar la relación entre el proteoma muscular y el color, la WHC y la terneza (revisados en Gobert *et al.*, 2014; Paredi *et al.*, 2013; Picard & Gagaoua, 2017; Schilling *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015). Asimismo, la proteómica permite comprender las variaciones de proteínas cuya abundancia o nivel de expresión está asociada con un fenotipo de interés y con los procesos bioquímicos de la conversión del músculo en la carne, los cuales acabarán afectando a la textura y a la calidad final de la carne (Gobert *et al.*, 2014; Paredi *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015).

Dos de los objetivos fundamentales de la proteómica en el estudio de la carne son la obtención de un mapa proteómico y la proteómica comparativa, siendo la electroforesis bidimensional una de las metodologías más usadas (Hollung *et al.*, 2007). El primero, se basa en comprender y caracterizar el proteoma presente en una célula, tejido u organismo (Bendixen, 2005). Un ejemplo es la caracterización del proteoma del músculo semitendinoso de la raza bovina Charolesa (Bouley *et al.*, 2004) o la identificación de proteínas alcalinas del

músculo bovino (Chaze *et al.*, 2006). El segundo objetivo es la proteómica comparativa, la cual permite establecer tanto diferencias cuantitativas y cualitativas de patrones de expresión proteicos entre muestras como identificar o predecir biomarcadores potenciales a través de las proteínas y péptidos (Mora *et al.*, 2018).

1.8 PROTEÓMICA COMPARATIVA: DIFERENCIACIÓN BOVINA ENTRE RAZAS

Un total de 1019 razas de ganado local han sido registradas en el Banco de Datos Globales de Recursos Genéticos Animales (FAO, 2015). Los programas de entrecruzamiento que se han llevado a cabo durante décadas de investigación han demostrado que existen grandes diferencias entre las razas de ganado en cuanto a la composición de la canal (por ejemplo, el grosor de la grasa corporal y el peso de la canal) y la calidad de la carne (ej. la terneza), características que son influenciadas de manera variable por la composición genética y por factores ambientales (Burrow *et al.*, 2001). La aplicación de tecnologías genómicas de alto rendimiento ha proporcionado valiosos datos a nivel de todo el genoma para miles de marcadores, información sobre la diversidad genómica entre razas y ha impulsado la identificación de loci de caracteres cuantitativos (*quantitative trait loci*, *QTL*) subyacentes a las variaciones entre razas en los atributos de la canal y de la calidad de carne de vacuno (Medeiros De Oliveira Silva *et al.*, 2017; Ramayo-Caldas *et al.*, 2016).

La proteómica comparativa puede proporcionar a los estudios genéticos una información superpuesta de valor extraordinario para desentrañar las complejas vías moleculares y los *QTL* candidatos relacionados con las variaciones en la calidad de carne entre las razas de ganado. Un ejemplo de esto es el estudio comparativo en el músculo *longissimus dorsi*, en concreto en el tejido adiposo subcutáneo a través de 2-DE entre las razas de bovino Japanese Black y Holstein. En esta investigación se encontraron cinco proteínas candidatas que causan diferencias en la calidad de la carne entre estas razas. Sin embargo, al comparar tres de estas proteínas a nivel de ADN a través de las

secuencia codificadoras de genes no hay ninguna diferencia entre las razas (Ohsaki *et al.*, 2007). Otro ejemplo es el estudio de Timperio *et al.* (2009), en el cual se evalúa la expresión génica a través de los análisis a nivel proteómico y transcriptómico de las razas Holstein Friesian y Chianina en el hígado. Estos autores encontraron 39 proteínas y 167 genes expresados diferencialmente, mostrando así diferencias a nivel metabólico del hígado entre ambas razas, resultado de modificaciones en pocos genes o proteínas a través de la selección artificial humana de crías bovinas. Otro estudio de proteómica comparativa se realizó a través de las técnicas *dot blot* y técnicas electroforéticas con mini geles de alta resolución, donde se hallaron 21 biomarcadores proteómicos. Se intentó encontrar una relación entre estos y el carácter de terneza de la carne dependiendo de la temperatura final, el país de origen de los panelistas y las razas de estudio (Gagaoua *et al.*, 2019).

En relación con la proteómica comparativa, las variaciones de la calidad de la carne y las razas de vacuno, hay que destacar primero de todo, que la proteómica permite el análisis de los productos finales de la expresión de los genes codificadores de proteínas que participan en la conversión del músculo en carne. Asimismo, permite explorar la relación genotipo-ambiente y establecer un puente entre ambos. En segundo lugar, las diferencias a nivel de abundancia de proteínas en la proteómica comparativa es un enfoque alternativo para aproximarse a la clonación posicional de *QTL* para descubrir proteínas candidatas de *QTL* (*pQTL*) que subyacen al carácter de interés (Acharjee *et al.*, 2018) (Fig. 7). La proteómica comparativa entre razas tiene la ventaja añadida de que facilita la identificación de *pQTL* ya que las diferencias en cuanto a los atributos de calidad de la canal y calidad de la carne son significativamente mayores que aquellas diferencias dentro de una misma raza (Burrow *et al.*, 2001). También hay que destacar que permite el descubrimiento de marcadores proteicos específicos de la raza que pueden ser usados para la autenticidad y trazabilidad de la carne a través de procesos de producción industrial (Fontanesi, 2017; Montowska & Pospiech, 2012).

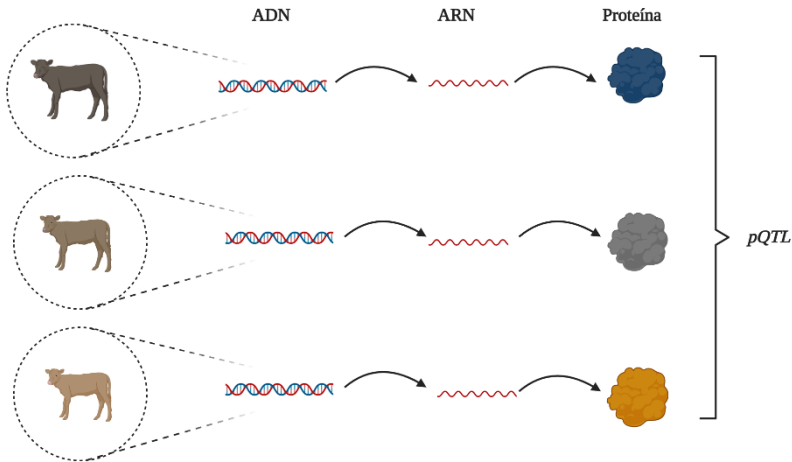


Figura 7. Esquema representativo de los pQTL candidatos.

1.9 DISTANCIAS PROTEÓMICAS

Las distancias proteómicas pueden ser una herramienta poderosa para evaluar la información resumida sobre el grado de divergencia proteómica global entre las poblaciones. Sin embargo, cabe destacar que la medida de distancia proteómica es considerablemente más compleja que la medida de distancia genética. En particular, la distancia proteómica entre un determinado par de poblaciones puede sufrir variaciones significativas debido a la enorme plasticidad espacio-temporal del proteoma. Hasta la fecha, solo unos pocos estudios han utilizado medidas de distancia proteómica para evaluar la relación de la diferenciación proteómica entre poblaciones con la diversidad filogenética intraespecífica establecida por marcadores genéticos en el parásito *Trypanosoma cruzi* (Tellería *et al.*, 2010), evaluar las proximidades genéticas entre especies y género de la familia de las plantas Brassicaceae (Marquès *et al.*, 2001), demostrar variaciones en los caracteres cualitativos de la judía común (*Phaseolus vulgaris*) y la patata (*Solanum tuberosum*) (López-Pedrouso *et al.*, 2014; Mouzo *et*

al., 2018b) y estudiar los cambios en la terneza de la carne de vacuno (Gagaoua *et al.*, 2019). Las distancias proteómicas se han evaluado utilizando las medidas de distancias de Nei & Li y de Jaccard (Jaccard, 1908; Nei & Li, 1979). El índice de disimilaridad de Nei & Li es dado por $D = 1 - F$; donde $F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, n_{xy} es el número total de *spots* compartidos entre las poblaciones x e y , y donde n_x y n_y es el número total de *spots* en las poblaciones x e y , respectivamente. Mientras que el índice de distancia de Jaccard es $D = 1 - J$, donde $J = n_{xy} / (n_{xy} + a + b)$, y a y b son los *spots* únicos únicamente representados en las poblaciones x e y , respectivamente. Se trata de medidas de distancia proteómica de tipo cualitativo, calculadas a partir del número de proteínas comunes y no comunes entre las poblaciones. Por lo tanto, las distancias cualitativas son útiles cuando las diferencias entre los perfiles proteómicos son cualitativamente pronunciadas, exhibiendo un gran número de proteínas compartidas y no compartidas. Sin embargo, una medida más eficiente y general de la distancia proteómica debería incluir también diferencias cuantitativas en la abundancia de proteínas. Las medidas de distancias calculadas a partir de datos proteómicos cuantitativos se han utilizado tradicionalmente para evaluar el nivel de similitud/disimilitud entre las poblaciones por métodos estadísticos multivariantes, como los análisis de componentes principales y análisis de *cluster*. Sin embargo, hasta donde sabemos, no se ha estimado hasta la fecha una distancia cuantitativa que resume en un solo valor numérico el grado de divergencia proteómica entre poblaciones.

En la presente Tesis Doctoral, se evaluarán las distancias proteómicas cuantitativas entre las razas bovinas AV, RE y RG a través de los perfiles proteómicos del músculo de la carne *longissimus thoracis* (LT) por medio de la electroforesis bidimensional. Como se destacó anteriormente, estas son tres de las razas de ganado más importantes de la industria española de la carne (MAPAMA, 2018). La distancia proteómica entre los pares de razas fueron estimadas por medio del estadístico recientemente propuesto de distancia cuantitativa, *QD* (*quantitative distance*), que tiene en cuenta la diferencia en abundancia cuantitativa de las proteínas compartidas y no compartidas entre las poblaciones (Rodríguez-Vázquez & Zapata, 2019, Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2020a). Además, se identificaron las proteínas que

contribuyen a la distancia proteómica entre las razas mediante MS/MS para obtener un conocimiento más profundo de los procesos bioquímicos que subyacen a las características distintivas de la carne e identificar los marcadores de proteínas candidatos para la autentificación de las tres razas de vacuno españolas.

1.10 APLICACIÓN PROTEÓMICA RELACIONADA CON EL BIENESTAR ANIMAL Y LA CALIDAD DE LA CARNE

Como se ha demostrado, durante el manejo animal muchas situaciones estresantes pueden tener un impacto en los procesos bioquímicos que afectan a la transformación del músculo en carne. Hacer frente a este problema es complicado, ya que el estrés es un desorden complejo en los animales dependiente de factores intrínsecos y extrínsecos. La mayoría de los indicadores de estrés que se usan comúnmente son cortisol, creatina quinasa y lactato en la sangre del animal. Sin embargo, actualmente hay un gran avance en el desarrollo de técnicas proteómicas que son capaces de obtener biomarcadores de estrés, representando una poderosa herramienta para la industria de la carne (Mouzo *et al.*, 2020). La proteómica, como ya se ha visto, es definida como el análisis a gran escala de proteínas incluyendo su identificación, localización e interacción. En este sentido, el proteoma de determinado tipo de tejido es altamente variable en respuesta a la estimulación medioambiental, por lo que resulta una herramienta útil para la comprensión integral tanto de los procesos biológicos complejos (Pandey & Mann, 2000) como los asociados al estrés como muestra la Fig. 8.

Hasta la fecha, los estudios proteómicos no solo han sido muy útiles para el conocimiento en profundidad de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos, sino también para hallar biomarcadores de calidad (Jia *et al.*, 2009). Asimismo, se están usando técnicas avanzadas para evaluar la relación entre la calidad de la carne y la proteómica, tales como la electroforesis bidimensional acoplada a la espectrometría de masas, iTRAQ, MALDI-TOF y LC-MS. Además, los análisis

bioinformáticos se han usado frecuentemente para arrojar más luz sobre los datos proteómicos.

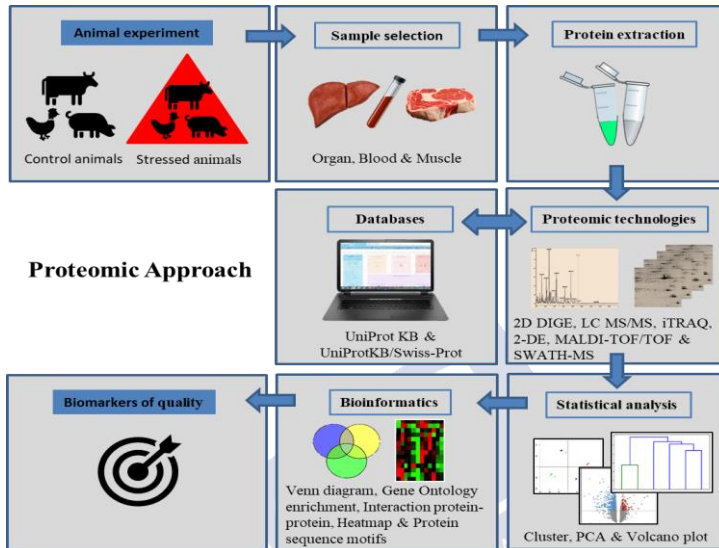


Figura 8. Esquema representativo de la búsqueda de biomarcadores de proteínas de estrés. Fuente: Mouzo *et al.*, 2020

En el último capítulo de esta Tesis Doctoral se presentará una visión general de las aplicaciones proteómicas para la industria alimentaria en relación con el bienestar animal. A continuación, se revisará la búsqueda de biomarcadores proteicos asociados al estrés animal, así como un conocimiento más profundo de los mecanismos bioquímicos implicados. Se llevará a cabo un análisis metaproteómico para investigar los principales procesos biológicos implicados en el estrés animal proporcionados por diferentes estudios.



OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Evaluación del efecto de cuatro sistemas de producción (extensivo, semiextensivo, intensivo y tradicional) con diferentes alimentaciones de acabado dentro de cada sistema de producción en las características fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales de la carne del músculo *longissimus thoracis* de terneros machos de raza RG sacrificados a 9 meses. Estos sistemas de producción con sus diferentes dietas de acabado cubren un amplio rango de escenarios económicos, de sostenibilidad medioambiental y de bienestar animal, que se dan actualmente en Galicia.

2.2 Evaluación del efecto de la raza bovina (AV, RE y RG), el sistema de producción (extensivo e intensivo), el manejo pre-sacrificio (mezcla vs. no mezcla con individuos no familiares durante el transporte y tiempo de espera en el matadero) y el tiempo de maduración (7 y 14 días) en las características fisicoquímicas y sensoriales de la carne del músculo *longissimus thoracis* de terneros machos de las tres razas.

2.3 Estimación de las distancias proteómicas cuantitativas entre las razas bovinas AV, RE y RG a partir de los perfiles proteómicos de 2-DE de las carnes del músculo *longissimus thoracis*. Las distancias proteómicas entre los pares de razas se estimarán a través del estadístico *QD* que tiene en cuenta la abundancia diferencial cuantitativa entre las proteínas compartidas y no compartidas entre poblaciones.

2.4 Identificación de proteínas que contribuyen a la distancia proteómica entre razas a través de MS/MS para la obtención de un conocimiento más profundo de los procesos bioquímicos que subyacen a las características distintivas de la carne.

2.5 Identificación de marcadores de proteína candidatos para la autentificación de las tres razas de carne de vacuno españolas.

2.6 Revisión bibliográfica que ofrece una visión general de las aplicaciones proteómicas para la industria alimentaria en relación con el bienestar de los animales. Revisión de la búsqueda de biomarcadores proteicos asociados al estrés animal, así como un conocimiento más profundo de los mecanismos bioquímicos involucrados.

2.7 Análisis meta-proteómico para investigar los procesos biológicos clave implicados en el estrés animal proporcionados por la literatura evaluada.

La consecución de estos objetivos condujo a los resultados presentados en este trabajo de investigación. Dichos resultados son derivados de las publicaciones que se adjuntan en el anexo incluido al final de la presente memoria, cuyas referencias son las siguientes:

Objetivo 2.1:

Rodríguez-Vázquez, R., Pateiro, M., López-Pedrouso, M., Gende, A., Crecente, S., Serrano, M.P., González, J., Lorenzo, J.M., Zapata, C., Franco, D., 2020. Influence of production system and finishing feeding on meat quality of Rubia Gallega calves. *Spanish J. Agric. Res.* 18, e0606.

Objetivo 2.2:

López-Pedrouso, M., Rodríguez-Vázquez, R., Purriños, L., Oliván, M., García-Torres, S., Sentandreu, M.Á., Lorenzo, J.M., Zapata, C., Franco, D., 2020. Sensory and physicochemical analysis of meat from bovine breeds in different livestock production systems, pre-slaughter handling conditions, and ageing time. *Foods* 9, 1–17.

Objetivo 2.3, 2.4 y 2.5:

Rodríguez-Vázquez, R., Mato, A., López-Pedrouso, M., Franco, D., Sentandreu, M.A., Zapata, C., 2020. Measuring quantitative proteomic distance between Spanish beef breeds. *Food Chem.* 315, 126293.

Objetivo 2.6 y 2.7:

Mouzo, D., Rodríguez-vázquez, R., Lorenzo, J.M., Franco, D., Zapata, C., López-pedrouso, M., 2020. Proteomic application in predicting food quality relating to animal welfare. A review. *Trends Food Sci. Technol.* 99, 520–530.







CAPÍTULO I



3 CAPÍTULO I: INFLUENCIA DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN Y LA ALIMENTACIÓN DE ACABADO EN LA CALIDAD DE LA CARNE DE TERNEROS DE RAZA DE RUBIA GALLEGA

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

“Influence of production system and finishing feeding on meat quality of Rubia Gallega calves”

Rodríguez-Vázquez, R¹.; Pateiro, M².; López-Pedrouso, M¹.; Gende, A³.; Crecente, S⁴.; Serrano, M.P⁵.; González, J³.; Lorenzo, J.M².; Zapata, C¹.; Franco, D². *Spanish Journal of Agricultural Research* 2020, 18, e0606. Editorial: INIA; eISSN: 2171-9292; ISSN: 1695-971X. DOI: 10.5424/sjar/2020183-16438

¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela 15872 Santiago de Compostela, España; ²Centro Tecnológico de la Carne de Galicia. Rúa Galicia nº 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrao das Viñas, 32900 Ourense, España; ³Indicación Geográfica Protegida Ternera Gallega, Recinto Ferial de Amio, 15891 Santiago de Compostela, España; ⁴Instituto Gallego de la Calidad Agroalimentaria, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, 15318 La Coruña, España; ⁵Universidad de Castilla-La Mancha; Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Albacete sección de CSIC-UCLM-JCCM Campus Universitario, 02071 Albacete, España

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 Diseño experimental y manejo animal

Para este estudio, 90 terneros machos de raza RG, registrados en el “Libro genealógico de la raza Rubia Gallega”, se obtuvieron en dos años consecutivos (45 terneros por año) de diferentes granjas bajo los sistemas de producción a estudiar (extensivo, semiextensivo, tradicional e intensivo) en Galicia. Los terneros de granjas extensivas y

semiextensivas, provenían del rebaño experimental del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, mientras que los terneros de granjas tradicionales e intensivas se criaron en granjas privadas bajo el control de la I.G.P. “Ternera Gallega”.

En los sistemas extensivos se evaluaron tres tipos de alimentación: exclusivamente con pasto, pasto suplementado en invierno con pienso comercial (pasto/pienso comercial) y pasto suplementado en invierno con maíz ensilado (pasto/ maíz ensilado). Los terneros se criaron con sus madres y se alimentaron con pasto en otoño/primavera. Durante el invierno los tres grupos extensivos recibieron hierba ensilada. En el sistema semiextensivo se evaluaron dos tipos de alimentación de acabado: pasto suplementado con pienso comercial y maíz ensilado en invierno (pasto/pienso comercial/maíz ensilado) y, por otro lado, pasto suplementado con recursos provenientes de la granja (pasto/recursos de granja). Los recursos de granja se basaron en hierba, hierba seca, hierba ensilada, maíz ensilado, cereal y grano. Los terneros se alimentaron con sus madres y con pasto en otoño/primavera. En el sistema tradicional, los terneros fueron criados en el interior de las granjas con sus madres y se destetaron a los 7 meses de edad. Posteriormente, los terneros se remataron con forraje suplementado con pienso comercial para completar su alimentación o con recursos de granja. Los terneros se criaron en diferentes explotaciones familiares de acuerdo con la normativa de requerimientos de alimentación de la I.G.P. “Ternera Gallega”. Finalmente, en el sistema intensivo, los terneros se criaron en cebaderos con pienso comercial. Dos grupos fueron finalizados basando su alimentación durante los últimos 3 meses antes del sacrificio: con paja (pienso comercial/paja) o maíz ensilado combinado con paja (pienso comercial/paja/maíz ensilado).

En total, 9 grupos ($n = 5$ terneros por grupo en 2 años; $n = 10$ en total) se evaluaron, siendo sacrificados todos los terneros a los 9 meses de edad. El ganado se transportó hasta un matadero acreditado el día antes del sacrificio de acuerdo con la regulación de la UE (Council Directive 93/119/EC; OJ, 1993). Los animales se aturdieron con una pistola de perno cautivo, se desangraron y se despiezaron siguiendo procedimientos comerciales. Inmediatamente después del sacrificio, las canales se enfriaron a 2°C (humedad relativa de 98%) durante 24 h. En

ese momento se extrajo el músculo *longissimus thoracis* (LT) de la mitad izquierda de cada canal obtenida, entre la quinta y la décima costilla, se envaso al vacío y se mantuvo en condiciones refrigeradas a una temperatura de 4°C hasta su corte. El músculo LT se cortó en siete filetes de un grosor de 2,5 cm. Los primeros tres filetes se usaron para determinar el pH, color y composición química. El cuarto y quinto se utilizaron para determinar la WHC y la fuerza de corte, respectivamente, mientras que el sexto filete se usó para el análisis de AG. Finalmente, con el séptimo filete séptimo se llevaron a cabo los análisis sensoriales.

3.1.2 Color, capacidad de retención de agua y textura instrumental

Todos los análisis fisicoquímicos se realizaron por duplicado para cada muestra. El pH se midió a 24 h *post mortem* usando un pH-metro digital portátil (Hanna Instruments, Eibar, España) equipado con un electrodo de penetración. Previo a la medida de color, las muestras de LT fueron oxigenadas directamente en contacto con el aire durante 30 min. Se determinaron las medidas objetivas del color de la carne, incluyendo luminosidad (L*), índice de rojo (a*) e índice de amarillo (b*) usando un colorímetro portátil (Konica Minolta CM-600d, Osaka, Japón). El análisis de composición química (humedad, grasa intramuscular proteína, y ceniza) se cuantificó de acuerdo con las ISO 1442:1997; 1443:1973; 937:1978 y 936:1998, respectivamente. Para la determinación de la WHC (medida como pérdidas por cocción y pérdidas por goteo), la fuerza de corte y el análisis de perfil de textura (test de TPA) se siguió un protocolo previamente descrito por Pateiro *et al.* (2013). La fuerza de corte de las muestras se realizó usando un analizador de textura (TA-XT2, Stable Micro Systems, Godalming, UK) equipado con una sonda Warner Bratzler. Se obtuvieron siete trozos de carne de 1 x 1 x 2,5 cm (alto x ancho x largo) cortadas en paralelo en la dirección de las fibras musculares. Las muestras se cortaron completamente usando una sonda de Warner Bratzler (1 mm

de grosor) a una velocidad de corte de 3,33 mm/s. La fuerza máxima de corte se determina con el valor más alto representado en la curva fuerza-tiempo, el cual representa la resistencia máxima de la muestra que ofrece al ser totalmente cortada. Otras siete piezas de carne de 1 x 1 x 1 cm (altura x ancho x largo) se cortaron en paralelo a la dirección de las fibras musculares para el test de TPA. Los parámetros de textura se midieron por compresión al 80% con una sonda de 19,85 cm² de superficie de contacto. Se determinaron los parámetros de dureza, cohesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad.

3.1.3 Perfil de ácidos grasos e índices

Para el análisis de ácidos grasos de los metil ésteres (FAME, *fatty acids methyl esters*), se emplearon 10 g de muestra de carne para la extracción de la grasa. Cincuenta miligramos de grasa se usaron para determinar el perfil de ácidos grasos según Pateiro *et al.* (2013). La separación y cuantificación de los FAME se llevó a cabo usando un cromatógrafo de gases (GC-Agilent 7890B; Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, España), equipado con un detector de ionización de llama, un inyector de muestras automático HP 7683 y usando una columna capilar de sílice fundida de la casa Supelco SPTM-2560 (100 m, 0,25 mm de diámetro interno, 0,2 μm del grosor, Supelco Inc., Bellafonte, PA, USA). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: la columna inicial se mantuvo a una temperatura de 120°C durante 5 min y se programó para incrementar a una tasa de 2°C/min hasta una temperatura de 170°C, manteniendo esta temperatura durante 15 min. Después se incrementó 5°C/min hasta los 200°C manteniendo esta temperatura durante 5 min, y a continuación incrementándola otra vez a 2°C hasta alcanzar una temperatura final de 235°C durante 10 min. El inyector y detector se mantuvieron a 260°C y 280°C, respectivamente. El helio se usó como gas portador con un flujo constante de 1,1 mL/min, con una presión de cabeza en columna de 35,56 psi. La relación de separación fue 1:50, y se inyectó 1 μL de solución. Ácido metil éster nonadecanoico (C19:0) a 0,3 mg/mL se usó como estándar interno. Los FAMEs individuales se identificaron

comparando el tiempo de retención con aquellos identificados como patrones. Los ácidos grasos se expresaron como porcentaje (g de ácido graso / 100 g del total de ácidos grasos identificados). Se calculó el contenido total de SFA, MUFA y PUFA, $n-6$, $n-3$, relación $n-6/n-3$, relación PUFA/SFA y cadena larga $n-3$ PUFA. Además, el valor nutricional (NV) y la relación hipocolesterolémico/hipercolesterolémico se calcularon según Estévez *et al.* (2004) y Santos-Silva *et al.* (2002), respectivamente.

3.1.4 Análisis sensorial de la carne

El análisis sensorial se llevó a cabo siguiendo protocolos ISO 8586-1:1993). Doce panelistas (7 mujeres y 5 hombres, con edades de los 25 a los 45 años) del Centro Tecnológico de la Carne (Ourense, España) entrenados para los análisis descriptivos participaron en este estudio de acuerdo con la regulación ISO (ISO 8586, 2012). La evaluación sensorial se llevó a cabo en cabinas individuales bajo una luz roja. Los filetes congelados del músculo LT (sin maduración previa) se descongelaron a 4 °C durante 24 h antes del cocinado. Los filetes (de 2 cm de grosor) se cocinaron en un horno de convección a 180 °C hasta alcanzar una temperatura interna de 70 °C. Después, cada filete se cortó en piezas de 1,5 x 1,5 cm, y se cubrieron con papel de aluminio, y se etiquetaron con tres dígitos aleatorios. Se realizó un diseño de bloques equilibrados incompletos, donde cada panelista evaluó seis muestras de carne de los nueve tratamientos estudiados en cada sesión. El orden de presentación de las muestras se diseñó para evitar el efecto “*carry-over*” (Macfie *et al.*, 1989). Agua y pan tostado sin sal se usaron al principio de cada sesión y entre muestras para limpiar el paladar y eliminar los sabores residuales. Se evaluaron el olor (general y grasa) y sabor (general y grasa). Además, la ternura, jugosidad, untuosidad y cantidad de la primera deglución completó los atributos sensoriales. La intensidad de cada atributo se midió en una escala lineal estructurada desde 0 (sensación no percibida) a 10 (sensación máxima).

3.1.5 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el paquete SPSS (SPSS 23.0, Chicago, IL, USA). La distribución normal y la homogeneidad de la varianza fueron previamente testadas (Shapiro-Wilk). Los datos se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA) usando un procedimiento general de modelo lineal, donde los parámetros fisicoquímicos, ácidos grasos y atributos sensoriales se fijaron como variables dependientes, y el sistema de producción y la alimentación de acabado se incluyeron en el modelo como factores fijos. Los modelos usados fueron $y_{ijk} = \mu + P_i + F_j + \epsilon_{ijk}$, donde: y es la observación de variables dependientes, μ es la media global, P es el efecto de sistema de producción, F es el efecto de la alimentación de acabado y ϵ es el error residual aleatorio asociado con la observación. Las medias se separaron usando el test de Duncan. Todos los test estadísticos de separación de medias se realizaron para el nivel de significación $P < 0,05$. El error estándar de la media se obtuvo como la desviación estándar dividida por la raíz cuadrada del tamaño de la muestra. Las correlaciones entre variables ($P < 0,05$) se determinaron usando el coeficiente de correlación lineal de Pearson con el paquete del software estadístico previamente mencionado.

Para diferenciar los grupos entre sí, se llevó a cabo un análisis discriminante canónico (CDA, *canonical discriminant analysis*) usando el método “paso a paso” empleando todos los parámetros fisicoquímicos y nutricionales evaluados. Todos los datos se sometieron al análisis CDA de acuerdo con el sistema de producción y alimentación de acabado ($n = 10$). La validación cruzada, empleando la metodología de dejar un dato fuera fue la escogida para validar los resultados. Para cada muestra se consideró una probabilidad “*a priori*” de pertenencia a un grupo u otro, independientemente del tamaño del grupo y se utilizó el criterio de lambda de Wilk (probabilidad-F para entrar y salir el valor de 0,05 y 0,10, respectivamente) para seleccionar las variables. Se obtuvo una función lineal discriminante compuesta por el conjunto de variables óptimas para determinar los coeficientes que maximizaban las diferencias entre muestras.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en los parámetros fisicoquímicos de la carne

El pH a 24h *post mortem* se vio afectado por el sistema de producción y la alimentación de acabado ($P < 0,05$), oscilando entre 5,61 y 5,79 (Tabla 1). Los terneros criados en el sistema semiextensivo mostraron los valores más altos de pH₂₄ respecto a los terneros criados en los otros sistemas de producción (5,78 vs. 5,68, $P = 0,031$). Las variaciones en los valores de L* y b* se debieron al sistema de producción y el tipo de acabado ($P < 0,001$). El parámetro de luminosidad (L*) fluctuó entre los valores de 36,8 y 46,0. Los mayores valores para L* se mostraron en la carne proveniente del sistema tradicional (44,0 de promedio), seguido por la de cebadero (41,2 de promedio) y la del sistema extensivo (38,4 de promedio) junto al sistema semiextensivo que mostró valores intermedios (39,2 de promedio). El valor del índice de rojo (a*) fue únicamente afectado por la alimentación de acabado. De hecho, el grupo pienso comercial/paja, pasto/recursos de granja, recurso de granja, pasto/ pienso comercial/ maíz ensilado y pasto mostraron un mayor valor de a* respecto los otros grupos de alimentación de acabado ($P = 0,032$). El índice de amarillo se vio afectado por la dieta y el sistema de producción ($P < 0,001$). Los valores más altos se mostraron en la carne proveniente de los sistemas tradicionales y cebaderos.

La composición química varió significativamente en los distintos sistemas de producción y tipos de alimentación de acabado ($P < 0,01$). Los valores promedios de humedad, proteína, grasa intramuscular y cenizas en carne fueron 74,6, 23,9, 0,72 y 1,23%, respectivamente. Los valores para el contenido de grasa intramuscular oscilaron entre 0,24 y 1,27%, con valores inferiores al 1% en los sistemas más extensivos, y siendo superado este valor para los terneros criados en los sistemas intensivos y tradicional.

Tabla 1. Influencia del sistema de producción y la alimentación de acabado en el pH a 24 h *post-mortem* (pH₂₄), parámetros de color y la composición química de la carne de los terneros de Rubia Gallega. Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020b)

PS	Extensive ¹			Semi-extensive ²		Traditional ³		Feedlot ⁴		SEM ⁵	P-value	
	Pasture	Pasture/ Concentrate	Pasture/ Corn silage	Pasture/ Concentrate/ Corn silage	Pasture/ Farm resources	Concentrat e	Farm resources	Concentrate/ Straw	Concentrate/ Straw/ Corn silage		PS	FF
pH ₂₄	5.66 ^{1,abc}	5.78 ^{1,bc}	5.61 ^{1,a}	5.79 ^{2,c}	5.77 ^{2,bc}	5.65 ^{1,ab}	5.71 ^{1,abc}	5.66 ^{1,abc}	5.66 ^{1,abc}	0.014	0.031	0.021
Color parameters												
Lightness (L*)	37.9 ^{1,ab}	36.8 ^{1,a}	40.4 ^{1,bc}	38.3 ^{1,ab}	40.0 ^{1,bc}	46.0 ^{3,d}	42.1 ^{3,c}	40.8 ^{2,c}	41.5 ^{2,c}	0.38	< 0.001	< 0.001
Redness (a*)	13.4 ^{bc}	10.4 ^a	11.3 ^{ab}	12.2 ^{abc}	11.9 ^{abc}	11.5 ^{ab}	12.0 ^{abc}	14.0 ^c	10.8 ^a	0.27	0.803	0.032
Yellowness (b*)	12.7 ^{1,bc}	10.4 ^{1,a}	12.2 ^{1,b}	12.1 ^{1,b}	12.4 ^{1,b}	14.7 ^{2,d}	14.0 ^{2,cd}	14.3 ^{2,d}	12.7 ^{2,bc}	0.21	< 0.001	< 0.001
Chemical composition (%)												
Moisture	75.4 ^{2,bc}	75.8 ^{2,c}	74.5 ^{2,abc}	74.6 ^{2,bc}	74.6 ^{2,bc}	74.4 ^{12,ab}	74.5 ^{12,abc}	74.2 ^{1,ab}	73.2 ^{1,a}	0.13	< 0.001	< 0.001
Protein	22.9 ^{1,a}	23.3 ^{1,ab}	23.7 ^{1,abc}	24.3 ^{2,c}	23.8 ^{2,bc}	24.6 ^{2,c}	24.4 ^{2,c}	23.3 ^{2,ab}	24.6 ^{2,c}	0.06	< 0.001	< 0.001
Intramuscular fat	0.45 ^{1,a}	0.24 ^{1,a}	0.56 ^{1,ab}	0.65 ^{12,ab}	0.55 ^{12,ab}	1.04 ^{23,bc}	0.65 ^{23,ab}	1.06 ^{3,bc}	1.27 ^{3,c}	0.111	< 0.001	0.001
Ash	1.19 ^{2,ab}	1.25 ^{2,bc}	1.25 ^{2,c}	1.24 ^{12,abc}	1.21 ^{12,abc}	1.33 ^{2,d}	1.20 ^{2,abc}	1.19 ^{1,a}	1.19 ^{1,a}	0.076	0.004	< 0.001

¹Pasture: extensive system fed pasture, Pasture/Concentrate: extensive system fed pasture supplemented with concentrate, Pasture/Corn silage: extensive system fed pasture supplemented with silage.

²Pasture/Concentrate/Corn silage: semi-extensive fed pasture supplemented with concentrate and silage; Pasture/Farm resources: semi-extensive system fed pasture supplemented with farm resources.

³Concentrate: traditional system fed milk until weaning and thereafter, fed concentrate and supplemented with concentrate, Farm resources: traditional system fed milk until weaning and thereafter, fed concentrate and supplemented with farm resources.

⁴Concentrate/Straw: feedlot system fed concentrate supplemented with straw, Concentrate/Straw/Corn silage: feedlot system concentrate supplemented with silage and straw.

⁵Standar error of mean (n= 10 for each FF).

⁶PS: Production system

⁷FF: Finishing feeding

¹⁻³ Mean values in the same row (different PS) with different number presented significant differences (P < 0,05).

^{a-d} Mean values in the same row (different FF) with different letter presented significant differences (P < 0,05).

3.2.2 Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en la capacidad de retención de agua, fuerza de corte y el análisis de perfil de textura en la carne

Las pérdidas por cocción y por goteo oscilaron entre el 20,5% y el 29,0% y entre el 1,68% y el 6,24%, respectivamente (Tabla 2). Ambas se vieron afectadas por la alimentación de acabado ($P < 0,001$) pero únicamente las pérdidas por cocción por el sistema de producción ($P = 0,031$). Los porcentajes más bajos en las pérdidas por cocción se obtuvieron en el sistema semiextensivo (22,8% de promedio) frente a los sistemas extensivos, tradicional e intensivo (26,3%, 27,0% y 24,5%, respectivamente). Con respecto a la alimentación de acabado, la carne más jugosa se obtuvo de animales criados con los grupos de pasto/pienso comercial/maíz ensilado, pasto/recursos de granja, pienso comercial/paja/maíz ensilado y pasto/maíz ensilado. La fuerza de corte se vio afectada por el sistema de producción ($P = 0,002$) y por la dieta ($P < 0,001$) y se observaron los valores más bajos para el sistema semiextensivo comparado con los otros sistemas de producción estudiados (26,0 vs. 41.4 N, respectivamente). El test TPA mostró diferencias ($P < 0,05$) para la dureza, gomosidad y cohesividad dependiendo del sistema de producción y alimentación de acabado. La dureza y gomosidad mostraron los valores más bajos en la carne de los sistemas extensivos e intensivos, mientras que los terneros alimentados en semi-extensivo e intensivos tenían los valores más bajos de cohesividad.

Tabla 2. Influencia del sistema de producción y la alimentación de acabado en la capacidad de retención de agua, la fuerza de corte y el análisis del perfil de textura (test TPA) de la carne de los terneros de Rubia Gallega. Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020b)

PS	Extensive ¹			Semi-extensive ²		Traditional ³		Feedlot ⁴		SEM ⁵	P-value	
	Pasture	Pasture/ Concentrate	Pasture/ Corn silage	Pasture/ Concentrate/ Corn silage	Pasture/ Farm resources	Concentrate	Farm resources	Concentrate/ Straw	Concentrate/ Straw/ Corn silage		PS	FF
<i>Water holding capacity (%)</i>												
Cooking loss	27.0 ² .bc	29.0 ² .c	22.8 ² .ab	23.0 ¹ .ab	22.6 ¹ .a	26.8 ² .bc	27.1 ² .bc	28.5 ¹² .c	20.5 ¹² .a	0.53	0.031	< 0.001
Drip loss	5.34 ^{cd}	4.80 ^{cd}	2.02 ^{ab}	3.64 ^{bc}	1.68 ^a	2.96 ^{ab}	6.24 ^d	5.02 ^{cd}	1.72 ^a	0.248	0.056	< 0.001
Shear force (Newton)	47.6 ² .cd	53.4 ² .d	34.3 ² .abc	22.5 ¹ .a	29.5 ¹ .a	28.0 ² .a	44.3 ² .bcd	50.2 ² .d	32.0 ² .ab	1.90	0.002	< 0.001
<i>TPA-test</i>												
Hardness (Newton)	46.6 ¹ .a	49.3 ¹ .ab	52.4 ¹ .ab	62.4 ² .bc	56.8 ² .abc	68.2 ² .c	51.9 ² .ab	52.3 ¹² .ab	51.1 ¹² .ab	1.54	0.018	0.018
Gumminess (Newton)	25.7 ¹ .a	27.4 ¹ .a	27.2 ¹ .a	32.1 ¹² .ab	28.9 ¹² .a	36.9 ² .b	28.2 ² .a	28.7 ¹ .a	26.1 ¹ .a	0.85	0.045	0.043
Chewiness (Newton/mm)	12.5	13.4	13.1	15.2	14.3	17.7	14.3	14.3	11.7	0.48	0.070	0.150
Cohesiveness	0.55 ² .cd	0.56 ² .d	0.52 ² .abc	0.51 ¹ .a	0.51 ¹ .a	0.55 ² .cd	0.55 ² .bcd	0.55 ¹² .bcd	0.51 ¹² .ab	0.004	0.006	0.004
Springiness (mm)	0.48	0.48	0.48	0.46	0.49	0.45	0.49	0.49	0.44	0.005	0.854	0.096

^{1,2,3,4,5} See Table 1.

¹⁻² Mean values in the same row (different PS) with different number presented significant differences ($P < 0,05$)

^{a-d} Mean values in the same row (different FF) with different letter presented significant differences ($P < 0,05$).

3.2.3 Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en el perfil de ácidos grasos de la carne

Tanto el sistema de producción como la alimentación de acabado influyeron en el perfil de ácidos grasos del músculo LT (Tabla 3). Los SFA son la fracción predominante con valores que oscilaron entre el 34,8% y 44,7%, seguidos en importancia por los MUFA (31,5%) y los PUFA (21,9%). Se encontraron diferencias para los SFA entre los diferentes sistemas de producción y tipos de alimentación de acabado ($P < 0,001$). Los valores más bajos de los SFA se observaron para carne procedentes del sistema extensivo y los mayores para el intensivo (38,8% de promedio vs. 43,8%, respectivamente; $P < 0,001$). El ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) fueron los SFA más abundantes representando entre el 54% y 38% respectivamente del total de SFA. Los sistemas de producción y los tipos de alimentación de acabado también produjeron diferencias ($P < 0,05$) en otros SFA de menor importancia ($< 4\%$) como el ácido mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:0) y margárico (C17:0).

El contenido de MUFA no se vio afectado por el sistema de producción o la alimentación de acabado, con valores que variaron entre 28,9% y 34,4%. Aunque no se detectaron diferencias entre grupos, el ácido oleico (C18:1*n*-9*c*) fue el MUFA predominante, con valores medios del 85% respecto al total de MUFA y el 27% respecto a los ácidos grasos totales.

El contenido en PUFA osciló entre el 16,9% y el 29,4%. Los terneros con alimentación de acabado en pasto y suplementados con piensos comerciales mostraron el nivel más alto de PUFAs respecto a los otros tratamientos de acabado (29,4 vs. 21,0% para pasto y suplementado con pienso comercial vs. el conjunto de alimentación de acabado, respectivamente, $P = 0,024$).

Dentro de los PUFA, el C18:2 *n*-6*c* fue el ácido graso predominante (60% de los PUFA totales), seguidos por ácido araquidónico (C20:4 *n*-6) (13% de los PUFA totales) y por C18:3 *n*-3 (9% de los PUFA

totales). El nivel de C18:3 *n-3* se vio influenciado ($P < 0,001$) por ambos efectos (producción y tipo de acabado). Los terneros alimentados con pasto y pasto/pienso comercial mostraron los mayores niveles de C18:3 *n-3* (4,16 y 4,50% respecto del contenido total en FAME, respectivamente), mientras que el grupo de pienso comercial mostró los valores más altos de C18:2 *n-6c* (15,4% del FAME total), aunque las diferencias para el contenido de C18:2 *n-6c* no alcanzaron las diferencias significativas entre los distintos sistemas de producción y de dieta. Las diferencias encontradas para el contenido total de *n-3* se vieron afectadas por el contenido de C18:3 *n-3* (3,42 vs. 2,05 vs. 0,89 vs. 0,69%, $P < 0,001$ para terneros criados en sistemas extensivos, semiextensivo, tradicional y cebaderos, respectivamente).

Las relaciones *n-6/n-3* y PUFA/SFA se vieron influenciados tanto por el sistema de producción como por la alimentación de acabado. Los valores medios más bajos de la relación *n-6/n-3* fueron encontrados en los sistemas extensivo (2,4) y semiextensivo (3,4), frente a los más altos del sistema intensivo (10,45). Mientras que la relación PUFA/SFA mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los sistemas extensivos e intensivos alcanzando valores de 0,65 y 0,44, respectivamente. En cuanto al valor nutricional y la relación h/H únicamente se encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) por efecto de la alimentación de acabado.

Tabla 3. Influencia del sistema de producción y la alimentación de acabado en el perfil de ácidos grasos de la carne de los terneros de Rubia Gallega (g/100 g de ácidos grasos metil ésteres). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020b).

PS	Extensive ¹			Semi-extensive ²		Traditional ³		Feedlot ⁴		SEM ⁵	P-value	
	Pasture	Pasture/ Concentrate	Pasture/ Corn silage	Pasture/ Concentrate/ Corn silage	Pasture/ Farm resources	Concentrate	Farm resources	Concentrate/ Straw	Concentrate/ Straw/ Corn silage		PS	FF
C14:0	3.54 ^{2.e}	1.64 ^{2.a}	2.84 ^{2.d}	2.12 ^{12.abc}	2.83 ^{12.d}	1.77 ^{12.ab}	2.53 ^{12.cd}	2.33 ^{1.bcd}	1.51 ^{1.a}	0.10	0.025	< 0.001
C15:0	0.74 ^{2.d}	0.51 ^{2.c}	0.32 ^{2.ab}	0.38 ^{1.abc}	0.43 ^{1.bc}	0.34 ^{1.ab}	0.37 ^{1.ab}	0.36 ^{1.ab}	0.24 ^{1.a}	0.02	< 0.001	< 0.001
C16:0	21.4 ^{1.b}	18.8 ^{1.a}	23.1 ^{1.bc}	23.5 ^{2.c}	22.9 ^{2.bc}	22.5 ^{2.bc}	22.2 ^{2.bc}	23.4 ^{2.c}	21.9 ^{2.bc}	0.23	0.004	< 0.001
C16:1 n-7	2.24 ^{12.abc}	1.99 ^{12.a}	2.52 ^{12.bc}	2.59 ^{2.c}	2.15 ^{2.abc}	2.08 ^{1.ab}	1.99 ^{1.a}	2.05 ^{1.ab}	1.88 ^{1.a}	0.06	0.045	0.026
C17:0	0.93 ^{2.bc}	0.70 ^{2.a}	0.97 ^{2.c}	0.81 ^{2.ab}	0.97 ^{2.c}	0.81 ^{2.ab}	0.80 ^{2.ab}	0.74 ^{1.a}	0.69 ^{1.a}	0.02	0.014	< 0.001
C17:1 n-7	0.59 ^{4.b}	0.72 ^{4.c}	0.72 ^{4.c}	0.59 ^{3.b}	0.60 ^{3.b}	0.47 ^{2.a}	0.46 ^{2.a}	0.39 ^{1.a}	0.40 ^{1.a}	0.02	< 0.001	< 0.001
C18:0	14.4 ^{1.ab}	13.2 ^{1.a}	13.3 ^{1.a}	13.7 ^{1.a}	15.5 ^{1.abc}	17.1 ^{2.bcd}	16.1 ^{2.abcd}	17.9 ^{2.cd}	18.5 ^{2.d}	0.36	< 0.001	< 0.001
C18:1 n-9c	25.8	24.9	27.7	28.1	26.1	26.2	26.1	27.9	27.5	0.39	0.395	0.496
C18:1 n-11t	1.13 ^a	1.15 ^a	3.34 ^d	2.31 ^{bc}	1.37 ^{ab}	3.08 ^{cd}	1.28 ^a	1.66 ^{ab}	2.71 ^{cd}	0.13	0.718	< 0.001
C18:2 n-6c	10.4	13.6	12.9	13.8	10.4	15.4	14.8	12.1	15.3	0.47	0.101	0.061
C18:3 n-3	4.16 ^{3.d}	4.50 ^{3.d}	1.61 ^{3.b}	1.20 ^{2.ab}	2.90 ^{2.c}	0.70 ^{1.a}	1.08 ^{1.ab}	0.85 ^{1.a}	0.53 ^{1.a}	0.17	< 0.001	< 0.001
C18:3 n-6	0.08	0.11	0.10	0.13	0.11	0.08	0.10	0.09	0.10	0.005	0.224	0.397
C20:1 n-9	0.12 ^{2.bc}	0.12 ^{2.bc}	0.14 ^{2.c}	0.12 ^{1.bc}	0.07 ^{1.a}	0.14 ^{2.bc}	0.11 ^{2.b}	0.11 ^{2.bc}	0.12 ^{2.bc}	0.01	0.004	< 0.001
C20:3 n-6	0.79 ^{2.bc}	0.97 ^{2.c}	0.65 ^{2.ab}	0.73 ^{2.abc}	0.77 ^{2.bc}	0.75 ^{2.bc}	0.73 ^{2.abc}	0.44 ^{1.a}	0.66 ^{1.abc}	0.03	0.042	0.035
C20:4 n-6	3.05	3.80	2.60	2.54	3.52	2.59	3.28	1.99	2.88	0.16	0.401	0.175
C20:5 n-3	2.13 ^{3.c}	3.36 ^{3.d}	1.14 ^{3.b}	0.98 ^{2.ab}	2.00 ^{2.c}	0.54 ^{1.ab}	0.89 ^{1.ab}	0.64 ^{1.a}	0.41 ^{1.ab}	0.12	< 0.001	< 0.001
C22:5 n-3	2.32 ^{3.c}	3.07 ^{3.d}	1.59 ^{3.b}	1.49 ^{3.b}	2.43 ^{3.c}	1.03 ^{2.ab}	1.49 ^{2.b}	0.82 ^{1.a}	0.80 ^{1.a}	0.10	< 0.001	< 0.001

PS	Extensive ¹			Semi-extensive ²		Traditional ³		Feedlot ⁴		SEM ⁵	P-value	
	Pasture	Pasture/ Concentrate	Pasture/ Corn silage	Pasture/ Concentrate/ Corn silage	Pasture/ Farm resources	Concentrate	Farm resources	Concentrate/ Straw	Concentrate/ Straw/ Corn silage		PS	FF
SFA	41.1 ^{1.b}	34.8 ^{1.a}	40.6 ^{1.b}	40.6 ^{2.b}	42.7 ^{2.bc}	42.6 ^{2.bc}	42.0 ^{2.bc}	44.7 ^{2.c}	42.9 ^{2.bc}	0.45	< 0.001	< 0.001
MUFA	29.8	28.9	34.4	33.7	30.3	32.0	30.0	32.2	32.6	0.48	0.659	0.081
PUFA	22.9 ^a	29.4 ^b	20.6 ^a	20.9 ^a	22.1 ^a	21.1 ^a	22.4 ^a	16.9 ^a	20.7 ^a	0.76	0.065	0.024
Σn-6	14.3	18.4	16.3	17.2	14.8	18.8	18.9	14.6	19.0	0.60	0.373	0.296
Σn-3	8.61 ^{3.d}	10.93 ^{3.e}	4.34 ^{3.c}	3.67 ^{2.bc}	7.34 ^{2.d}	2.26 ^{1.ab}	3.47 ^{1.abc}	2.30 ^{1.ab}	1.73 ^{1.a}	0.37	< 0.001	< 0.001
n-6/n-3	1.67 ^{1.a}	1.75 ^{1.a}	3.78 ^{1.ab}	4.72 ^{1.b}	1.99 ^{1.a}	10.10 ^{2.c}	5.70 ^{2.b}	10.04 ^{3.c}	10.86 ^{3.c}	0.44	< 0.001	< 0.001
PUFA/SFA	0.57 ^{2.a}	0.86 ^{2.b}	0.52 ^{2.a}	0.53 ^{12.a}	0.55 ^{12.a}	0.52 ^{12.a}	0.55 ^{12.a}	0.38 ^{1.a}	0.50 ^{1.a}	0.03	0.024	0.002
Nutritional value	0.69 ^d	0.53 ^a	0.64 ^{cd}	0.61 ^{bc}	0.70 ^d	0.59 ^{abc}	0.60 ^{bc}	0.65 ^{cd}	0.55 ^{ab}	0.01	0.130	<0.001
h/H	1.97 ^a	2.67 ^b	1.88 ^a	1.94 ^a	1.97 ^a	1.97 ^a	1.98 ^a	1.75 ^a	2.09 ^a	0.04	0.070	<0.001

SFA= saturated fatty acids; MUFA= monounsaturated fatty acid; PUFA= polyunsaturated fatty acids; h/H: ratio hypocholesterolemic/hypercholesterolemic fatty acids.

^{1,2,3,4,5}See Table 1

¹⁻⁴ Mean values in the same row (different PS) with different number presented significant differences ($P < 0.05$).

^{a*} Mean values in the same row (different FF) with different letter presented significant differences ($P < 0.05$).

3.2.4 Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en los parámetros sensoriales de la calidad de la carne

Sólo dos de los ocho atributos sensoriales evaluados mostraron diferencias significativas entre los sistemas de producción (jugosidad y cantidad de la primera deglución, $P < 0,05$) y cuatro de ellas diferencias significativas por efecto de la alimentación de acabado [(intensidad de olor global ($P = 0,002$), terneza ($P = 0,001$), jugosidad ($P = 0,003$) y cantidad de la primera deglución ($P = 0,002$)). Las carnes más jugosas fueron las provenientes del sistema extensivo frente al intensivo (4,5 vs. 2,8 de promedio, respectivamente) [Tabla 4].




Tabla 4. Influencia del sistema de producción y la alimentación de acabado en los parámetros sensoriales de la carne de los terneros de Rubia Gallega. La escala de intensidad para cada parámetro varió desde 0 (sensación no percibida) a 10 (sensación máxima). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020b).

PS	Extensive ¹			Semi-extensive ²		Traditional ³		Feedlot ⁴		SEM ⁵	P-value	
	FF	Pasture	Pasture/ Concentrate	Pasture/ Corn silage	Pasture/ Concentrate/ Corn silage	Pasture/ Farm resources	Concentrate	Farm resources	Concentrate/ Straw		Concentrate/ Straw/ Corn silage	PS
Intensity global odor	5.93 ^{cd}	6.43 ^d	4.23 ^a	5.37 ^{bc}	4.67 ^{ab}	6.47 ^d	5.67 ^{bcd}	5.67 ^{bcd}	5.17 ^{abc}	0.17	0.202	0.002
Intensity fatty odor	2.23	2.50	1.97	2.70	2.23	1.73	2.07	1.83	2.17	0.09	0.124	0.142
Intensity global flavor	4.23	4.70	3.83	4.07	3.77	4.23	4.20	3.47	3.63	0.12	0.132	0.362
Intensity fatty flavor	1.87	2.47	2.27	2.23	2.20	2.53	2.40	2.77	1.97	0.08	0.615	0.179
Tenderness	5.67 ^d	5.70 ^d	3.13 ^a	4.20 ^{abc}	4.53 ^{bcd}	5.37 ^{cd}	4.40 ^{abcd}	3.63 ^{ab}	3.23 ^{ab}	0.22	0.068	0.001
Juiciness	5.43 ^{2.c}	5.27 ^{2.c}	2.90 ^{2.ab}	3.57 ^{12.ab}	3.43 ^{12.ab}	4.43 ^{2.bc}	4.37 ^{2.bc}	3.03 ^{1.ab}	2.57 ^{1.a}	0.23	0.016	0.003
Greasy	2.13	2.27	1.53	1.90	1.83	1.80	2.33	2.00	1.37	0.09	0.541	0.172
Amount of first swallowing	2.83 ^{12.a}	2.83 ^{12.a}	4.60 ^{12.d}	4.03 ^{23.bcd}	4.27 ^{23.cd}	3.20 ^{1.abc}	3.07 ^{1.ab}	4.17 ^{3.cd}	4.77 ^{3.d}	0.17	0.016	0.002

^{1,2,3,4,5} See Table 1.

¹⁻³ Mean values in the same row (different PS) with different number presented significant differences ($P < 0,05$).

^{a-d} Mean values in the same row (different FF) with different letter presented significant differences ($P < 0,05$).

3.2.5 Análisis discriminante

Del conjunto de datos (todos los parámetros, excepto aquellos del análisis sensorial), sometidos a un análisis discriminante, el programa estadístico seleccionó las siguientes variables: L*, cenizas, pérdidas por goteo, fuerza de corte, C14:0, C15:0, C17:1 *n-7*, C18:3 *n-3*, C18:3 *n-6*, C20:1, C20:3 *n-6*, C20:5 *n-3*, C21:0, *n-3*, *n-6:n-3*, PUFA/SFA, valor nutricional, h/H y cohesividad. Estas variables fueron las que se mantuvieron hasta el final del análisis discriminante “paso a paso” y se combinaron linealmente para dar lugar a las funciones discriminantes canónicas. Ocho funciones discriminantes canónicas se utilizaron en el análisis. Las dos primeras funciones discriminantes de clasificación obtenidas fueron las siguientes:

$$F1 = -0,049 [L^*] + 0,193 [\text{cenizas}] + 0,343 [\text{pérdidas por goteo}] - 1,295 [\text{fuerza de corte}] + 0,468 [\text{cohesividad}] + 0,851 [C14:0] - 0,323 [C15:0] + 0,155 [C17:1] - 0,630 [C18:3 \textit{n-6}] - 0,235 [C20:1] + 0,738 [C18:3 \textit{n-3}] + 0,629 [C21:0] + 0,782 [C20:3 \textit{n-6}] - 4,144 [C20:5 \textit{n-3}] + 4,630 [\textit{n-3}] + 0,242 [\textit{n-6/n-3}] - 1,584 [\text{PUFA/SFA}] + 1,104 [\text{valor nutricional}] + 2,153 [\text{h/H}]$$

$$F2 = 0,262 [L^*] + 0,055 [\text{cenizas}] + 0,604 [\text{pérdidas por goteo}] + 1,526 [\text{fuerza de corte}] + 0,295 [\text{cohesividad}] - 0,233 [C14:0] + 0,422 [C15:0] - 0,182 [C17:1] - 0,556 [C18:3 \textit{n-6}] - 0,017 [C20:1] + 3,232 [C18:3 \textit{n-3}] + 0,074 [C21:0] - 0,011 [C20:3 \textit{n-6}] + 4,578 [C20:5 \textit{n-3}] - 8,241 [\textit{n-3}] + 0,007 [\textit{n-6/n-3}] + 0,197 [\text{PUFA/SFA}] - 0,634 [\text{valor nutricional}] + 0,820 [\text{h/H}]$$

De acuerdo con estos coeficientes, los parámetros, que en su mayoría explicaban la separación de los grupos con la F1, fueron C20:5 *n-3*, *n-3*, PUFA/SFA y h/H mientras que las variables que explicaban la separación de grupos de F2 eran la fuerza de corte, C18:3 *n-3*, C20:5 *n-3* y *n-3*. Este resultado permite obtener resultados más precisos de la calidad de carne vacuno respecto a la alimentación de acabado, porque C18:3 *n-3* y C20:5 *n-3*, el total de *n-3* y h/H y el índice PUFA/SFA están muy influenciados por la composición de ácidos grasos de los terneros alimentados con pasto y piensos comerciales. Como era de

esperar, los ácidos grasos de la familia *n-3* fueron una herramienta exitosa para la discriminación de los terneros alimentados con diferentes tipos de acabado.

Cuando los resultados obtenidos para la función F1 se representaron frente a los resultados obtenidos de la función de F2 en los ejes de coordenadas para cada muestra de carne ($n = 90$), se observó una buena separación entre los grupos extensivos de acuerdo con la alimentación de acabado (Fig. 9). Las funciones F1 y F2 explicaron el 57,1 y el 15,2%, respectivamente de la varianza, alcanzando una varianza total explicada del 72,3%. Los valores propios y de correlación canónica obtenidos para F1 fueron de 21,34 y 0,977, respectivamente, y de 5,68 y 0,922 para la F2, respectivamente. Se obtuvo una validación cruzada sólo para los casos del análisis, donde cada muestra fue clasificada de acuerdo con las funciones canónicas discriminantes obtenidas, empleando metodología de dejar un dato fuera. El análisis discriminante atribuyó correctamente a cada muestra de ternero a su grupo original con una exactitud del 96,6%. El 83,1% de las muestras de terneros fueron validadas (validación cruzada) de manera correcta, donde todas las muestras fueron clasificadas perfectamente (100%) para grupos como pasto/ maíz ensilado y pasto/recursos de granja, mientras que la clasificación más pobre se obtuvo para el grupo pienso comercial/paja (50%).

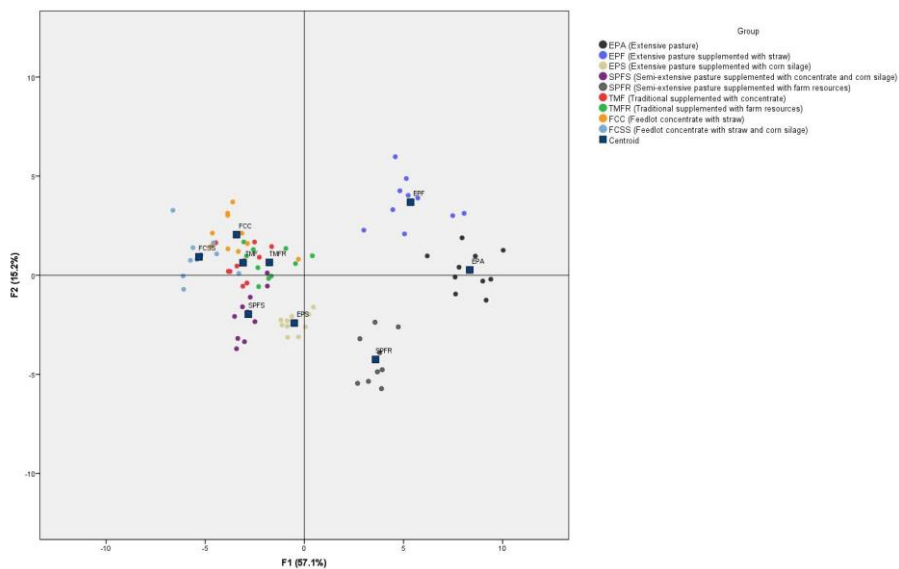


Figura 9. Gráfico de las muestras de carne de los terneros de Rubia Gallega representando en los ejes valores de las dos funciones discriminantes. Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020b)

3.3 DISCUSIÓN

3.3.1 Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en los parámetros fisicoquímicos de la carne

Los valores de pH están en concordancia con aquellos observados por otros autores (Guerrero *et al.*, 2013; Humada *et al.*, 2014) para el pH último entre los sistemas de producción. Las variaciones en la alimentación de acabado de los terneros para cada sistema de producción también podrían contribuir a las diferencias observadas en los valores de pH. Esta hipótesis está en concordancia con lo demostrado por Bispo *et al.*, 2010a, que informó de la influencia de la nutrición en los valores de pH. Sin embargo, todos los tratamientos mostraron valores de pH₂₄ por debajo de 5,8, lo que está dentro del rango de aceptabilidad para la carne de vacuno, indicando la ausencia de factores de estrés.

El color de la carne es un atributo importante que se considera como el principal criterio de compra. La carne roja brillante es preferida frente a la roja pálida/oscura porque se la relaciona con la carne fresca (Troy & Kerry, 2010). El intervalo de luminosidad de la carne de este estudio estuvo en concordancia con el rango reportado por Guerrero *et al.* (2013). Los valores obtenidos para a* y b* fueron similares a los encontrados en terneros de la raza RG por Pateiro *et al.* (2013). En general, los parámetros de color fueron más altos en los sistemas tradicionales e intensivos, mientras que la alimentación de acabado con pasto produjo la carne de color más oscura, en sintonía con otros estudios (Moloney *et al.*, 2011; Priolo *et al.*, 2001; Yüksel *et al.*, 2012). Además, la grasa intramuscular fue mayor tanto en los sistemas tradicionales y de cebadero, lo que podría contribuir directamente a aumentar la luminosidad de la carne de vacuno (French *et al.*, 2001; Yüksel *et al.*, 2012). La actividad física podría considerarse un factor que afecta al color, siendo más oscura en aquellos animales criados en

sistemas extensivos con alimentación basada en pastos los cuales tienen una mayor actividad física (Priolo *et al.*, 2001; Vestergaard *et al.*, 2000).

La composición química se situó en un rango de valores ya previamente publicados para los terneros de RG (Bispo *et al.*, 2010a; González *et al.*, 2014; Pateiro *et al.*, 2013) mostrando un bajo contenido en grasa y un alto contenido en proteínas. Como era de esperar, los terneros alimentados con pastos mostraron el contenido en grasa intramuscular más bajo en contraste con aquellos alimentados con pienso comercial (la grasa intramuscular de los terneros alimentados con pienso comercial/paja/maíz ensilado fue casi 6 veces más alto que el de los terneros de pasto/pienso comercial). Estos resultados son coherentes con los obtenidos por Mezgebo *et al.* (2017) quién sugirió que la dieta basada en pienso comercial aumenta el contenido de grasa intramuscular.

3.3.2 Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en la capacidad de retención del agua, fuerza de corte y el análisis de perfil de textura en la carne

La WHC tiene una gran importancia en las propiedades de la carne ya que juega un papel clave en la estructura muscular que podría afectar a la apariencia, color, terneza y jugosidad después de la cocción (Hughes *et al.*, 2014; Pearce *et al.*, 2011). Previamente, otros autores (Bispo *et al.*, 2010a; Oliete *et al.*, 2006) no encontraron ningún impacto del sistema de producción en las pérdidas por goteo en concordancia con nuestros resultados. Asimismo, respecto a la fuerza de corte a diferencia de los mostrado por nuestro estudio, del Campo *et al.* (2008) mostraron valores más bajos de la fuerza de corte para el ganado alimentado con pasto. De acuerdo con la clasificación de terneza establecida por Belew *et al.* (2003), la carne de los terneros criados en los sistemas semiextensivos podría considerarse como “muy tierna” (fuerza de corte < 31,4N) mientras que la carne de animales criados en

el sistema tradicional podría ser clasificado como “tierna” ($31,4 \text{ N} < \text{fuerza de corte} < 38,2 \text{ N}$) y la carne de aquellos terneros criados en sistemas intensivos y extensivos son “intermedios” ($38,2 \text{ N} < \text{fuerza de corte} < 45,1 \text{ N}$). Del sistema semiextensivo se obtuvo la carne con mayor terneza, así como la carne con menores pérdidas de cocción. Este hecho indica que la carne de estos terneros pierde menos agua durante el proceso de cocción, ya que la mayor retención de agua corresponde con la mayor terneza. De hecho, la fuerza de corte se correlacionó con las pérdidas de cocción ($r = 0,437, P < 0,01$) y con las pérdidas por goteo ($r = 0,260, P < 0,05$). Además, ambas formas de medir la pérdida de agua estaban correlacionados entre ellas ($r = 0,243, P < 0,05$). Sin embargo, esta correlación no fue fuerte ya que las pérdidas por cocción se ven afectadas por la desnaturalización de las proteínas que permite la salida del agua mientras que las pérdidas por goteo son producidas por cortes la superficie de la carne. Como era de esperar, no se observó una correlación entre la fuerza de corte y la dureza mientras que sí se encontró una correlación entre la dureza y las pérdidas por cocción ($r = 0,239, P < 0,05$). Además, una correlación moderada se observó entre las pérdidas por cocción y la cohesividad y entre las pérdidas por cocción y la gomosidad ($r = 0,431$ y $0,332$, respectivamente, $P < 0,01$).

3.3.3 Influencia del sistema de producción y de la alimentación de acabado en el perfil de ácidos grasos de la carne

La influencia de los sistemas de producción y de la alimentación de acabado en el perfil de los ácidos grasos ha sido evaluado previamente por diferentes autores (Bispo *et al.*, 2010b; Guerrero *et al.*, 2013; Pateiro *et al.*, 2013; Varela *et al.*, 2004). Asimismo, variaciones en los SFAs entre los diferentes sistemas de producción y alimentación de acabado están de acuerdo con otros estudios donde se evaluó los efectos de los sistemas de producción en la composición de los ácidos grasos (Humada *et al.*, 2012; Van Elswyk & McNeill, 2014). A pesar del hecho de que la leche tiene una importante fracción de SFAs, el contenido de estos ácidos grasos en la carne para el grupo extensivo

(terneros lactantes pertenecientes al grupo de pasto/pienso comercial) no se incrementó. Dentro de los SFAs, el palmítico y esteárico fueron los ácidos grasos más predominantes, de acuerdo con otras investigaciones que encontraron valores de C16:0 más bajos en la grasa del ganado alimentado con hierba frente a grano (Alfaia *et al.*, 2009; Duckett *et al.*, 2013). El C16:0 es el principal constituyente de los SFAs y el principal producto de la síntesis de los ácidos grasos endógenos. En el presente estudio, el porcentaje más bajo de C16:0 se encontró en la carne de terneros alimentados con pasto suplementado con pienso comercial (pasto/pienso comercial). Estos resultados indican que la síntesis *de novo* se vio más inhibida con este tipo de alimentación de acabado. Estos resultados podrían estar relacionados con mayores acumulaciones de PUFAs que han mostrado tener efectos inhibitorios de la síntesis de ácidos grasos endógenos en el músculo (Waters *et al.*, 2009). La reducción de los porcentajes de SFAs tiene importantes y positivas implicaciones, ya que las recomendaciones para la salud humana incluyen la reducción de la ingesta de SFAs, especialmente del ácido láurico (C12:0) al ácido palmítico C16:0 debido a que se relacionan con aumentos de la lipoproteína de baja densidad (LDL)-colesterol que produce efectos aterogénicos e hipercolesterolémicos (EFSA, 2010).

El C18:1 es un importante ácido graso en la dieta humana. Además, en las dietas occidentales la carne de vacuno se considera la fuente principal de MUFA y una fuente común de C18:1 *n-9c* (ácido oleico). Sin embargo, se ha demostrado de que la cantidad de C18:1 *n-9c* (y, consecuentemente, el porcentaje de MUFA), únicamente podría modificarse cuando hay diferencias a nivel de veteado (contenido en grasa intramuscular) producido por diferentes estrategias de alimentación (Van Elswyk & McNeill, 2014).

La acumulación de PUFAs en el presente estudio fueron limitadas, lo más probable es que estén relacionadas con el bajo contenido total de lípidos mostrado en la carne de ternera de la raza RG. Específicamente, para el grupo pasto/pienso comercial cuyo nivel de PUFAs fue el más alto, este resultado debe ser interpretado con precaución debido al bajo contenido en grasa intramuscular (0,24%). De hecho, este efecto se corrobora por la correlación negativa observada entre la grasa

intramuscular y el contenido en ácido linoleico (C18:2 *n-6c*) y linolénico (C18:3 *n-3*) ($r=-0,31$ y $-0,50$, respectivamente; $P < 0,01$). Los bajos contenidos en grasa intramuscular y los ácidos grasos se encontraron dentro del mismo rango que los indicados por Bispo *et al.*, 2010b, para la raza RG, que considera la RG como raza de maduración tardía. Dado las diferencias encontradas para la grasa intramuscular las diferencias en la composición de ácidos grasos a nivel muscular podrían estar relacionadas tanto con la influencia de la alimentación de acabado como con la relación entre triglicéridos y fosfolípidos.

Dentro de los PUFAs, Guerrero *et al.* (2013) han reportado valores similares para los ácidos linoleico, araquidónico y linolénico. A pesar de que los PUFAs son bio-hidrogenados por el microbiota ruminal resultando en una disminución de su concentración en el músculo, se ha descrito que la alimentación basada en pasto conduce a un incremento de la deposición de C18:3 *n-3* en el músculo en comparación con la alimentación basada en pienso comercial (Wood *et al.*, 2008). Estos hechos respaldan que el contenido en PUFAs depende en gran medida de la dieta de los terneros (Scollan *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2008).

La suma de los PUFAs de la familia *n-3* se vieron afectados ($P < 0,001$) por los sistemas de producción y dieta, en concordancia con lo informado previamente por French *et al.* (2000b); Humada *et al.* (2012). Por el contrario, el contenido *n-6* no se vio afectado por el sistema de producción de acuerdo con investigaciones previas (Guerrero *et al.*, 2013; Humada *et al.*, 2012). En el presente estudio, los valores más altos obtenidos para el contenido total de *n-3* correspondieron a los sistemas extensivos mientras que los valores más bajos se mostraron para los sistemas tradicionales e intensivos. Los sistemas semiextensivos mostraron una situación intermedia. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que los terneros alimentados con pastos tuvieron un mayor contenido de *n-3* que los alimentados con cereal o pienso comercial (Wood *et al.*, 2008). Además, sobre la base de que en los sistemas extensivos y semiextensivos causan incrementos en los contenidos de C18:3 *n-3* (especialmente en el grupo de pasto/pienso comercial), parece que este ácido graso se usa en mayor medida como sustrato del complejo enzimático formado por desaturasas y elongasas para promover la síntesis *de novo* de la cadena

larga $n-3$ (ácido eicosapentanoico o C20:5 $n-3$ y docosahexaenoico). Este resultado concuerda con los obtenidos por Cherfaoui *et al.* (2012) quienes evidenciaron que el C18:3 $n-3$ era el principal sustrato para estas enzimas. Se ha reportado que las dietas con menor contenido de forraje y mayor contenido en almidón provocan la reducción del pH del rumen y cambios en las poblaciones bacterianas del rumen (Klieve *et al.*, 2003), que modifican las rutas de biohidrogenación de los PUFAs, lo que sugiere que las dietas ricas en C18:3 $n-3$ (pasto y forraje) pueden haber influido en estas vías. Los efectos positivos del conjunto de ácidos grasos de la familia $n-3$ han sido ampliamente reconocidos (Wood *et al.*, 2008), por lo que parece que, en el estudio actual, el sistema extensivo mejora la calidad de la carne desde un punto de vista de la salud humana.

Una baja relación $n-6/n-3$ se considera un objetivo para la composición de los ácidos grasos de la carne en la dieta humana, ya que una proporción equilibrada podría prevenir enfermedades cardiovasculares y crónicas tales como el cáncer prostático (Simopoulos, 2008). De hecho, mayores proporciones de $n-3$ han sido recomendado por la EFSA, 2010 y FAO, 2010 a fin de disminuir la relación $n-6/n-3$ para la prevención de enfermedades relacionadas con la inflamación (Simopoulos, 2008). En el presente estudio, la carne de los terneros criados en sistemas extensivos y semiextensivos mostraron los valores más saludables (más bajos) en comparación con la proveniente de los sistemas tradicional e intensivos (2,40, 3,36 vs. 7,90, 10,45, respectivamente; $P < 0,001$), cumpliendo con las recomendaciones nutricionales de la FAO, 2010 para dieta humana ($n-6/n-3 < 4$). Estas diferencias están claramente influenciadas por la composición de ácidos grasos de las dietas, lo que refleja que C18:2 $n-6c$ y C18:3 $n-3$ son los ácidos grasos más abundantes en el pienso y hierba, respectivamente y que estos ácidos grasos actúan como precursores de la serie de $n-6$ y $n-3$, respectivamente (French *et al.*, 2000b; Raes *et al.*, 2004). En línea con estos resultados, se ha demostrado recientemente que las diferentes estrategias basadas en suplementación en la producción animal son las que provocan cambios más importantes en la relación $n-6/n-3$ (Scollan *et al.*, 2014).

La relación PUFA/SFA es otro índice importante para evaluar las propiedades nutricionales de la grasa intramuscular. Las recomendaciones de la relación de PUFA/SFA para la dieta humana son alrededor del 0,85 (FAO, 2010). En el ensayo actual, se encontraron diferencias para la relación PUFA/SFA entre las diferentes alimentaciones de acabado ($P = 0,002$). Únicamente la relación para PUFA/SFA observada en el grupo pasto/pienso comercial, relacionado con su menor contenido de grasa intramuscular comparado con otros grupos con alimentación de acabado, se encontraba dentro del rango recomendado por la FAO. Este valor fue superior a los encontrados en otros estudios con carne de vacuno (Guerrero *et al.*, 2013; Pateiro *et al.*, 2013). Sin embargo, si se considerada la recomendación para los ácidos grasos insaturados/ SFA ≥ 2 de la EFSA, (2010) ninguno de los grupos de alimentación de acabado del nuestro estudio actual alcanzó este nivel.

3.3.4 Influencia de sistema de producción y de la alimentación de acabado en los parámetros sensoriales de la calidad de la carne

Dentro del efecto de los sistemas de producción y de la dieta sobre los atributos sensoriales, nuestros hallazgos no respaldaron investigaciones previas, en las que no se observaron diferencias en dichos atributos por efecto del sistema de producción (Guerrero *et al.*, 2013) o de la alimentación de acabado (Moloney *et al.*, 2011). Esto pudo ser debido a otros factores de nuestro estudio (como la edad, condiciones pre-sacrificio o la “grasa” de la canal) que podrían contribuir a la calidad sensorial. En lo que respecta a la calidad de un producto cárnico, la terneza y jugosidad son los principales atributos que más influyen en las preferencias del consumidor (Font-i-Furnols & Guerrero, 2014). En el estudio actual, los resultados mostraron una variación de la terneza por efecto de la alimentación de acabado. Este resultado es controvertido, porque diferentes estudios no encontraron diferencias para la terneza entre novillos alimentados con pasto o con grano (French *et al.*, 2001; Realini *et al.*, 2004), mientras que otros

autores (Kerth *et al.*, 2007; Resconi *et al.*, 2010) observaron que la terneza de la carne era menor en animales alimentados con hierba frente a aquellos animales con grano. Asimismo, en lo que respecta a la jugosidad, en algunas investigaciones se ha encontrado que el ganado alimentado con hierba daba lugar a carne menos jugosa, mientras que en otros estudios no se encontraron diferencias para este atributo entre alimentación con pasto o grano. Todo esto sugiere que la edad, el manejo pre-sacrificio o el peso del canal podrían ser importantes factores que influyen la terneza, como previamente se ha observado en los trabajos de diversos autores (French *et al.*, 2001, 2000a; Kerth *et al.*, 2007).

El nivel de grasa es un factor clave para mejorar los parámetros sensoriales (como la terneza y la jugosidad), ya que la grasa intramuscular se correlaciona positivamente con la palatabilidad (Corbin *et al.*, 2015; O'Quinn *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio, no se observaron correlaciones entre la grasa intramuscular y los parámetros texturales o sensoriales. Esta discrepancia podría atribuirse a las diferencias mínimas observadas en el contenido de grasa intramuscular entre los grupos de los diferentes sistemas de producción, que pueden minimizar las posibles diferencias observadas por los panelistas en términos de terneza o jugosidad. Únicamente la intensidad de sabor global se correlacionó negativamente con el contenido de grasa intramuscular ($r = -0,398$; $P < 0,05$).

Los resultados obtenidos mostraron que la alimentación de acabado tuvo una gran influencia en la calidad de la carne de ternera, mientras que el efecto del sistema de producción fue menor en la mayoría de los parámetros evaluados. El perfil de ácidos grasos de los terneros criados en sistemas extensivos y semiextensivos concuerda con el rango de valores propuestos por las recomendaciones nutricionales de las organizaciones internacionales. Además, la carne obtenida de terneros procedentes de sistemas extensivos terminada sólo con pasto y complementada con pienso comercial resultó tener una gran palatabilidad. Además, este tipo de carne obtenida utilizando pastos en zonas al aire libre aumenta las expectativas y la satisfacción de los consumidores.

3.3.5 Análisis discriminante

El análisis discriminante permitió distinguir entre los grupos de distinta dieta con un 72,3% de la variación total. Este estudio sugiere que los animales alimentados con pasto podrían ser separados eficientemente en el eje F1. Las variables C20:5 $n-3$ y $n-3$ fueron las más importantes en este eje, lo que sugiere que el estudio de los perfiles de ácidos grasos en los terneros podría utilizarse eficientemente como un marcador para la conocer alimentación de acabado con la que rematan los terneros. Esto está de acuerdo con trabajos anteriores que demostraron la capacidad discriminante entre las dietas, usando el perfil de ácidos grasos en corderos (Santos-Silva *et al.*, 2002) o en toros (Horcada *et al.*, 2017)



CAPÍTULO II





4 CAPÍTULO II: ANÁLISIS SENSORIAL Y FÍSICOQUÍMICO DE LA CARNE DE RAZAS BOVINAS EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN, CONDICIONES MANEJO PRE-SACRIFICIO Y TIEMPOS DE MADURACIÓN

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

“Sensory and physicochemical analysis of meat from bovine breeds in different livestock production systems, pre-slaughter handling conditions, and ageing time”

López-Pedrouso, M¹.; Rodríguez-Vázquez, R¹.; Purriños, L².; Oliván, M^{3,4}.; García-Torres, S⁵.; Sentandreu, M. A⁶.; Lorenzo, J.M².; Zapata, C¹.; Franco, D². *Foods* 2020, 9, 176.

Editorial: MDPI; ISSN 2304-8158. DOI:10.3390/foods9020176

¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, 15872 Santiago de Compostela, España; ² Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N° 4, Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, España. ³ Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Apdo. 13, 33300 Villaviciosa, España; ⁴ ISPA, Avda Roma s/n, 33011 Oviedo, España; ⁵ CICYTEX (Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura), Junta de Extremadura. Ctra. A-V, Km372, 06187 Guadajira, España; ⁶Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenida Agustín Escardino, 7, Paterna, 46980 Valencia, España.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Animales y muestreo

Setenta y ocho terneros (24 AV, 22 RE y 32 RG) se usaron en este estudio. Las razas AV y RG se localizaron en el norte de España (Asturias y Galicia, respectivamente), mientras que la raza RE en el suroeste de España (Extremadura). Los terneros de AV y RE se obtuvieron a partir de un rebaño experimental del Servicio Regional de

Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA, Villaviciosa, Asturias) y del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX, Badajoz, Extremadura), respectivamente. Los terneros de RG criados bajo el sistema extensivo se obtuvieron de granjas familiares localizadas en Chantada (Lugo), mientras que aquellos terneros criados bajo sistema intensivo fueron proporcionados por la cooperativa COREN (Sarriaus, Ourense). Del número total de terneros, la mitad de los animales se criaron en sistema extensivo (E) basado en pasto natural y suplementado con pienso comercial, mientras que la otra mitad tuvo una alimentación basada fundamentalmente en pienso comercial (I). Los terneros de RG se sacrificaron a los 9 meses, mientras que los de AV y RE a los 15 meses de edad. La edad de sacrificio se fijó de acuerdo con las edades comerciales más habituales para cada raza en base a requerimientos de mercado local y de las indicaciones geográficas protegidas (I.G.P.). Previamente al sacrificio, la mitad de los terneros de cada sistema de manejo (E e I) se llevaron al matadero todos juntos (periodo final, tiempo de transporte y tiempo de espera), tratamiento de no-mezcla (NM), mientras que la otra mitad se mezclaron con individuos no familiares de otras granjas durante el transporte y las etapas de espera, grupo de mezcla (M).

Los terneros fueron aturdidos con un perno cautivo y sacrificados de acuerdo con las regulaciones actuales de la UE (Council Directive 93/119/EC; OJ, 1993), en mataderos acreditados. Los canales se enfriaron durante 24 h en una cámara convencional a 2°C (humedad relativa: 98%). En ese momento, el músculo *longissimus thoracis et lumborum* (LT) se extrajo de la mitad izquierda del canal entre la quinta y décima costilla y se cortaron seis filetes. El primer filete se usó para la determinación del pH, color y las pérdidas por goteo. El segundo filete se usó para la evaluación de la oxidación proteica y lipídica. Cuatro filetes correlativos desde la mitad del LT se usaron para determinar la fuerza de corte (test de Warner-Bratzler; $n = 2$) y el análisis sensorial ($n = 2$) a los 7 y 14 días. Estos últimos filetes se cortaron con un corte de un grosor de 3,5 cm, se envasaron bajo condiciones de vacío, y se almacenaron bajo condiciones refrigeradas ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta los posteriores análisis correspondientes a los tiempos de maduración (7 y 14 días).

4.1.2 Análisis fisicoquímico

A las 24 h post-sacrificio, el pH se midió al nivel de la sexta costilla con un pHmetro digital portátil equipado con una sonda de penetración. El color de la carne se midió en tres puntos distintos sobre la superficie del corte del músculo LT, a nivel de la 7ª costilla. Los parámetros de color (luminosidad, (L*)); índice de rojo (a*); índice de amarillo (b*)) se determinaron con un colorímetro portátil (Konica Minolta CM-600d, Osaka, Japón) bajo unas condiciones fijadas (lámpara de arco de xenón filtrada empleando el iluminante D65, con un ángulo de visión de 10° y 8 mm de tamaño de apertura). Los datos obtenidos fueron el resultado del valor medio en tres puntos representativos. Cromaticidad y tono se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones: Cromaticidad ($C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$) y tono ($\tan^{-1}b^*/a^*$).

La capacidad de retención del agua (WHC) se midió como pérdidas por goteo (DL), la cual se determinó sobre un trozo de carne de 50g tomada a las 24 h *post-mortem* y colocada en un contenedor especial (colector de carne, Sarstedt, Alemania). Después de la maduración (7 y 14 días), los filetes se congelaron y almacenaron a -20 °C para los subsiguientes como el análisis de dureza de la carne, que se midió mediante el test de corte Warner-Bratzler (WB). Para ello se cocinó la carne en un baño de agua a 100 °C hasta que se alcanzó una temperatura interna de 70 °C. Después del enfriamiento de la carne a temperatura ambiente se extrajeron ocho núcleos (1 cm² en una sección transversal cuadrada) y se sometieron a un corte de forma perpendicular a la dirección de las fibras musculares con la sonda de WB mediante el texturómetro TA.XT Plus (Stable Micro Sistema, Londres, UK). Se obtuvieron los valores de máxima carga (N) requerida para el corte completo. Los resultados se expresaron como la media del valor máximo de fuerza de corte WB para cada filete.

La oxidación lipídica se evaluó por duplicado por el método de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) de Salih *et al.* (1987). Los valores de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se calcularon a partir de la curva con patrón (tetraetoxipropano, TEP) y se expresaron como µg malondialdehído/g carne.

La oxidación proteica se evaluó por la medida de grupos carbonilos formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina en 2N HCL, siguiendo el método descrito por Oliver *et al.* (1987). La concentración de proteína se calculó por espectrometría a 280 nm usando como estándar la albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine serum albumin*). La oxidación proteica se expresó en nmol carbonilos/g proteína.

4.1.3 Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo siguiendo protocolos de la ISO 13299:2016, para evaluar la influencia del genotipo, sistema de producción, manejo pre-sacrificio, y el tiempo de maduración en los atributos organolépticos de la carne. El panel sensorial se compuso de doce panelistas (7 mujeres y 5 hombres, con edades desde 25 a 45 años) del Centro Tecnológico de la Carne de Galicia (Ourense, España) entrenados para análisis descriptivos de acuerdo con normativa ISO 8586:2012. La evaluación sensorial se realizó en cabinas individuales cerradas siguiendo protocolo ISO 8589:2010/A1:2014, bajo una luz roja. Las muestras del músculo LT se cocinaron en un horno a 180°C hasta alcanzar una temperatura interna de 70 °C, después estas se ofrecieron a los catadores en platos de plástico desechables, codificadas las muestras con tres dígitos generados aleatoriamente (Macfie *et al.*, 1989). Agua y tostadas sin sal se usaron al principio de la sesión y entre muestras para limpiar el paladar y eliminar los residuos de sabores. El análisis descriptivo cuantitativo (QDA) se realizó bajo un diseño de bloques equilibrados incompletos, donde cada panelista evaluó las muestras. Cada panelista evaluó 6 muestras de carne de 24 tratamientos estudiados en cada sesión y se realizaron un total de 12 sesiones. Se evaluaron los siguientes atributos de textura (terneza, jugosidad, fibrosidad, arenosidad, y untuosidad), olor (general y grasa), y sabor (general, grasa, hígado y ácido). La intensidad de cada atributo se evaluó en una escala lineal no estructurada desde 0 (sensación no percibida) a un 10 (máxima sensación).

4.1.4 Análisis estadísticos

Para los caracteres fisicoquímicos considerados en este estudio se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) usando el modelo general lineal (GLM) (SPSS 23.0, Chicago, IL, USA). El modelo usado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + LP_j + HP_k + B \times LP_{ij} + B \times HP_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

donde Y_{ij} es la observación de variables dependientes, μ es la media general, B_i es el efecto de la raza, LP_j es el efecto del sistema de producción, HP_k es el efecto de manejo pre-sacrificio, $B \times LP_{ij}$ y $B \times HP_{ik}$ son los términos de interacción de sistema de producción y manejo pre-sacrificio con el efecto de la raza, y ϵ_{ijk} es el error residual aleatorio asociado con la observación.

XLSTAT 2018 (Addinsoft, New York, NY, USA) se usó para analizar los datos del análisis sensorial. Se realizó un ANOVA, donde los panelistas y sesiones se consideraron como efecto aleatorio. Para la separación de medias (análisis *post hoc*) se usó el test Tukey's HSD a un nivel de significación de $P < 0,05$). El análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*) se llevó a cabo con aquellos atributos que fueron significativamente diferentes, y se estableció la relación entre atributos sensoriales y los diferentes sistemas producción, de manejo pre-sacrificio y del tiempo de maduración de las tres razas estudiadas. A partir de las muestras de atributos sensoriales se generó un dendrograma UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) usando el *software* XLSTAT 2018.

El análisis discriminante multivariante se realizó usando todos los caracteres fisicoquímicos y sensoriales evaluados para diferenciar entre los grupos de terneros. Para cada muestra se consideró una probabilidad "a priori" de pertenencia a un grupo u otro independientemente del tamaño del grupo y se utilizó el criterio para la selección de variables de Wilk's lambda (probabilidades-F para entrar y salir el valor de 0,05 y 0,10, respectivamente). Para determinar los coeficientes que maximizaban las diferencias entre muestras de maduración a 7 y 14 días se utilizó la función lineal discriminante conteniendo un conjunto óptimo de caracteres.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Efecto de la raza, sistema de producción y manejo pre-sacrificio en los parámetros fisicoquímicos de la carne

El pH, color, los parámetros de textura, oxidación lipídica, y oxidación de proteínas de la carne de terneros de AV, RE y RG se muestran en la Tabla 5. Las interacciones de los efectos sobre los valores del pH mostraron un bajo nivel de significancia ($P = 0,271$ y $P = 0,696$ para B x LPS y B x HPS, respectivamente), lo que demuestra que los efectos principales pueden ser examinados independientemente. Además, la raza afectó significativamente ($P < 0,0001$) a los valores de pH, mientras que no se vio afectado significativamente por el sistema de producción (E/I; $P = 0,678$) y el manejo pre-sacrificio (M/ MN; $P = 0,512$).

Tabla 5. Efecto de la raza, el sistema de producción y el manejo pre-sacrificio en la calidad de la carne del músculo *longissimus thoracis et lumborum* (LT). Fuente: López-Pedrouso *et al.* (2020)

	Breed			P-value	Livestock production system			Pre-slaughter Handling			Interactions with breed		SEM
	AV	RE	RG		E	I	P-value	M	NM	P-value	B x LPS	B x HPS	
pH	5.48 ^c	5.79 ^a	5.62 ^b	< 0.0001	5.63	5.65	0.678	5.64	5.64	0.512	0.271	0.696	0.019
Colour													
Luminosity (L*)	39.38 ^b	38.15 ^b	41.18 ^a	0.001	40.32	39.10	0.075	39.44	40.09	0.504	< 0.0001	0.505	0.304
Redness (a*)	16.14 ^b	22.04 ^a	11.74 ^c	< 0.0001	14.25	18.13	< 0.0001	16.65	15.36	0.101	< 0.0001	< 0.0001	0.211
Yellowness (b*)	11.03 ^b	11.17 ^b	12.54 ^a	< 0.0001	11.77	11.58	0.929	11.81	11.56	0.146	0.001	< 0.0001	0.166
Croma (C*)	19.72 ^b	26.73 ^a	17.20 ^c	< 0.0001	19.75	21.79	0.010	21.30	20.06	0.113	< 0.0001	< 0.0001	0.234
Hue (h ⁺)	36.10 ^b	25.92 ^c	47.08 ^a	< 0.0001	40.93	33.82	< 0.0001	37.47	37.99	0.161	< 0.0001	0.958	0.402
Textural parameters													
Drip loss (%)	1.92 ^a	1.41 ^b	1.89 ^a	0.001	1.75	1.77	0.490	1.63	1.88	0.055	0.401	0.130	0.056
WB- test (7 days, N)	91.7 ^b	113.6 ^a	66.4 ^c	< 0.0001	87.2	87.4	0.518	87.8	86.8	0.462	0.023	0.001	0.241
WB- test (14 days, N)	79.5 ^b	100.1 ^a	58.5 ^c	< 0.0001	76.4	77.0	0.570	75.6	77.7	0.093	0.001	< 0.0001	0.195
Lipid oxidation													
TBARS (7 days)	0.0667	0.0559	0.0687	0.671	0.0591	0.0711	0.094	0.0576	0.0710	0.251	< 0.0001	0.573	0.005
TBARS (14 days)	0.1767 ^a	0.0668 ^b	0.0884 ^b	0.003	0.0723	0.1551	0.001	0.0668	0.201	0.002	< 0.0001	< 0.0001	0.013
Protein oxidation													
Carbonyls (7 days)	1.48 ^b	2.19 ^a	1.99 ^a	< 0.0001	2.03 ^a	1.72 ^b	0.005	1.86	1.92	0.382	0.320	0.257	0.051
Carbonyls (14 days)	2.08	2.09	2.02	0.916	2.02	2.10	0.566	2.19	1.93	0.024	0.879	0.004	0.053

TBARS expressed in mg malonaldehyde/kg tissue; Carbonyls expressed in nmol carbonyl/mg protein; AV: Asturiana de los Valles; RE: Retinta; RG: Rubia Gallega; E=extensive, I=intensive; M=mixed, NM=non-mixed; B=breed; LPS= Livestock production system, HPS= pre-slaughter handling; SEM=standard error of mean; ^{a-c} Means in the same row with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

Respecto al color de la carne, las interacciones entre la raza y el sistema de producción y el manejo previo al sacrificio fueron significativas en la mayoría de los casos, en consecuencia, la interpretación de los principales efectos es compleja. Por ejemplo, en el caso de L^* y tono (*hue*) las interacciones entre la raza y el manejo pre-sacrificio no fueron significativas ($P = 0,505$ y $P = 0,958$, respectivamente), por lo que es apropiado analizar estos efectos de forma independiente. El efecto del manejo animal sería interesante estudiarlo por separado, pero en ambos casos no fue significativo ($P > 0,05$), mientras que el efecto raza debido a su interacción con el sistema de producción es un parámetro complejo de analizar pues para cada uno de los tres genotipos estudiados se encuentra afectado por el sistema de producción, por lo que no se pueden generalizar conclusiones para las tres razas.

Los parámetros de textura también demostraron presentar una situación altamente compleja de análisis por la presencia de la interacción con el factor raza. Sin embargo, la capacidad de retención de agua (WHC), expresado como pérdidas por goteo (DL), no mostró interacciones significativas, y los principales efectos podrían analizarse por separado. DL sólo se vio afectado por el efecto de la raza, que osciló entre el 1,41% y el 1,92% para RE y AV, respectivamente, sin variación significativa entre AV y RG.

El estado de oxidación lipídica y proteica de las muestras se evaluó en los dos tiempos de maduración. Respecto a los valores del TBARS, las interacciones del efecto raza se mostraron significativas en todos los casos, excepto para la interacción B x HPS, a los 7 días. Sin embargo, al analizar los efectos por separado no se observaron variaciones significativas. Por el contrario, las interacciones con la raza aparecieron en un menor grado para la oxidación de las proteínas. La oxidación de las proteínas en las muestras se vio afectada por la raza ($P < 0,0001$) y el sistema de producción ($P = 0,005$) a los 7 días.

4.2.2 Efecto de la raza, sistema de producción y manejo pre-sacrificio en los atributos sensoriales de la carne

Las puntuaciones medias para la evaluación sensorial y de textura de la carne para los efectos estudiados en el trabajo actual (raza, sistema de producción, manejo previo al sacrificio, y maduración) se presentan en la Fig. 10.



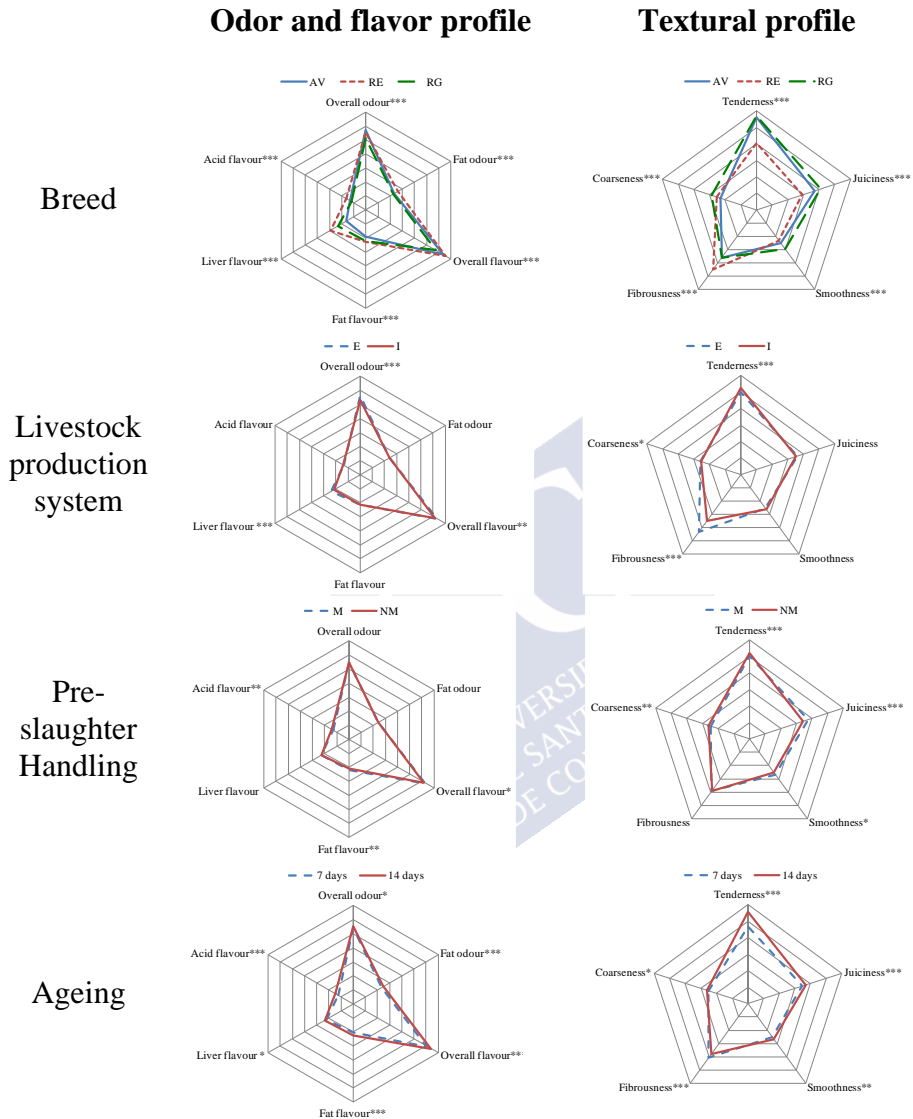


Figura 10. Gráfico de tela de araña del perfil sensorial y de textura del músculo *longissimus thoracis et lumborum* para cada efecto: raza, sistema de producción, manejo pre-sacrificio y maduración. AV: Asturiana de los Valles; RE: Retina; RG: Rubia Gallega; E= Extensivo, I= Intensivo; M= Mezcla, NM= no mezcla; Significancia estadística: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Fuente: López-Pedrouso *et al.* (2020)

Los resultados demostraron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre las tres razas para todos los atributos sensoriales (sabor, olor y textura). Sin embargo, las diferencias significativas en varios atributos fueron leves (olor general, olor a grasa, sabor general, sabor a grasa, sabor a ácido y arenosidad). Por lo contrario, los atributos con mayores diferencias entre las razas fueron el sabor a hígado, la terneza, la jugosidad, untuosidad y la fibrosidad. La carne de RE resultó más fibrosa, menos tierna y jugosa, mientras que la de AV y RG demostraron tener atributos sensoriales y de textura más similares.

Respecto a las diferencias entre el sistema extensivo e intensivo, se encontraron cambios significativos ($P < 0,001$) en el olor general, el sabor a hígado, terneza y fibrosidad (Fig. 10). La mayor variación se mostró en la fibrosidad, el cual fue más intenso en muestras de terneros criados en sistema extensivo. El sistema de producción tuvo un efecto significativo en la terneza, la jugosidad y la fibrosidad ($P < 0,001$), ya que los mayores valores de terneza se mostraron en terneros del sistema intensivo (5,27 vs. 4,97, para los grupos I y E, respectivamente), y también, ya que el valor más bajo de fibrosidad se mostró coherentemente en el sistema intensivo (3,49 vs. 4,31, para los grupos I y E, respectivamente).

En relación con el manejo pre-sacrificio, el sabor a ácido, sabor general y grasa al igual que todos los atributos de textura fueron significativos, excepto la fibrosidad ($P > 0,05$). Es de destacar que la mezcla previa al sacrificio tuvo un efecto significativo en la textura, disminuyendo la terneza significativamente (5,21 vs. 5,03, $P < 0,001$, para los grupos NM y M, respectivamente) y aumentando significativamente la jugosidad (3,4 vs. 3,7, $P < 0,001$, para los grupos NM y M, respectivamente). Finalmente, el tiempo de maduración, como era de esperar, tuvo el efecto más importante en la terneza, jugosidad y la fibrosidad, logrando mejores puntuaciones a los 14 días, en la terneza y jugosidad, mientras que las carnes a los 7 días son más fibrosas. La maduración también tuvo una influencia significativa en todos los atributos sensoriales relacionados con el olor y sabor.

4.2.3 Análisis discriminante de componentes principales para el factor raza

El análisis factorial tiene como objetivo obtener un número reducido de componentes principales que expliquen la variabilidad de las muestras. Se analizaron los descriptores sensoriales y de textura de los 24 casos posibles siendo evaluados desde un punto de vista multidimensional. Como se muestra en la Fig. 11, un espacio multidimensional basado en estos datos se muestra en un *bi-plot*. La varianza total explicada para los parámetros de sabor y olor fue del 68,96 %. La primera componente principal (PC1), explicó el mayor porcentaje de varianza (43,98%) y se asoció principalmente con los atributos de sabor (ácido, general e hígado, en este orden). Por lo tanto, las muestras pertenecientes a AV y RG se situaron en el lado izquierdo, y la mayor parte de las pertenecientes a RE en el lado derecho, distinguiéndose bien. Por otro lado, el segundo componente principal (PC2), representó el 24,98% de la variabilidad total y se relacionó positivamente con el sabor a grasa, mientras se correlacionó negativamente con el olor general. A lo largo del PC2, las muestras de AV y RG se separaron, con RG y AV ubicadas en los cuadrantes superior e inferior, respectivamente. Además, los aspectos más relevantes de RE se asociaron con un sabor fuerte, posicionándose la mayoría de las muestras en el lado derecho del *bi-plot* (Fig. 11A).

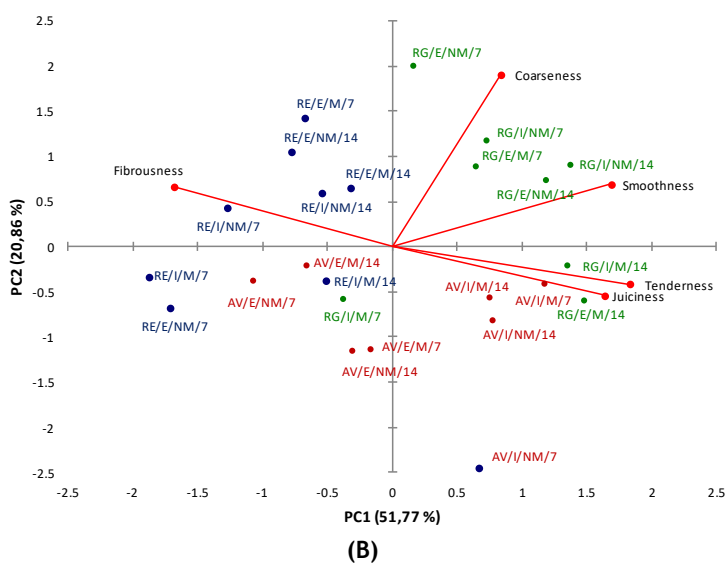
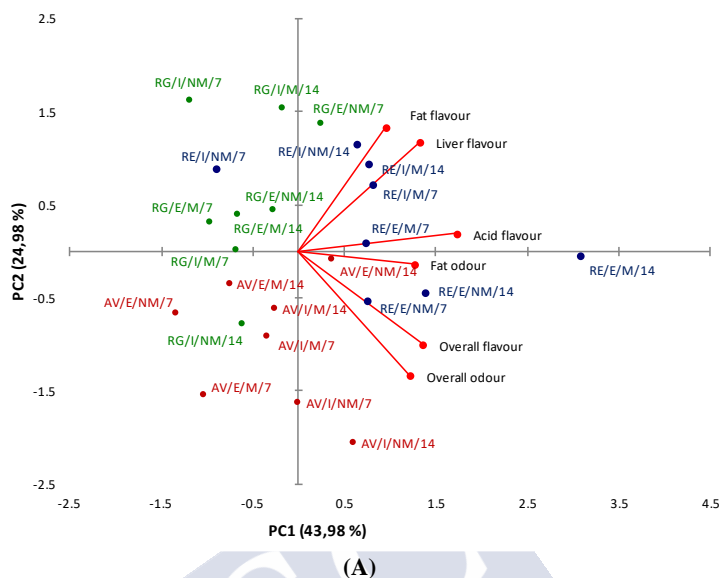


Figura 11. Análisis de los componentes principales (PCA) determinado por las componentes principales (PC1) y (PC2) de los atributos sensoriales y de textura evaluados entre los grupos. A) Parámetros de sabor y olor, B) Parámetros de textura. AV: Asturiana de los Valles; RE: Retinta; RG: Rubia Gallega; E=extensivo, I=intensivo; M=mezcla, NM=no-mezcla; 7=7 días de maduración, 14=14 días de maduración. Fuente: López-Pedrouso *et al.* (2020)

El segundo PCA se basó en los atributos texturales, obtenidos del análisis sensorial (Fig. 11B). Las dos primeras componentes principales acumularon un total del 72,63% de la varianza total de los datos, lo que permitió una ligera separación por razas. La proyección de las variables indicó que casi todas las muestras RG y la mayoría de las muestras AV se caracterizaron positivamente por su arenosidad, untuosidad, terneza y jugosidad, mientras que las muestras de RE se correlacionaron con la fibrosidad. Específicamente, la terneza, jugosidad y la untuosidad se relacionaron con la carne madurada a los 14 días (Fig. 11B).

Se desarrolló un análisis discriminante canónico (CDA) utilizando el método “paso a paso”, y la validación cruzada de dejar un dato fuera para validar los resultados. Un conjunto de datos compuestos por los parámetros fisicoquímicos y sensoriales se sometió al CDA con la variable de selección de la raza. Antes del análisis discriminante, se realizó una correlación de Pearson entre los atributos sensoriales y los parámetros fisicoquímicos. Se obtuvo una correlación significativa entre todos los parámetros de textura y la fuerza de corte en los dos tiempos de maduración explorados en este estudio. La terneza y la jugosidad se correlacionaron negativamente con la fuerza de corte a los 7 y 14 días (coeficientes para la terneza $r = -0,499$ y $r = -0,536$, $P < 0,01$, para 7 y 14 días, respectivamente; coeficientes de jugosidad $r = -0,424$ y $r = -0,377$, $P < 0,01$, para 7 y 14 días, respectivamente) y la fibrosidad se correlacionó positivamente con la fuerza de corte a los 7 y 14 días (coeficientes para terneza $r = 0,324$ y $r = 0,536$, $P < 0,01$, para 7 y 14 días, respectivamente).

Para las muestras de carne maduradas durante 7 días el análisis discriminante seleccionó las siguientes variables: olor a grasa, sabor general, sabor a hígado, terneza, jugosidad, fibrosidad, arenosidad, pérdidas por goteo, L*, a*, b* y WB-7. Estas variables se conservaron al final del análisis discriminante y se combinaron linealmente para obtener funciones discriminantes canónicas. Se utilizaron dos funciones discriminantes canónicas en el análisis, y las funciones discriminantes de clasificación obtenidas fueron:

$$F1 = 0,594 [\text{Olor_grasa}] + 0,211 [\text{Sabor_general}] - 0,116 [\text{Sabor_Hígado}] - 0,781 [\text{Terneza}] - 1,219 [\text{Jugosidad}] + 0,673$$

$$\begin{aligned}
 & [\text{Fibrosidad}] + 0,175 [\text{Aspereza}] - 0,282 [\text{DL}] + 0,510 [\text{L}^*] + 1,901 \\
 & \quad [a^*] - 1,156 [b^*] - 0,062 [\text{WB7}] \\
 & \text{F2} = 0,113 [\text{Olor_grasa}] + 0,687 [\text{Sabor_general}] - 0,746 \\
 & \quad [\text{Sabor_hígado}] + 0,631 [\text{Terneza}] - 0,122 [\text{jugosidad}] - 0,167 \\
 & \quad [\text{fibrosidad}] - 0,342 [\text{arenosidad}] + 0,410 [\text{DL}] - 0,123 [\text{L}^*] + 0,402 \\
 & \quad [a^*] - 0,617 [b^*] + 0,515 [\text{WB7}]
 \end{aligned}$$

Según estos coeficientes, los parámetros que más explican la separación en la función F1 fueron los parámetros de color (a^* y b^*) y jugosidad, mientras que las variables que explican la separación de grupos en la función F2 fueron el sabor a hígado y el sabor general, seguidos del índice de amarillo.

Para las muestras de carne maduradas a los 14 días, las funciones discriminantes de clasificación obtenidas fueron:

$$\begin{aligned}
 \text{F1} & = - 0,189 [\text{Sabor_hígado}] + 0,540 [\text{Sabor_Ácido}] - 1,028 \\
 & \quad [\text{Terneza}] - 0,589 [\text{Jugosidad}] - 0,037 [\text{Untuosidad}] + 0,563 \\
 & \quad [\text{Fibrosidad}] - 0,588 [\text{Aspereza}] + 0,183 [\text{pH}] + 1,809 [a^*] - 0,952 [b^*] \\
 \text{F2} & = 0,868 [\text{Sabor_hígado}] + 0,145 [\text{Sabor_ácido}] - 0,288 \\
 & \quad [\text{Terneza}] + 0,032 [\text{Jugosidad}] + 0,580 [\text{Untuosidad}] - 0,406 \\
 & \quad [\text{Fibrosidad}] + 0,210 [\text{Aspereza}] + 0,539 [\text{pH}] - 0,247 [a^*] + 0,432 [b^*]
 \end{aligned}$$

Según estos coeficientes, los parámetros que más explican la separación producida por la función F1 fueron el índice de rojo, terneza e índice de amarillo. Las variables que explican la segregación de los grupos aplicando la función F2 fueron el sabor a hígado, seguido de la untuosidad y el pH. Todas estas variables fueron útiles para la discriminación de carne de terneros de diferentes razas. Los resultados obtenidos para la función F1 se trazaron frente a los resultados obtenidos de la función F2 en ejes de coordenadas para cada muestra, y se observó una buena separación entre las diferentes razas en ambos días de maduración (Fig. 12).

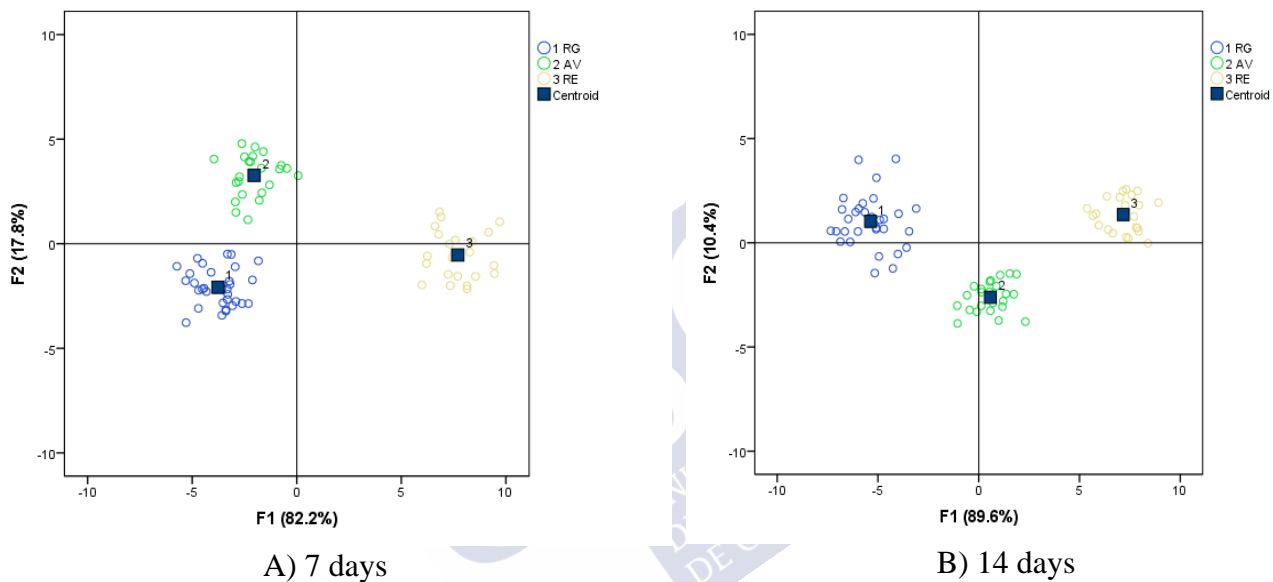


Figura 12. Análisis discriminante para los atributos sensoriales y fisicoquímicos empleados para la discriminación de las tres razas del estudio. AV: Asturiana de los Valles; RE: Retinta; RG: Rubia Gallega. Fuente: López-Pedrouso *et al.* (2020)

La función F1 explicó un 82,2% y 89,6% de la varianza, para los 7 y 14 días de maduración, respectivamente. Mientras que la F2 explicó el 17,8% y el 10,4% de la varianza, para los 7 y 14 días, respectivamente, alcanzando una varianza total explicada del 100% cuando se emplean ambas funciones. Se realizó una validación cruzada en la que cada caso se clasificó usando las funciones derivadas de todos los casos distintos de ese caso, que se dejó fuera y así sucesivamente se procedió para cada muestra que se validaba. El análisis discriminante atribuyó correctamente a cada muestra de carne a su grupo original con una precisión del 100%. Debido al número de atributos sensoriales incluidos en las funciones discriminantes, los hallazgos del presente estudio sugieren que estas razas poseen un perfil sensorial significativamente diferente lo que permite satisfacer una amplia gama de preferencias de los consumidores.



4.3 DISCUSIÓN

4.3.1 Efecto de la raza, sistema de producción y el manejo pre-sacrificio en los parámetros fisicoquímicos de la carne

Para todas las razas, los valores de pH se situaron en el rango entre 5,48 y 5,79 y por debajo de 5,8, indicando la ausencia de factores de estrés. De hecho, uno de los defectos más importantes de la carne de vacuno es el conocido como corte oscuro que se caracteriza por un color oscuro, textura firme y sequedad superficial (*Dark, firm and dry* (DFD)), y que se produce a partir de animales que sufrieron un estrés pre-sacrificio (Zhang *et al.*, 2017). Otros autores han informado de variaciones en el pH de la carne en toros de razas rústicas por efecto del sistema de producción (Guerrero *et al.*, 2013; Humada *et al.*, 2014). Sin embargo, en otros estudios esas diferencias en el pH no fueron observadas (Realini *et al.*, 2004).

El color es uno de los caracteres más importantes de la calidad de la carne, considerado como uno de los principales criterios de decisión de compra, y se prefiere la carne roja brillante frente a la pálida/oscura porque se la asocia con la frescura de la carne. Las variaciones en las características de color podrían deberse a diferencias en los genotipos, como lo indicaron previamente otros autores (Domingo *et al.*, 2015; Gatellier *et al.*, 2005; Lanari *et al.*, 2002). Se ha demostrado que los sistemas extensivos contribuyen a cambiar los tipos de fibra muscular, lo que resulta en un color más oscuro en la mayoría de los casos (Dunne *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran una clara interacción de las razas, resultando en una interpretación más compleja. Otros autores encontraron fuertes interacciones entre la raza y la dieta respecto a los parámetros del color en la carne de las razas Aberdeen Angus y Holstein-Friesian, con una edad de 19 meses (Warren *et al.*, 2008). El sistema de producción y el peso vivo también interactúan significativamente en el ganado Charolais x Friesian según

Keane & Allen, 1998. Nuestros resultados demostraron que el efecto del sistema de producción y el manejo previo al sacrificio también mostraban interacciones respecto al color por lo que debe evaluarse dentro de cada raza.

La capacidad de retención de agua (WHC) es un parámetro importante en la calidad de la carne, ya que juega un papel fundamental en la organización muscular, afectando a la apariencia, el color, la ternera, y la jugosidad después del cocimiento (Hughes *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2015). La WHC se mantuvo inalterada por efecto del sistema de producción, en concordancia con los resultados mostrados por otros autores (Bispo *et al.*, 2010a; Oliete *et al.*, 2006). Sin embargo, el efecto de la raza en las pérdidas por goteo fue importante.

En este estudio, los parámetros de textura se evaluaron mediante la prueba de WB, mostrando una fuerte interacción de la raza con el sistema de producción y el manejo pre-sacrificio. Además, el efecto de la raza también podría llevar implícito la diferente edad de sacrificio, ya que la edad de sacrificio fue específica de la raza y dependía de los requisitos del mercado local. La variación de la ternera entre razas podría explicarse por las diferencias en genotipo y edad de sacrificio, como previamente informó Lucero-Borja *et al.* (2014). Este hecho también podría explicar las interacciones, porque la calidad de la carne difiere con la edad/peso del sacrificio, el sistema de producción y las interacciones con el peso vivo al sacrificio (Keane & Allen, 1998). En otros estudios, el efecto de la edad de sacrificio en la ternera, evaluado por métodos sensoriales e instrumentales, fue contradictorio, según lo informado por Chambaz *et al.* (2003). De hecho, estos autores que trabajaron con novillos de cuatro razas con diferente tasa de madurez (Angus, Simmental, Charolais y Limousin), sacrificados con un contenido de grasa intramuscular similar (3,25%) pero a diferentes edades (381, 499, 513 y 594 días, respectivamente), no observaron diferencias en la fuerza de corte de WB entre las diferentes razas. Sin embargo, indicaron que la carne de novillos de las razas Angus y Limousin, juzgada por los panelistas, era significativamente más tierna que la de los novillos Simmental, mientras que la carne de Charolais se calificó como intermedia. Por otro lado, nuestros resultados no respaldan la investigación previa de Panea *et al.* (2018), donde se llevó

a cabo un análisis exhaustivo de diez razas bovinas europeas, y que mostro que las razas AV y RE eran similares en cuanto a ternura. Esta discordancia con nuestro estudio podría atribuirse a las variaciones del sistema de alimentación (intensivo), el tiempo de maduración (14 días) y las posibles variaciones durante el proceso de descongelación y las condiciones de cocción (tiempo y/ o temperatura). Este último factor fue evaluado por Lepetit *et al.* (2000), que estudio el efecto de la temperatura/ tiempo de cocción de varios músculos en el rango de 20 – 80 °C, empleando la prueba de compresión y comprobó como pequeñas variaciones de temperatura y tiempo tenían un importante influencia en los valores de terneza. En nuestro trabajo, se constata que tanto el efecto del sistema de producción como el manejo previo al sacrificio sobre la terneza debe ser analizado dentro de cada raza debido a las interacciones.

Otra consideración importante es la susceptibilidad de las proteínas a sufrir oxidación, lo que lleva a un posible efecto perjudicial sobre la calidad de la carne. Nuestros resultados mostraron el efecto de la raza sobre el nivel de carbonilos a los 7 días, indicando que las muestras de AV fueron las que menos se oxidaron. Sin embargo, las diferencias de oxidación proteica debido al efecto de la raza se redujeron a medida que aumento el tiempo de maduración. Poco se sabe sobre la relación entre la oxidación de proteínas y la carne de vacuno de diferentes razas, pero la edad del animal es un factor importante que produce un aumento en el contenido de carbonilos (Cho *et al.*, 2015). Traore *et al.* (2012) plantean una hipótesis sobre la posible relación entre las pérdidas por goteo y la oxidación proteica en *longissimus thoracis* del cerdo, sugiriendo que ambos parámetros, afectados fuertemente por el efecto de la raza, podrían estar relacionados.

4.3.2 Efectos de la raza, sistema de producción y manejo pre-sacrificio en los atributos sensoriales de la carne

Las variaciones en los atributos sensoriales (Fig. 10) fueron consistentes con las de Gregory *et al.* (1994), quienes encontraron que los parámetros de textura mostraron las mayores diferencias entre la

carne de nueve razas (Red Poll, Hereford, Angus, Limousin, Braunvieh, Pinzgauer, Gelbvieh, Simmental y Choralais). El atributo de sabor a hígado, que se considera un sabor desagradable y este fue más intenso en RE que en AV o RG lo que podría estar relacionado con el contenido de hierro en el músculo (Resconi *et al.*, 2010), que se ha informado más alto en RE (Gil *et al.*, 2001) que en AV y RG (Bispo *et al.*, 2010a; Sierra *et al.*, 2010).

La similitud en los parámetros de textura entre AV y RG puede explicarse por el hecho de que la distancia genética entre AV y RG es menor que entre AV y RE, según el estudio filogenético realizado por Cañas-Álvarez *et al.* (2015). Esta hipótesis es coherente con el análisis de *clusters* basado en los parámetros sensoriales que se muestran en la Fig. 13. Aunque el UPGMA basado en los parámetros de sabor y olor no mostró una separación clara entre AV y RG en los *clusters* diferenciales, el análisis UPGMA agrupó seis muestras de carne de RE basadas en parámetros de sabor y olor, mostrando una mayor diferenciación entre esta raza y las otras dos. Estos resultados sugieren que la raza RE tiene un sabor característico, que los panelistas entrenados detectaron claramente. Se puede encontrar una gran cantidad de literatura que intenta desentrañar la influencia de la alimentación, la raza, el sexo, la maduración, así como el procesamiento y la cocción de alimentos en el sabor de la carne de vacuno, según lo revisado por Aaslyng & Meinert (2017). Sin embargo, el UPGMA basado en los parámetros texturales no proporcionó ninguna separación entre las muestras.

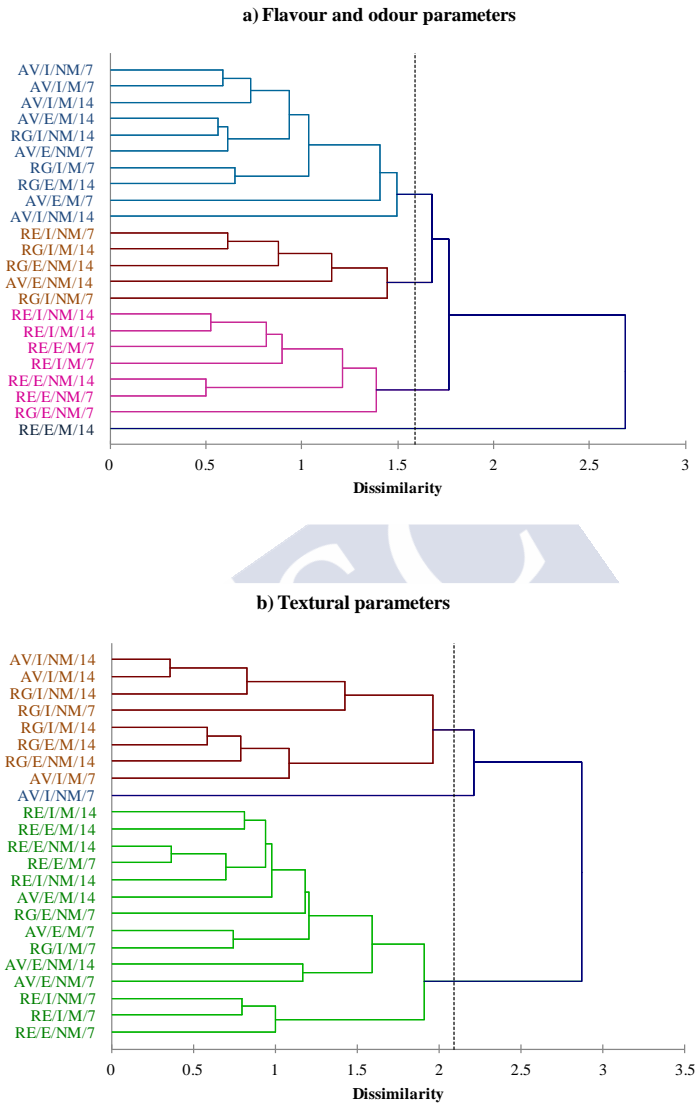


Figura 13. Análisis de conglomerados usando el método *unweighted pair-group method with arithmetic mean* (UPGMA) para obtener un dendrograma basado en los parámetros de sabor y olor (a) y los parámetros de textura (b). AV: Asturiana de los Valles; RE: Retinta; RG: Rubia Gallega; E=Extensivo, I= Intensivo; M= mezcla; NM =No-mezcla; 7 = 7 días de maduración, 14= 14 días de maduración. Fuente: López-Pedrouso *et al.* (2020).

Las diferencias sensoriales asociadas con los sistemas extensivos e intensivos no fueron coherentes con estudios previos en los que no se hallaron diferencias en los atributos sensoriales atribuibles al sistema de producción (Guerrero *et al.*, 2013) ni a la dieta de acabado (Moloney *et al.*, 2011). Sin embargo, Chail *et al.* (2016), sugirieron que las diferencias en los atributos sensoriales se debieron a variaciones en la dieta de acabado.

La terneza y la jugosidad son los atributos más críticos en las preferencias del consumidor (Font-i-Furnols & Guerrero, 2014). Los valores más altos de terneza se detectaron en carne de terneros criados en sistemas intensivos. Una posible explicación se basa en las diferencias en la grasa intramuscular, ya que se correlaciona positivamente con la palatabilidad (Corbin *et al.*, 2015; O'Quinn *et al.*, 2012). Sin embargo, este resultado es controvertido, puesto que varios estudios no informaron de variaciones en la terneza entre novillos alimentados con pasto y grano (French *et al.*, 2001; Realini *et al.*, 2004). Por el contrario, otras investigaciones mostraron que la terneza fue mayor en terneros alimentados con grano frente a otros terminados con pasto (Kerth *et al.*, 2007; Resconi *et al.*, 2010).

Otro factor importante que sin duda contribuye a la textura y la terneza de la carne es el colágeno intramuscular/tejido conectivo y su solubilidad (French *et al.*, 2001; Nishimura, 2010; Purslow, 2018). En general, se ha demostrado a lo largo de la literatura que más que el sistema de producción son los factores edad, manejo inadecuado pre-sacrificio o peso canal lo que podrían afectar en mayor medida a la textura final de la carne (French *et al.*, 2001, 2000a; Kerth *et al.*, 2007). La raza junto con su sistema de producción típico bajo las diferentes indicaciones geográficas protegidas (I.G.P.), han mostraron diferencias en la carne de tres razas españolas: Bruna dels Pirineus, Avileña Negra Ibérica y Morucha en los atributos sabor, ternura y jugosidad (Serra *et al.*, 2008).

El efecto de maduración en los atributos sensoriales y de textura es ampliamente conocido, así como deseado, para producir los cambios necesarios en el músculo, que conducen a las características sensoriales típicas de la carne, especialmente en la carne de vacuno (Revilla & Vivar-Quintana, 2006; Sañudo *et al.*, 2004). Como se puede observar

en la Fig. 10, la maduración produjo diferencias significativas en todos los atributos, siendo los más importantes los relacionados con las propiedades de textura (terneza, jugosidad y fibrosidad). Como se esperaba, la carne con un mayor tiempo de maduración mejoró en la calidad de la alimentación, proporcionando una terneza y jugosidad superiores, como se describió en Colle *et al.* (2016). A partir de nuestros resultados, se puede inferir que el consumo de carne RG se recomendaría con tiempos de maduración más cortos, mientras que las carnes de AV y RE necesitarían un período de maduración más largo para lograr una mayor aceptación por parte de los consumidores.

4.3.3 Análisis discriminante de componentes principales para el factor raza

La contribución del sabor a la palatabilidad general de la carne ha sido ampliamente demostrada (O'Quinn *et al.*, 2018). Nuestros resultados obtenidos del PCA indicaron que la carne RE es muy sabrosa y puede ser muy apreciada por los consumidores. Uno de los objetivos clave para las estrategias de comercialización es obtener la mejor calidad sensorial en productos heterogéneos como la carne de vacuno. Actualmente se están revisando innovaciones en los diferentes cruces, la alimentación del ganado y otros aspectos de la producción animal. En este sentido, recientemente, un estudio de consumidores demostró que las muestras de carne de ganado alimentado con pienso comercial ecológico vs. al aire libre positivamente evaluados a nivel sensorial (García-Torres *et al.*, 2016). En la misma línea, la raza AV fue analizada por un estudio de consumidores para mejorar su calidad de alimentación, estudiando los tiempos de maduración y los genotipos dentro de la raza. Los resultados de esta investigación mostraron que las preferencias de los consumidores cambiaban según su edad, mostrando que la gente joven prefería carnes de maduración temprana-intermedia y la gente más mayor prefería carne con más tiempo de maduración (Sierra *et al.*, 2010). Desafortunadamente, se han llevado a cabo poco estudios sensoriales entre estas razas autóctonas.

En la bibliografía disponible, se han descrito correlaciones similares entre la terneza y la fuerza de corte, a las obtenidas en este presente estudio que van desde -0,32 a -0,94 (Sierra *et al.*, 2010; Caine *et al.*, 2003). Además de la terneza y la jugosidad, se ha demostrado que el sabor y el olor son los principales atributos que influyen en la aceptabilidad del consumidor de la carne de vacuno (Neely *et al.*, 1998). En la presente investigación, el sabor del hígado se correlacionó positivamente con la oxidación proteica a los 7 días de maduración ($r = 0,453$, $P < 0,01$) y los valores de TBARS con la intensidad de olor a los 14 días de maduración ($r = 0,336$; $P < 0,01$). Estos hallazgos sugieren la influencia del estado de oxidación (de proteínas y lípidos) en el desarrollo de las notas desagradables de sabor y olor en la carne. De hecho, el desarrollo de sabores negativos se ha asociado con la oxidación lipídica en carne (Jiang *et al.*, 2011). La oxidación de proteínas ha sido ampliamente investigada en el procesamiento de carne *post mortem*, lo que lleva a cambios en los atributos sensoriales (Soladoye *et al.*, 2015). En general, estos hechos confirman que hay cientos de compuestos volátiles que contribuyen al sabor y olor de la carne que provienen de los productos de descomposición de lípidos y proteínas (Calkins *et al.*, 2007)



CAPÍTULO III





5 CAPÍTULO III: MEDIDA DE DISTANCIA PROTEÓMICA CUANTITATIVA ENTRE CARNE DE RAZAS BOVINAS ESPAÑOLAS

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

“Measuring quantitative proteomic distance between Spanish beef breeds”

Rodríguez-Vázquez, R¹.; Mato, A¹.; López-Pedrouso, M¹.; Franco, D². Sentandreu, M. A³.; Zapata, C¹.; *Food Chemistry* 2020, 315, 126293. Editorial: Elsevier; eISSN: 1873-7072; ISSN 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126293

¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, 15872, Santiago de Compostela, España; ² Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N° 4, Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, España. ³ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenida Agustín Escardino, 7, Paterna, 46980 Valencia, España.

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 Razas bovinas y muestras de carne

Tres razas bovinas (*Bos taurus* L.) criadas en diferentes regiones españolas se usaron en este estudio: AV (Asturias), RE (Extremadura) y RG (Galicia). Animales pertenecientes a las tres razas españolas se transportaron por carretera desde las granjas hasta mataderos acreditados en un tiempo que no excedió una hora y se sacrificaron siguiendo los requerimientos establecidos por la legislación de la Unión Europea (Council Directive 93/119/EEC) sin intervención posterior en los canales. Terneros machos de las tres razas se sacrificaron a la edad usual en la industria cárnica española: 9-10 meses en AV y RE y 5-6 meses en la raza de ganado RG. Las muestras de carne de cada raza de ganado bovino se recogieron a las 2 h *post-mortem* para evitar las

diferencias proteómicas causadas por las variaciones del procesado de la carne *post-mortem* entre los mataderos. Un filete de 2 cm se separó de cada animal en la decimotercera costilla en el músculo LT. Las muestras de carne se empaquetaron al vacío y se transportaron al laboratorio bajo condiciones refrigerantes, liofilizados y almacenados a -80 °C. Seis réplicas biológicas independientes de cada una de las tres razas se usaron para los análisis proteómicos.

5.1.2 Extracción de proteínas y cuantificación

La proteína total se extrajo a partir de muestras de carne liofilizadas como se describió en Franco *et al.* (2015). Una cantidad de 50 mg de cada muestra liofilizada se mezcló con 1,5 mL de tampón de lisis (urea 7 M; tiourea 2 M; ditiotretitol (DTT) 10 mM; 4% de CHAPS; y 2% de Farmalitos (pH 3-10), GE Healthcare, Chicago) y se lisó en un sonicador S-250 (Sonifier 250, Branson, Danbury), manteniéndose en un baño de agua-hielo para evitar el calentamiento excesivo. Las proteínas se purificaron usando el kit Clean-Up (GE Healthcare) y se resuspendieron en 500 µL de tampón de lisis. La cuantificación del total de concentración de proteínas se realizó con el kit ensayo de proteínas CB-X (G-Biosciences, St. Louis) basado en una mejora del método Bradford, usando un lector de microplacas Chromate 43000 (Awareness Technology, Palm City). La albúmina de suero bovino (BSA) se usó como estándar proteico para la calibración.

5.1.3 Electroforesis bidimensional

Las proteínas del músculo LT se separaron previamente como está establecido por los protocolos de 2-DE (Franco *et al.*, 2015). Brevemente, 450 µg del total de proteínas extraídas se disolvieron en tampones de lisis y rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, 4 % de CHAPS, 0,002% de azul bromofenol) junto con 0,6% DTT y un 1% de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (Bio-Rad Laboratories, Hercules). La mezcla se cargó en tiras IPG de 24-cm-largo con un gradiente de pH lineal de 4-7 (Bio-Rad Laboratorios). El enfoque isoeléctrico de la

primera dimensión (IEF) se realizó usando el sistema de célula PROTEAN IEF (Bio-Rad Laboratories), aplicando un voltaje que se aumentó progresivamente hasta alcanzar 70 kVh después de un paso inicial de rehidratación (50 V para 12 h). Una vez finalizado el IEF, las tiras enfocadas se equilibraron con los tampones de equilibrado I (Tris 50 mM pH 8,8; urea 6 M; 1% de DTT; 30% de glicerol; y 2% de dodecil sulfato de sodio, SDS) y II (Tris 50 mM pH 8,8, urea 6 M, 30% de glicerol; 2% de SDS; y un 2,5% de iodoacetamida), 15 min cada uno a temperatura ambiente. La segunda dimensión se realizó con geles de electroforesis de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) a través de tiras que se transfieren a geles del 13% (w/v) de 24 x 20 cm, usando un sistema vertical multigel de electroforesis Ettan DALTsix (GE, Healthcare) a 18 mA/gel durante 15 h después de un paso inicial de 6 mA/gel durante 1 h. Los geles fueron seguidamente teñidos con el tinte fluorescente SYPRO Ruby (Lonza, Rockland) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los marcadores de masa molecular de proteínas entre 15 y 200 kDa (Fermentas, Ontario) se cargaron en un pocillo lateral de los geles SDS-PAGE.

5.1.4 Análisis de imagen

Los geles 2-DE se escanearon usando un Gel Doc XR + system (Bio-Rad Laboratories). La detección, emparejamiento y cuantificación del volumen de los *spots* se realizó automáticamente con PDQuest Advanced software v. 8.0.1. (Bio-Rad Laboratories) y se comprobó manualmente. Los volúmenes normalizados de los *spots* se obtuvieron después de la sustracción del fondo usando la densidad de los *spots* validados a través de los geles replicados. Para análisis posteriores únicamente se consideraron reproducibles, de los *spots* validados, aquellos que se encontraban en al menos cuatro réplicas de cada raza de ganado. El punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (M_r) de cada *spot* se obtuvieron usando como referencia las mencionadas tiras IPG lineares (pH 4-7) y marcadores de masa molecular estándar, respectivamente.

5.1.5 Identificación proteica por espectrometría de masas

La identificación de proteínas se realizó por MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS como se especificó anteriormente por Franco *et al.* (2015). De manera resumida, los spots se escindieron de los geles y se sometieron a una digestión *in-gel* con tripsina. Los péptidos eluidos se concentraron en una SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham) y se almacenaron a -20°C hasta el análisis por espectrometría de masas. Una mezcla de péptidos redissueltos en ácido fórmico y solución matricial se transfirieron a una placa diana de 384 pocillos Opti-TOF MALDI (Applied Biosystems, Foster City) usando el método de capa fina. Los espectros de masas fueron después registrados en un espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) con un modo reflector de ion positivo, un láser Nd:YAG con una onda de 355 nm y una media de 1000 disparos/espectro láser. La calibración de la masa se realizó usando al menos tres picos de autólisis de tripsina. Los iones precursores para el posterior análisis de los fragmentos MS/MS se seleccionaron con una resolución relativa de 300 (FWHM) y supresión metaestable. El *software* de la serie 4000 Explorer v. 3.5 (Applied Biosystems) se utilizó para crear un análisis automatizado de los datos de masas. Se hizo una búsqueda de datos de péptidos combinada (PMF y de los espectros de fragmentos de iones del MSMS) contra la bases de datos de proteínas no redundantes de *B. taurus* UniProtKB/SwissProt a través del *software* Explorer v. 3.6 GPS usando el *software* Mascot v. 2.1 (Matrix Science, Boston), teniendo en cuenta los siguientes ajustes: una tolerancia de masas de iones precursores y fragmentos de 30 ppm y 0,35 Da, respectivamente; el carbamidometilación de cisteína (CAM) y la metionina oxidada con modificaciones fijas y variables, respectivamente; y se permitió un sitio de corte de tripsina fallido. La identificación por Mascot se validó manualmente. La identificación de las proteínas requirió al menos tres coincidencias de péptidos con la misma proteína y un *P*-valor de Mascot con un umbral de significación < 0,05.

5.1.6 Análisis estadístico

El método de *bootstrap* no-paramétrico se usó para obtener intervalos de confianza (*CIs*, *confidence intervals*) para las medias de los volúmenes de *spots* a través de réplicas de cada raza de acuerdo con Franco *et al.* (2015). Para cada *spot*, 20.000 muestras *bootstrap* de tamaño n (número de réplicas = 6) se obtuvieron con remplazo utilizando el algoritmo Monte Carlo. El *CI bootstrap* del 95% se construyó a partir de la distribución de 20.000 réplicas de los valores medios por el método de percentiles con la corrección de sesgo (Efron, 1982). Los *CIs bootstrap* se corrigieron en comparaciones múltiples con el método de Bonferroni para hacer que la tasa de error α fuera igual a 0,05. Los *CIs* se calcularon usando el *software* estadístico R de código abierto.

Los cambios cuantitativos en los volúmenes de los *spots* entre los pares de razas se evaluaron por la medida de *fold change* (*FC*) y *relative change* (*RC*) (Franco *et al.*, 2015). La medida *FC* entre pares de razas se calculó por $FC_{AV-RE} = V_{RE}/V_{AV}$, $FC_{AV-RG} = V_{RG}/V_{AV}$, $FC_{RE-RG} = V_{RG}/V_{RE}$, donde V_{AV} , V_{RE} y V_{RG} son la media de los volúmenes del mismo *spot* en los geles 2-DE de seis muestras replicadas de las razas AV, RE y RG, respectivamente. Los valores *FC* inferiores a uno se representaron por sus recíprocos con un símbolo negativo. Por lo tanto, los rangos de *FC* van desde $-\infty$ a $+\infty$. La medida de *RC* viene dada por $RC = DV / |DV_{max}|$ donde *DV* es el volumen diferencial de un *spot* dado entre pares de razas: $DV_{AV-RE} = V_{RE} - V_{AV}$, $DV_{AV-RG} = V_{RG} - V_{AV}$, $DV_{RE-RG} = V_{RG} - V_{RE}$ y donde DV_{max} es el valor máximo observado de *DV* (en valor absoluto) a través de todas las comparaciones por parejas. El rango de *RC* varía entre $-1,0$ y $+1,0$.

La relación entre las muestras, a partir de los datos estandarizados del volumen de los *spots* (media de 0 y desviación estándar de 1), se evaluó con un análisis de componentes principales y con la generación del *heatmap* usando el *software* XLSTAT (v. 2014.5.03; Addinsoft, Andernach). Se generó un dendrograma de UPGMA para agrupar las proteínas con diferencias significativas ($P < 0,05$) en abundancia entre las razas, a partir de la matriz de valores de *RC* en valor absoluto usando

el *software* XLSTAT. Los estadísticos descriptivos se calcularon usando el *software* IMB SPSS Statistics (v.24; SPSS, Chicago)

5.1.7 Medidas de las distancias proteómicas

Las distancias proteómicas cualitativas entre pares de razas se estimaron usando los índices de distancia de Nei & Li y de Jaccard (Nei & Li, 1979; Jaccard, 1908). El índice de disimilaridad de Nei & Li viene dado por $D = 1 - F$; donde $F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, n_{xy} es el número total de *spots* compartidos entre las razas bovinas x e y , y donde n_x y n_y son el número de total de *spots* en las razas x e y , respectivamente. El índice de disimilaridad de Jaccard se calcula como $D = 1 - J$, donde $J = n_{xy} / (n_{xy} + a + b)$, y donde a y b son *spots* únicos únicamente representados en las razas x e y , respectivamente. Los cambios cuantitativos en la abundancia de proteínas entre cada par de razas se evaluaron usando la medida *QD* de distancia proteómica (Rodríguez-Vázquez & Zapata, 2019), dada por:

$$QD = \left(\sum_{i=1}^N |RC_i| / N \right) p$$

donde RC_i son los valores de RC a través de los N *spots* con diferencia estadísticamente significativa en abundancia entre cada par de razas y donde p es la proporción de *spots* con cambios significativos. Por lo tanto, el rango *QD* oscila entre 0 a 1,0. Se utilizó *bootstrap* no paramétrico para construir los *CI*s al 95% para las medidas de distancias proteómicas cualitativas y cuantitativas, mediante el método de percentil corregido por el sesgo y ajustado con el método de Bonferroni, a partir de las 20.000 réplicas *bootstrap*.

5.1.8 Análisis bioinformático

La categorización funcional de las proteínas con diferencia en la abundancia entre razas en las tres ontologías diferentes procesos biológicos, componente celular y función molecular de los productos

génicos) se realizó a partir de altos niveles de términos *slim* de la Ontología Génica (GO) usando la herramienta *Slimmer* del *software* AmiGO (Carbon *et al.*, 2009). La herramienta basada en la web QuickGO (Binns *et al.*, 2009) se usó para obtener información de grano fino sobre cada cambio significativo de proteínas entre las razas. El análisis de enriquecimiento de términos GO y la sobrerrepresentación de los términos GO frente al resto del genoma de *B. taurus* en las bases de datos de KEGG e Interpro se realizó con el *software* FatiGO/Babelomics (Alonso *et al.*, 2015). Se comprobó una sobrerrepresentación significativa de los términos GO por medio del test exacto de Fisher (dos colas) y se estableció un valor de corte global para pruebas múltiples mediante el procedimiento de la tasa de falso descubrimiento (FDR).

La búsqueda de redes conocidas y predictivas de interacciones directas proteína-proteína entre las proteínas diferencialmente abundantes entre razas y patrones de interacción en el proteoma de *B. taurus* se llevó a cabo usando las bases de datos de interacción proteína-proteína STRING v11,0 (Szklarczyk *et al.*, 2019).



5.2 RESULTADOS

5.2.1 Comparación de perfiles de 2-DE entre las razas bovinas

Los perfiles bidimensionales representativos para las muestras proteicas de carne de LT de cada raza bovina española (AV, RE y RG) se muestran en la Fig. 14. La identificación, el emparejamiento de *spots* entre los geles y la medición del volumen de los *spots* a través de las seis réplicas biológicas para cada raza se llevó a cabo usando el *software* PDQuest. Un total de 140 *spots* proteicos individuales se emparejaron a través de las réplicas de los geles de las tres razas. En el Anexo I se muestran los volúmenes medios (\pm SE, *standard error*, error estándar) con sus *CI*s *bootstrap* (95%) para los *spots* de proteínas que cambian significativamente entre los pares de razas. Estos *spots* fueron numerados y marcados en los geles 2-DE (Fig. 14).

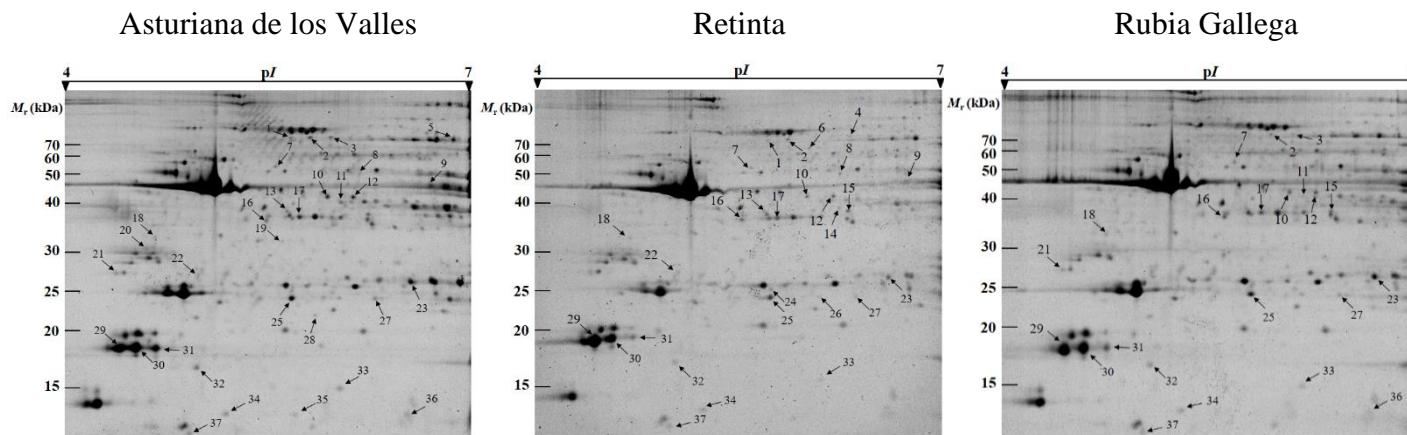


Figura 14. Imágenes representativas de los geles 2-DE teñidos con SYPRO Ruby obtenidos a partir de las muestras de carne de LT de las diferentes razas bovinas españolas (AV, RE y RG). Los spots de proteínas diferencialmente ($P < 0,05$) representados entre las muestras de carne son marcados y numerados. Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a).

En general, 26,4% (37 de un total de 140) de los *spots* mostraron diferencias significativas en abundancia entre uno o más pares de razas. Se generó un diagrama de Venn de estos 37 *spots* proteicos con representación diferencial para mostrar el número de *spots* que son compartidos y no compartidos por las tres razas bovinas (Fig. 15). Un total de 17 (45,9%) y 1-5 (2,7-13,5%) *spots* coincidieron entre las tres razas y entre pares de razas, respectivamente. Cinco *spots* no compartidos o únicos se detectaron entre AV (*spots* 5, 19, 20, 28 y 35) y RE (*spots* 4, 6, 14, 24 y 26), mientras que los *spots* únicos no se identificaron en la raza RG.

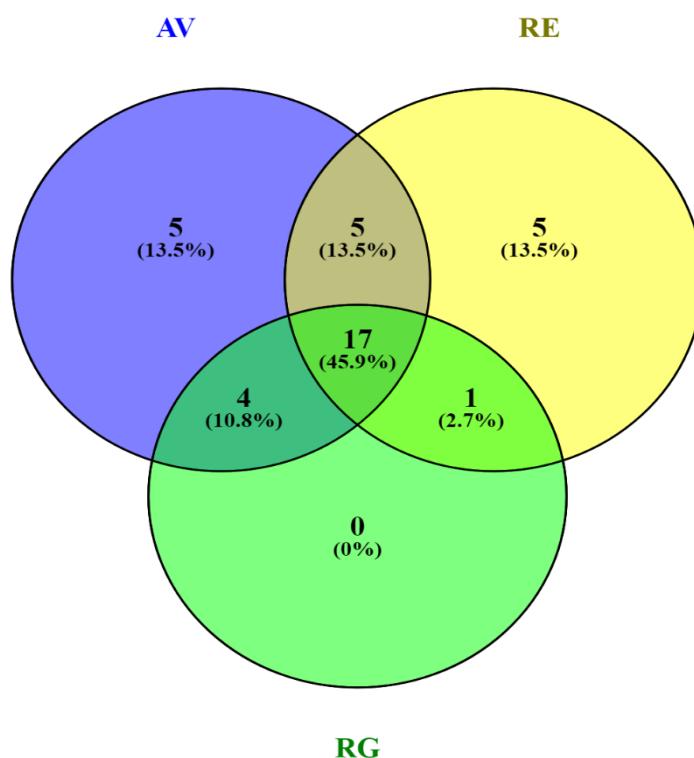


Figura 15. Diagrama de Venn mostrando el número (porcentaje) de *spots* de proteína compartidos y no compartidos, diferencialmente abundantes entre las muestras de carne de LT de las razas bovinas Asturiana de los Valles (AV), Retinta (RE) y Rubia Gallega (RG). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a).

El método de ordenación de los análisis de componentes principales (PCA) y la agrupación con mapas de calor se usaron para obtener información resumida sobre las relaciones entre los 37 *spots* proteicos con diferencias significativas ($P < 0,05$) en abundancia entre las razas. El *plot* bidimensional del PCA muestra que los dos primeros componentes principales representan más del 63% de la variación total de los datos (Fig. 16). El primer componente principal (41% de la variación total) claramente diferenció las muestras entre tres *clusters* bien separados que corresponden a las tres razas. La agrupación con el mapa de calor reveló que la abundancia de las proteínas era bastante heterogénea entre los *spots* de las diferentes razas comparadas con *spots* de la misma raza (parte superior del dendrograma, Fig. 17). Además, las muestras de carne se dividieron en las mismas tres agrupaciones reflejadas en el PCA (lado izquierdo del dendrograma, Fig. 17). La agrupación más separada corresponde a las muestras de carne de RE, mientras que los *clusters* de muestras de AV y RG son más próximos entre sí. Estos resultados indican que los perfiles del proteoma usando la 2-DE permitieron una asignación exitosa de cada muestra de carne con cada raza de origen.

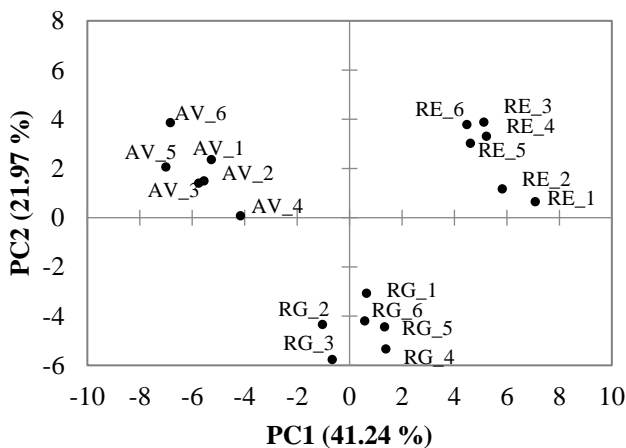


Figura 16. *Plot*-PCA para el primer componente principal de los volúmenes estandarizados de los *spots* de proteínas con diferencias ($P < 0,05$) en abundancia entre las razas bovinas (AV: Asturiana de los Valles; RE: Retinta; RG: Rubia Gallega). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a)

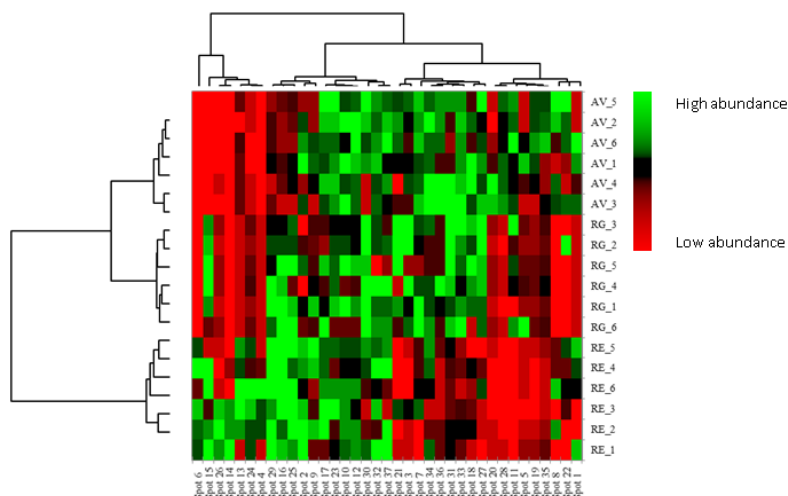


Figura 17. Mapa de calor para el volumen normalizado de *spots* de proteínas con diferencia (P -valor $< 0,05$) en abundancia entre las razas AV, RE y RG. Los colores verdes y rojos representan los valores altos y bajos relativos de las abundancias de las proteínas, respectivamente. Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a)

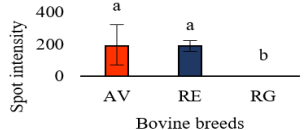
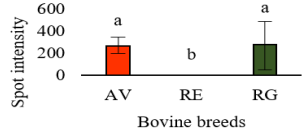
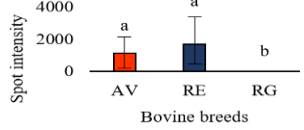
5.2.2 Identificación de las proteínas con cambios diferenciales

En total, 25 de 37 *spots* de proteínas con diferencias en abundancia entre los pares de razas fueron identificados con fiabilidad ($P < 0,05$) por MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS (Tabla 6). La comparación entre la M_r teórica (Th) y observada (Obs) de cada proteína se usó para excluir las proteínas degradadas para análisis posteriores. Se consideró que las proteínas estaban degradadas cuando la relación M_r (Th)/ M_r (Obs) $> 1,5$, como previamente (López-Pedrouso *et al.*, 2018). Un total de 7 proteínas identificadas cumplieron con este criterio: EOGT (*spot* 14); FAM110A (*spot* 32); DUSP11 (*spot* 33); FAM110A-1 (*spot* 34); ATXN10 (*spot* 35); BCAT2 (*spot* 36); y SCKA1 (*spot* 37). Consecuentemente, se seleccionaron un total de 18 *spots* de proteínas y 12 proteínas no redundantes representadas diferencialmente en muestras de carne bovino para análisis posteriores: MYBPH (*spot* 1),

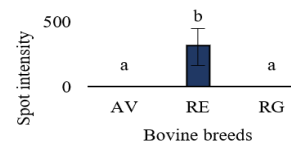
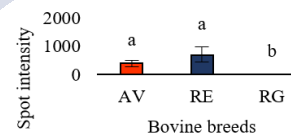
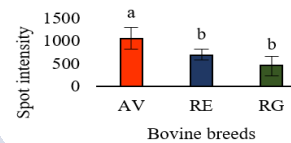
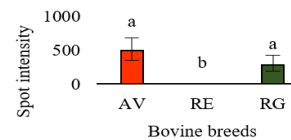
MYBPH-1 (*spot* 3), CKM (*spot* 9), PRDX3 (*spot* 11), PRDX3-1 (*spot* 26), ACTA1 (*spot* 12), ACTA1-1 (*spot* 18), PDHB (*spot* 13), PDHB-1 (*spot* 16), TNNT1 (*spot* 17), ANK2 (*spot* 19), YWHAE (*spot* 21), CCNG1 (*spot* 22), MYL6B (*spot* 25), TMEM233 (*spot* 27), MYLPF (*spot* 29), MYLPF-1 (*spot* 30) y MYLPF-2 (*spot* 31).



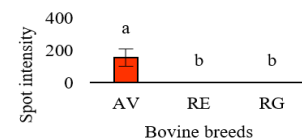
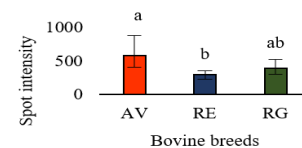
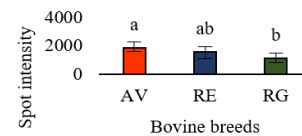
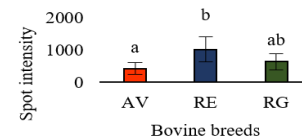
Tabla 6. Representación diferencial ($P < 0,05$) de los spots de proteína 2-DE entre las carnes de vacuno de las tres razas (AV, RE y RG) identificadas por MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS. Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a)

Spot code ^a	Protein ^b	Abbrev.	Accession No. (Uniprot)	Mascot score	Sequence Cov. (%)	No. of matched peptides	pI (Th/ Obs) ^c	M _r (Th/ Obs) (kDa) ^c	Between-breeds volume difference ^d
1	Myosin binding protein H	MYBPH	G3X6W9	147	18	7	5.82/ 5.56	53.6/ 72.5	
3	Myosin binding protein H	MYBPH-1	G3X6W9	181	20	8	5.82/ 6.07	53.6/ 72.5	
9	Creatine kinase type M-	CKM	Q9XSC6	60	11	5	6.63/ 6.60	43.2/ 45.6	

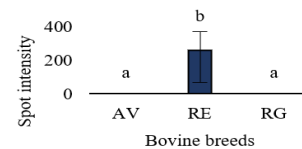
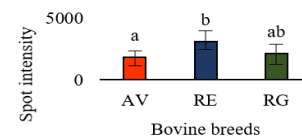
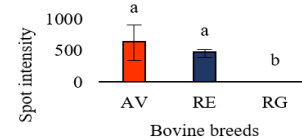
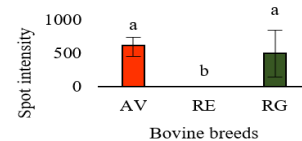
11	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	PRDX3	P35705	103	12	3	7.15/ 6.09	28.4/ 39.0
12	Actin alpha 1 skeletal muscle	ACTA1	P68138	83	12	5	5.23/ 6.11	42.3/ 41.6
13	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB	P11966	67	43	7	5.39/ 5.39	39.4/ 38.5
14	EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase	EOGT	A0JND3	51	11	8	6.87/ 6.11	62.5/ 39.0



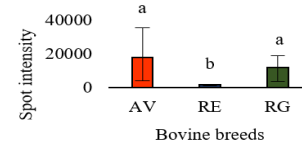
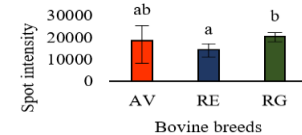
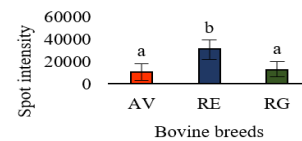
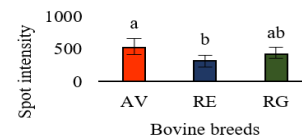
16	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB-1	P11966	67	27	1 0	6.21/ 5.44	39.4/ 38.0
17	Troponin T, slow skeletal muscle	TNNT1	Q8MKH6	78	7	3	5.71/ 5.53	31.3/ 37.0
18	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1-1	P68138	87	12	5	5.23/ 4.71	42.4/ 33.0
19	Ankyrin-2	ANK2	G3NOC1	64	9	2 7	8.15/ 5.51	25.8/ 31.5



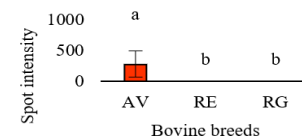
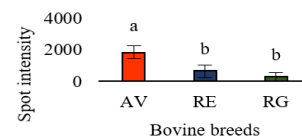
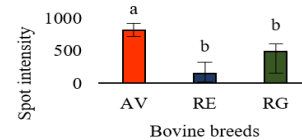
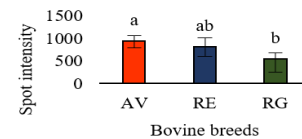
21	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	P62261	63	10	3	4.63/ 4.25	29.3/ 27.5
22	Cyclin-G1	CCNG1	Q5EPI1	61	13	8	9.21/ 4.95	34.6/ 27.1
25	Myosin, light chain 6B, smooth, alkali, muscle and non-muscle	MYL6B	Q148H2	62	37	9	5.40/ 5.56	23.5/ 24.0
26	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3-1	P35705	80	19	4	7.15/ 5.99	28.4/ 24.0



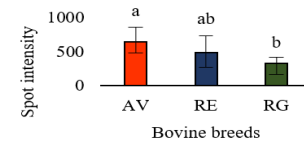
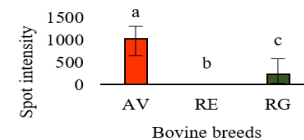
27	Transmembrane protein 233	TMEM223	A5PJW2	61	28	6	11.9/ 6.16	22.1/ 24.0
29	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	MYLPF	Q0P571	150	47	8	4.91/ 4.25	19.1/ 19.1
30	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform.	MYLPF-1	Q0P571	138	35	6	4.91/ 4.56	19.1/ 19.1
31	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	MYLPF-2	Q0P571	140	48	8	4.91/ 4.56	19.1/ 19.1



32	Protein FAM110A	FAM110A	Q58DG5	51	21	9	10.14/ 5.02	31.8/ 16.3
33	RNA/RNP complex-interacting phosphatase	DUSP11	Q5E999	53	35	9	9.32/ 5.94	39.4/ 14.5
34	Protein FAM110A	FAM110A-1	Q58DG5	52	24	9	10.14/ 5.19	31.8/ 12.0
35	Ataxin-10	ATXN10	Q2TBW0	54	14	8	5.08/ 5.61	53.7/ 11.7



36	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	BCAT2	Q5EA40	50	14	6	8.87/ 6.43	45.0/ 12.5
37	Spindle and kinetochore-associated protein 1	SKA1	Q0V7M7	53	46	1 0	6.77/ 4.99	29.6/ 10.2



^a Spot position is shown in Fig. 14.

^b Protein identifications matched to *B. taurus* protein databases.

^c Theoretical (Th) pI and M_r values were obtained from UniProtKB/Swiss-Prot databases. Protein fragments [M_r (Th) / M_r (Obs) > 1.5] are denoted in bold.

^d Mean volumes obtained from six biological replicates of each bovine breed together with their 95% CIs adjusted with the Bonferroni correction. Different lower-case letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) in mean volume between bovine breeds.

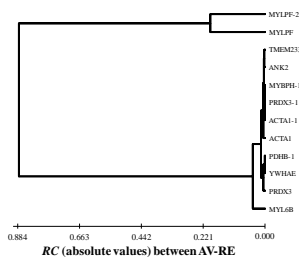
5.2.3 Cuantificación del grado de cambio en la abundancia de proteínas entre las razas

Los cambios de proteínas con diferencias en la abundancia ($P < 0,05$) entre razas se estimó por las medidas de *FC* y *RC* que se muestran en Anexo II. Se puede observar que el *RC* provee una estimación general más eficaz para el grado de cambio en la abundancia de proteína entre razas que la medida usada tradicionalmente del *FC*. La medida de *FC* da valores de $-\infty$ o $+\infty$ para spots proteicos no compartidos o únicos sin considerar las diferencias en volumen entre razas. En contraste, el *RC* es una medida que va desde un rango de $-1,0$ a $+1,0$ y cuantifica la abundancia diferencial existente entre las proteínas compartidas y no compartidas (Franco *et al.*, 2015; López-Pedrouso *et al.*, 2018; Mato *et al.*, 2019). Hay que destacar que en el presente estudio las estimaciones de *RC* (en valor absoluto) a través de las comparaciones por parejas con valores de *FC* de $-\infty$ o $+\infty$ oscilaron entre 0,008 y 0,081 y un promedio (\pm SE) de $0,023 \pm 0,004$ (Anexo III).

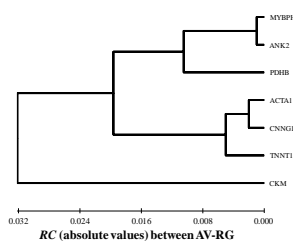
Las estimaciones de *RC* entre razas revelaron varios hechos destacados. En primer lugar, los cambios de abundancia de proteína fueron mayores en las comparaciones por pares que incluían la raza RE. Por lo tanto, la media (\pm SE) de los valores de *RC* entre las razas de AV-RE y RE-RG fue de $0,169 \pm 0,099$ y $0,175 \pm 0,088$, respectivamente, mientras que las razas AV-RG los valores medios decrecieron notablemente hasta $0,026 \pm 0,006$. Estas diferencias en los valores medios de *RC* fueron estadísticamente significativas usando los *CI*s *bootstrap* al 95% a través del método percentil de sesgo corregido. En segundo lugar, MYLPF y MYLPF-2 fueron las proteínas con diferencias en la abundancia más pronunciadas entre las razas AV-RE ($RC = +1,0$) y RE-RG ($RC = +0,495$), respectivamente, mientras que entre las razas AV-RG fue la proteína CKM ($RC = -0,054$). De acuerdo con esto, el análisis de agrupación UPGMA mostró que las proteínas MYLPF/MYLPF-2, MYLPF y CKM formaron subconjuntos separados en los dendrogramas AV/RE, RE/RG y AV/RG, respectivamente,

construidos a partir de la matriz de diferencias por pares entre *RCs* en valor absoluto (Fig. 18).

A)



B)



C)

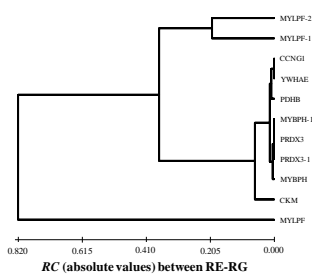
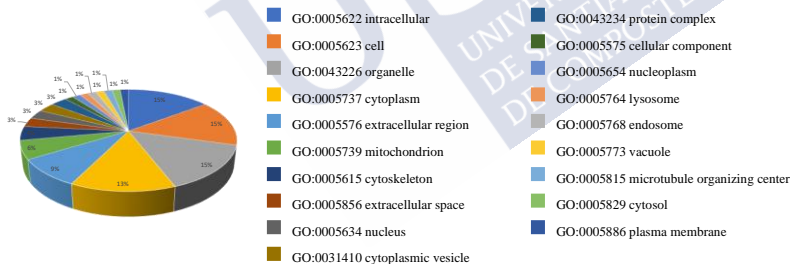


Figura 18. Dendrograma de agrupación del UPGMA basado en las diferencias de matriz por pares en *RC* (valor absoluto) de proteínas con cambio diferencial ($P < 0,05$) entre las razas bovinas AV-RE(A), AV-RG (B) y RE-RG(C). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a).

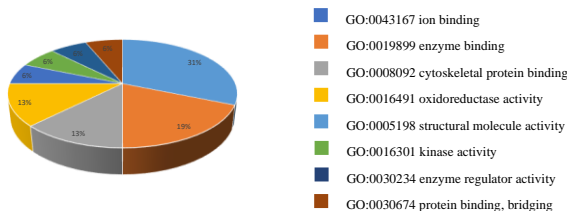
5.2.4 Análisis bioinformático de las proteínas identificadas

El mapa de anotaciones granulares y la información de grano fino para las 12 proteínas diferenciales ($P < 0,05$) en abundancia entre razas de los términos GO extraídos a través de las herramientas AmiGO y QuickGO se muestran en Fig. 19 y en el Anexo III, respectivamente. Las proteínas estaban involucradas en tres categorías de ontología: i) componentes celulares (ej. núcleo, citoesqueleto, espacio extracelular y complejos de miosina y troponina); ii) función molecular (ej. unión de iones a calcio, proceso apoptótico y actividad catalítica); y iii) procesos biológicos (ej. regulación del ciclo celular, organización sarcomérica y desarrollo muscular esquelético y ensamblaje). No se detectó ninguna sobrerrepresentación estadísticamente significativa de los términos GO frente al resto del genoma de *B. taurus* en las bases de datos de KEGG e Interpro tras el análisis de enriquecimiento de términos con el software FatiGO/ Babelomics.

Cellular component



Molecular function



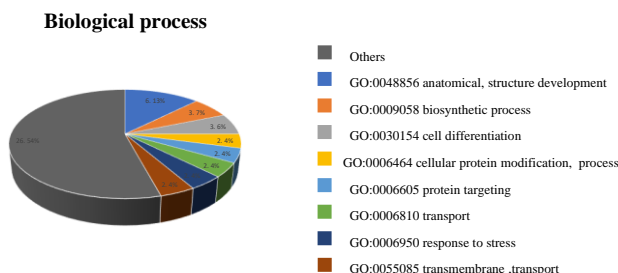


Figura 19: Distribución de las Ontologías Génicas de alto nivel (GO *slim terms*) en tres ontologías diferentes (componente celular, función celular y procesos biológicos) para las 12 proteínas diferentes en abundancia entre las carnes de LT de las razas bovinas Asturiana de los Valles, Retinta and Rubia Gallega por medio del software *Slimmer tool of AmiGO* (<http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/slimmer>). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a).

El mapa de interacción proteína-proteína para las 12 proteínas expresadas diferencialmente en las razas AV, RE y RG según la base de datos de STRING se muestran en la Fig. 20. El mapa resultante de STRING demostró una única red de interacción proteína-proteína que incluye 6 de las 12 proteínas que muestran cambios. Las proteínas de interacción son las proteínas miofibrilares involucradas en la estructura-contracción muscular (MYL6B, MYL6B, MYBPH, ACTA1), en la regulación de la contracción muscular (TNNT1) y en el metabolismo energético (CKM). Vale la pena destacar que MYL6B es el único nodo que interactúa con el resto de las proteínas de la red de interacción.

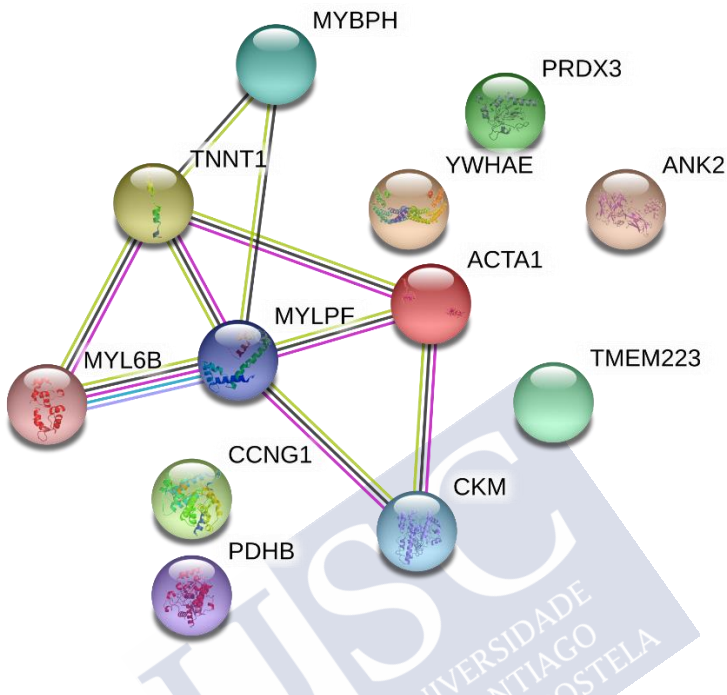


Figura 20. Red de interacción proteína-proteína para proteínas con diferencia en abundancia entre las razas AV, RE y RG, de acuerdo con la visión de confianza de STRING (ajustes específicos: se muestran número de interacciones, cero en el primer y segundo *shell*). Los nodos (círculos) representan las proteínas, y los bordes muestran las asociaciones funcionales conocidas o predictivas (umbral: 0,4, intervalo de confianza medio), y las líneas de colores indican la evidencia de interacción de varios tipos (azul: coincidencia; negro: coexpresión; azul claro: evidencia en la base de datos; verde: evidencia de vecino; violeta: evidencia experimental; rojo: evidencia de fusión; amarillo: evidencia en el significado del texto). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a).

5.2.5 Distancia proteómica entre razas

Las distancias proteómicas cualitativas y cuantitativas entre pares de razas se muestran en la Fig. 21 y en el Anexo IV. Las distancias cualitativas se estimaron por la medida D de Nei & Li mostrando valores más bajos que aquellos estimados con la medida D de Jaccard.

Matemáticamente se puede comprobar que ambas medidas reportan el mismo valor de distancia sólo si todos los *spots* son o bien compartidos ($n_{xy} = 1$; $D = 0$) o no compartidos ($n_{xy} = 0$, $D = 1$); por otro lado ($n_{xy} \neq 1$ y 0), los valores de D de Nei & Li son siempre más bajos que las medidas D de Jaccard. En general, las distancias cualitativas entre las razas AV-RE y RE-RG fueron ligeramente más altas que entre las razas AV-RG, pero no fueron estadísticamente diferentes entre ellas. En contraste, se detectó una diferenciación proteómica estadísticamente significativa entre pares de razas usando la medida QD para la distancia proteómica cuantitativa (Fig. 21 y Anexo IV). Más específicamente, las distancias cuantitativas fueron muy similares entre las razas AV-RE ($QD = 0,0145$) y RE-RG ($QD = 0,0142$) ($P > 0,05$), pero sobre diez veces más grandes que entre las razas AV-RG ($QD = 0,0014$) ($P < 0,05$).



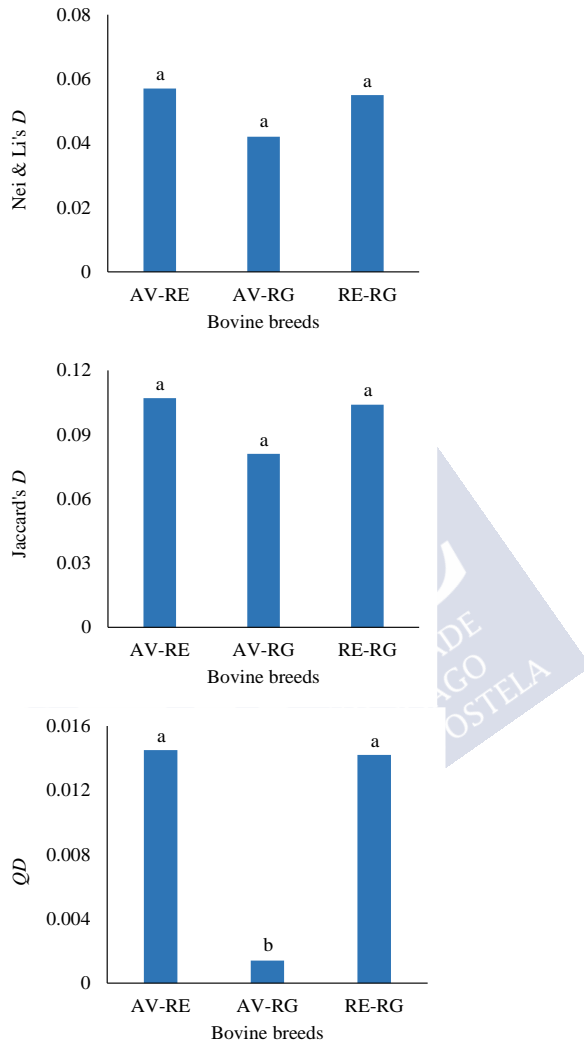


Figura 21. Distancias proteómicas cualitativas (Nei & Li y Jaccard) y cuantitativas (QD) entre razas bovinas (AV, RE y RG) de las carnes del músculo LT. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las distancias proteómicas estimadas se evaluaron por los intervalos de confianza al 95% de *bootstrap* indicándose con letras minúscula diferente (a y b). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a).

5.3 DISCUSIÓN

5.3.1 Estimación de las distancias proteómicas entre las razas bovinas

Las estimaciones de las distancias proteómicas cualitativas y cuantitativas a partir de los perfiles de 2-DE de las muestras de carne del músculo LT proporcionaron información opuesta sobre la diferenciación proteómica general entre las razas bovinas españolas. La distancia proteómica entre razas fue validada estadísticamente sólo a partir de las diferencias cuantitativas en la abundancia de las proteínas. Para este propósito, nosotros usamos la medida QD específicamente diseñada para estimar distancias entre poblaciones a partir de los datos proteómicos cuantitativos. Diferentes líneas de evidencias respaldan el comportamiento satisfactorio del estadístico QD para la medida de distancias cuantitativas entre poblaciones. En primer lugar, nuestras observaciones indican que los perfiles proteómicos generales de las carnes de AV y RG se diferenciaban notablemente ($QD_{AV-RG} = 0,0014$) de la carne de RE ($QD_{AV-RE} = 0,0145$; $QD_{RE-RG} = 0,0142$; $P < 0,05$). Estos resultados son consistentes con los análisis de agrupación del mapa de calor basados en proteínas representadas diferencialmente ($P < 0,05$), mostrando que las razas AV y RG son agrupadas en dos subconjuntos cercanos claramente separados de la raza RE. Asimismo, el árbol jerárquico de unión de vecinos (NJ) para 40 razas bovinas de la península ibérica utilizando las distancias de parentesco calculadas a partir de datos de marcadores microsatélites mostró que AV está más estrechamente relacionada con RG que con RE (Cañón *et al.*, 2011). Este último resultado concuerda con las estimaciones de distancia genética entre las tres razas de ganado española usando el chip de polimorfismos de nucleótido único (*SNP*) de alta densidad (Cañas-Álvarez *et al.*, 2015). Más específicamente, los valores reportados de las distancias genéticas de Nei fueron menores entre las razas AV-RG ($D = 0,0095$) que entre RE-AV y RE-RG ($D = 0,0109 - 0,0137$).

5.3.2 Identificación de proteínas que contribuyen a la distancia proteómica entre las razas y posibles proteínas candidatas a biomarcadores para caracteres de la calidad de la carne

Se obtuvieron un total de 18 *spots* de proteínas de 2-DE con diferencia en la abundancia. Del total de *spots* hay 12 proteínas no redundantes miofibrilares y sarcoplasmáticas, con un número variable de isoformas (cero a tres), las cuales contribuyeron a una explicación de las distancias proteómicas entre las razas españolas. Las proteínas identificadas están involucradas en funciones estructurales-contráctiles (MYBPH, ACTA1, ANK2, TNNT1, MYL6B y MYLPF), del metabolismo (CKM, PRDX3, PDHB y YWHAE), de la regulación del ciclo celular (CCNG1) y del desarrollo del sistema nervioso (TMEM233). Algunas de ellas podrían ser proteínas candidatas relacionadas con las diferencias existentes entre las tres razas para la terneza de la carne. La terneza de la carne del músculo LT de los terneros machos de las tres razas se evaluó previamente usando el test *Warner-Braztler shear force* (WBSF) (López-Pedrouso *et al.*, 2020). Los resultados del test WBSF reveló diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) en terneza entre todos los pares de grupos de muestra. Más específicamente, la carne de vacuno de RE y RG presentaron la menor y la mayor terneza, respectivamente, mientras que AV tomó valores de terneza intermedios.

MYLPF y las proteínas de interacción pueden jugar un papel central en la causa de diferencias en terneza entre las tres razas bovinas españolas. Por esto, las isoformas de MYLPF (MYLPF, MYLPF-1 y MYLPF-2) fueron las proteínas con el cambio relativo más pronunciadas en abundancia de proteínas entre las carnes de RE y AV/RG (los valores absolutos de *RC* oscilaron entre 0,30 a 1,0). En contraste, no se detectó ninguna diferencia en la abundancia de las isoformas MYLPF entre la carne de AV y RG. MYLPF es una fosfoproteína con niveles de fosforilación modulados por la acción concertada de Ca^{2+} / calmodulina dependiente de la miosina muscular esquelética quinasa de cadena ligera y actividades de la proteína

fosfatasa tipo 1 (Stull *et al.*, 2011). Varios estudios realizados en bovino, ovino y porcino han demostrado que los cambios en los niveles de fosforilación de MYLPF están relacionados con fenómenos de impacto en la terneza de la carne. Alguna de sus funciones que afectan a la terneza son la fuerza de contracción muscular esquelética de las fibras de rápido movimiento tipo IIb, el progreso de *rigor mortis*, la respuesta del estrés pre-sacrificio, la disociación de la actomiosina y la degradación de la miosina (Cao *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2016; Franco *et al.*, 2015; Lana & Zolla, 2016; Mato *et al.*, 2019; Muroya *et al.*, 2007). Además, la MYLPF es una proteína singular que interacciona con todas las parejas (MYBPH, ACTA1; MYL6B, TNNT1 y CKM) de la red de interacción proteína-proteína identificadas en nuestro estudio. Los cambios en abundancia/fosforilación de todas estas proteínas que interactúan se han relacionado de forma consistente con variaciones en la terneza de la carne (Franco *et al.*, 2015; Lana & Zolla, 2016; Mato *et al.*, 2019; Picard & Gagaoua, 2020). Diferencias en la abundancia/fosforilación de MYLFP (u otras isoformas de MYL2), MYBPH, TNNT1 y CKM, han sido previamente identificadas entre las muestras de carne del músculo *longissimus* de diferentes razas bovinas (Japanese Black vs. Holstein; Angus vs. Nellore; y Blond d'Aquitaine vs. Charolains y Limousin) (Chaze *et al.*, 2013; De Souza Rodrigues *et al.*, 2017; Ohsaki *et al.*, 2007). En general, este estudio sugiere que las isoformas MYLPF y la red de interacción de proteínas constituyen los principales marcadores candidatos de la variación de la terneza de carne de vacuno en las tres razas bovinas españolas.

Otro subconjunto de proteínas con diferencias en la abundancia entre las tres razas españolas (ANK2, PRDX3, PDHB, YWHAE, CCNG1 y TMEME233) no mostraron interacciones proteína-proteína acorde con las bases de datos de STRING. Muchas de estas proteínas han sido relacionadas con una serie de caracteres de la calidad de la carne, incluyendo la terneza y la capacidad de retención de agua. Así, ANK2 es un miembro de una familia de proteínas estructurales relacionadas con las proteínas de membranas integrales para el citoesqueleto de espectrina-actina subyacente en una red compleja de conexiones intermiofibrilares y miofibril-sarcolema que pueden ser degradadas por calpaínas, lo que conducen a la tenderización de la carne

(Aslan *et al.*, 2010). Los polimorfismos en el ANK1 de los bovinos se han asociado con la terneza y el contenido de grasa intramuscular, mientras que en el cerdo se han asociado con la fuerza de corte, la capacidad de retención de agua, la pérdida por goteo y otros parámetros relacionados con los caracteres de calidad de la carne (Aslan *et al.*, 2010; Wimmers *et al.*, 2007). A este respecto, la proteína ANK2 se identificó únicamente en la carne tierna de la raza AV. La PRDX-3 pertenece a la familia ubicua de peroxidasas basadas en cisteína con una función antioxidante protectora (Perkins *et al.*, 2015). Otra peroxiredoxina, PRDX6, se considera un buen marcador de la terneza de la carne debido a sus propiedades antiapoptóticas (Gagaoua *et al.*, 2019). La proteína precursora de PRDX3 se asoció recientemente con muestras de carne tiernas en el ganado Norwegian Red (Grabež *et al.*, 2015). Interesantemente, nosotros también encontramos que la proteína precursora PRDX3 (*spot* 11) fue únicamente identificada en la carne más tierna de la raza AV y RG. Sin embargo, la forma activa de PRDX3 (PRDX3-1, *spot* 26) sólo se identificó en la carne menos tierna del ganado de RE, la misma relación negativa con la tenderización que la peroxideroxina PRDX6. Por último, YWHAE pertenece a la familia proteica 14-3-3 que se une a proteínas de señalización funcionalmente diversas (Fu *et al.*, 2000). Se propuso que la fosforilación de YWHAE podría estar implicada en la terneza de la carne de vacuno para prevenir la apoptosis e incrementar la fuerza de contracción muscular (De Souza Rodrigues *et al.*, 2017). Sin embargo, YWHAE sólo se identificó en carnes más tiernas de las razas AV y RG, lo cual sugiere que esto podría ser una isoforma no fosforilada de la proteína.

5.3.3 Identificación de biomarcadores candidatos de proteínas para la autenticación de las tres razas de carne de vacuno española

La detección de marcadores de proteína específicos de la raza es útil para la autenticación del origen de la carne, a fin de garantizar la calidad y seguridad de los alimentos (Fontanesi, 2017). Los análisis del

PCA y del mapa de calor revelaron que las carnes individuales de cada una de las tres razas españolas se pueden distinguir inequívocamente a partir de los perfiles del proteoma global obtenidos mediante la 2-DE. Las proteínas únicas con cambios en la abundancia entre las tres razas podrían utilizarse para la autenticación de la carne. En particular, las isoformas MYLPF serían buenos marcadores candidatos para este propósito porque presentan el cambio cuantitativo más pronunciado entre las razas. Investigaciones previas han mostrado que la combinación de diferentes isoformas de la cadena ligera de la miosina permite diferenciar entre la carne de vacuno, cerdo y aves de corral debido a la baja susceptibilidad de estas isoformas a la degradación proteolítica (Montowska & Pospiech, 2012; Sentandreu *et al.*, 2010). En general, la identificación de proteínas candidatas para la autenticación de la carne podría realizarse de forma rutinaria a partir de extractos musculares utilizando métodos analíticos alternativos más rápidos y sencillos, incluyendo técnicas de inmunoensayo. Se necesitan más investigaciones de seguimiento para determinar si estos marcadores de proteína pueden aplicarse para la autenticación y trazabilidad de la carne de vacuno en un rango más amplio de escenarios, incluyendo diferentes razas, músculos y envejecimiento de la carne de vacuno.



CAPÍTULO IV





6 CAPÍTULO IV: APLICACIÓN PROTEÓMICA PARA PREDECIR LA CALIDAD DEL ALIMENTO RELACIONADO CON EL BIENESTAR ANIMAL. REVISIÓN

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

“Proteomic application in predicting food quality relating to animal welfare. A review”

Mouzo, D¹.; Rodríguez-Vázquez, R¹.; Lorenzo, J.M².; Franco, D². Zapata, C¹.; López-Pedrouso, M¹. *Trends in Food Science & Technology* 2020, 99, 520-530. Editorial: Elsevier; ISSN 0924-2244. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.03.029

¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, 15872 Santiago de Compostela, España; ²Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N° 4, Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, España.

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 Metodología de búsqueda bibliográfica

Para el estudio de revisión realizado sobre la aplicación de las herramientas proteómicas en la predicción de la calidad del alimento relacionado con el bienestar animal se utilizaron diversos recursos bibliográficos. Se realizó una búsqueda pormenorizada en publicaciones pertenecientes a revistas internacionales y en páginas web indexadas a motores de búsqueda. Entre aquellas páginas de búsqueda se puede destacar, PubMed, Scopus, *Web of Science* o Google Académico. Esta búsqueda abordó una gran variedad de artículos científicos desde indicadores bioquímicos, marcadores proteómicos a través de 2-DE o métodos de espectrometría de masas para la obtención de biomarcadores de estrés en diferentes animales.

Por otro lado, los datos obtenidos sobre la producción mundial de carne utilizadas en este estudio se obtuvieron de la base de datos, continuamente actualizada de FAOSTAT (*Food and Agriculture Organization Statistical Database*).

El análisis del enriquecimiento funcional de las proteínas para el análisis metaproteómico se realizó a través del software FunRich (Pathan *et al.*, 2015).



6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1 Indicadores bioquímicos del estrés: cortisol, creatina quinasa y lactato

La medición y cuantificación del estrés de los animales es muy compleja debido a su efecto. Durante la cría, los animales sufren estrés principalmente debido a las condiciones de manejo lo que produce una baja calidad de la carne. Sin embargo, los animales reaccionan de manera muy diferente tanto en el comportamiento como en la fisiología ante estas situaciones de estrés. Hasta la fecha, para evaluar el estrés en los organismos vivos se han utilizado indicadores indirectos del estrés, así como sus efectos. Los indicadores más comunes que se emplean son el cortisol, la creatina quinasa y el nivel de lactato en sangre de los animales. Por consiguiente, la vigilancia del estrés en los animales podría llevarse a cabo utilizando estos parámetros, por lo que muchos investigadores han estado estudiando las metodologías más adecuadas para evaluarlas.

6.2.1.1 *Cortisol*

El cortisol es una hormona esteroide producida por la corteza suprarrenal que es liberada como respuesta al estrés y a un bajo nivel de glucocorticoides en la sangre. El cortisol es un parámetro bioquímico que puede medirse tanto en el músculo como en la sangre y de forma no invasiva a través de la saliva, la orina o las heces. Los niveles de cortisol aumentan claramente en el organismo como resultado de una situación de estrés; por lo tanto, se utiliza como indicador de estrés (Rutherford *et al.*, 2019). Por ejemplo, el nivel de cortisol fue mayor durante el manejo industrial debido al estrés fisiológico en cerdos (Brown *et al.*, 1998). Se ha relacionado la mala calidad de la carne con la salida de cortisol durante el estrés pre-sacrificio para conejos y ovejas (Trocino *et al.*, 2018; Zimmerman *et al.*, 2013). En los últimos años, cada

vez hay más literatura que demuestra que los niveles de cortisol se han correlacionado inequívocamente con la calidad de la carne (Trocino *et al.*, 2018, Reiche *et al.*, 2019).

6.2.1.2 *Creatina quinasa*

La creatina quinasa (*CK*, *Creatine Kinase*) es una enzima responsable de la generación del ATP necesario durante la contracción muscular. En general, la presencia de la creatina quinasa en la sangre es considerada un marcador indirecto de la fatiga y de los daños del músculo. Sin embargo, el estrés animal no siempre produce daño muscular, no obteniendo efecto en el nivel de *CK* (Hunter *et al.*, 1998). Por ejemplo, se ha demostrado que los toros transportados en malas condiciones aumentan el nivel de cortisol, a diferencia del nivel de la *CK* que no se ve afectado (Rutherford *et al.*, 2019). En el caso de las aves de corral, el estrés pre-sacrificio resultante del encadenamiento afectó al nivel de la *CK* y podría estar asociado a un menor calidad de la carne (Fidan *et al.*, 2015). En la carne de vacuno también se encontró una asociación entre la *CK* y la calidad de la carne, ya que los niveles de *CK* eran inversamente proporcionales al glucógeno, el pH y las pruebas sensoriales (Loudon *et al.*, 2019). Todas estas evidencias sugieren que la *CK* podría utilizarse como un biomarcador objetivo de la calidad de la carne.

6.2.1.3 *Lactato*

La concentración de lactato en sangre suele aumentar durante una situación de estrés debido a que las hexosas musculares como la glucosa o glucógeno se convierten en lactato. La conversión en lactato ocurre en condiciones anaeróbicas ya que la cantidad de oxígeno no es suficiente y su liberación al flujo sanguíneo provoca una disminución del pH. Uno de los principales inconvenientes de este parámetro es que la concentración de pH provoca un pico durante un período corto de tiempo después de una situación de estrés (Rocha *et al.*, 2014). Por otra parte, hay una diferente predisposición al estrés previo al sacrificio y,

en consecuencia, los niveles de lactato y otros indicadores pueden variar entre los individuos (Chauhan *et al.*, 2019).

Los indicadores bioquímicos tienen el inconveniente de mostrar los valores de estrés en un período de tiempo reducido, esto hace que los parámetros alterados suelen volver a los niveles normales y resultan imposibles de medirlos en el producto final. Por el contrario, el rápido desarrollo de las técnicas proteómicas se está empezando a aplicar en la industria, ya que el conocimiento del contenido de proteínas es útil para comprender las propiedades nutricionales y tecnológicas de los alimentos. Además, la proteómica aplicada a los productos alimenticios permite obtener los biomarcadores de cada tejido que reflejan los daños ambientales y de procesamiento, lo que representa una poderosa herramienta para el control de los alimentos.

6.2.2 Enfoque proteómico para controlar la calidad de la carne y la leche en respuesta al estrés

En la producción ganadera hay un creciente interés en el control del estrés para evitar pérdidas económicas y mejorar el bienestar de los animales. Actualmente, la industria de la carne investiga la cría de animales y las condiciones de sacrificio con el objetivo de aumentar la calidad de la carne de vacuno (color, contenido de grasa intramuscular o *marbling* y la WHC). Está demostrado que las malas condiciones de producción animal pueden afectar simultáneamente al bienestar animal y a la calidad de la carne de vacuno. El estrés puede ser el resultado de muchos factores intrínsecos (fisiología, edad, sexo y genotipo) y extrínsecos (temperatura, actividades de manipulación, presencia humana, tiempo de estabulación y privación de alimento/agua). Entre ellos, los aspectos psicológicos y sociales (miedo, mezcla con animales no familiares, estrés térmico o el aislamiento) son más difíciles de controlar por la industria (Grandin, 1997; Kadim *et al.*, 2004; Terlouw *et al.*, 2008). Más allá de estos factores comunes, el grado de estrés es muy variable según el tipo, la intensidad y el período. Por todas estas razones, el estrés tiene un carácter muy complejo y es difícil de

controlar desde el punto de vista industrial. Sin embargo, el estudio del proteoma podría tener una gran relevancia para la búsqueda de biomarcadores asociados al estrés como han demostrado varios estudios (Tabla 7).

6.2.2.1 *Carne de vacuno, estrés y proteómica*

El estrés de moderado a alto, en el ganado, puede conducir a una carne defectuosa, la carne *DFD* (oscuras, firmes y secas). Los principales problemas de esta carne son las alteraciones de la ternura debida a una mayor capacidad de retención de agua (*WHC*), un color oscuro poco atractivo y una menor estabilidad microbiana (Newton & Gill, 1981). Además, la calidad sensorial de las carnes *DFD* es inferior a la normal. El pH final debido al estrés (medido en 24-48 h) es a menudo superior a 6,0 provocando una escasa desnaturalización de las proteínas y el agua ligada permanece estrechamente conectada. Además, el color más oscuro se debe a un mayor contenido de agua intracelular, que refleja menos luz. La mioglobina no se desnaturaliza a un pH elevado, lo que facilita un metabolismo aeróbico en la superficie y el hierro permanece en estado ferroso (Miller, 2007). En general, el músculo bovino sufre cambios notables en respuesta al estrés previo al sacrificio, lo que conduce a las carnes *DFD*. El estudio proteómico del estrés a través del análisis de este tipo de carne permite la obtención de biomarcadores proteicos (Tabla 7). Según Franco *et al.* (2015), los cambios en el proteoma entre las carnes normales y las carnes *DFD* mostraron diferencias significativas en proteínas estructurales-contráctiles como las isoformas de la cadena ligera de la miosina y la troponina C tipo 2 y en enzimas metabólicas. Estos autores sugieren que estos cambios proteómicos asociados al estrés pre-sacrificio, no sólo pueden provocar cambios cuantitativos en la abundancia sino también en las modificaciones postraduccionales como la fosforilación. Además, estas proteínas podrían ser posibles biomarcadores de estrés pre-sacrificio en la raza Rubia Gallega. Mahmood *et al.* (2018) también encontró diferencias en las proteínas estructurales de la fracción insoluble analizando la carne con pH superior a 5,9 frente a las carnes normales. Estos autores sugirieron que un aumento del pH, así como

una reducción del potencial glucídico en el músculo, podría deberse al aumento de la regulación oxidativa de las proteínas miofibrilares durante la demanda fisiológica, produciendo cambios en las isoformas de miosina. Por otra parte, las proteínas solubles como la isoforma alfa-1 de la actina, la glucogenina-1 y la isoforma beta-2 de la proteína fosfatasa eran diferencialmente más abundantes en las carnes más oscuras con un pH superior a 5,9. Un estudio subproteómico sarcoplasmático utilizando la técnica de isoelectroenfoque en líquido (OFFGEL) y la espectrometría de masas, también detectó cinco bandas de proteínas significativamente diferentes entre las carnes normales y las carnes con DFD (Fuente-García *et al.*, 2019). Estas bandas se identificaron como actina, fosfoglucomutasa-1, alfa cristalina B, proteína de choque térmico beta-6 y proteína de choque térmico beta-1. Además, se detectaron cambios sustanciales en los fosfoproteomas, lo que dio lugar a una mayor abundancia de fosfoproteínas en carnes de vacuno DFD que en la carne normal relacionada con las proteínas estructura-contráctiles, el metabolismo, la cadena de transporte de electrones, la polimerización de la actina y la respuesta al estrés (Mato *et al.*, 2019).

Tabla 7. Efecto del estrés en la calidad de los productos del ganado y en la búsqueda de biomarcadores de proteínas usando diferentes tecnologías proteómicas. Fuente: Mouzo *et al.* (2020).

Stress sources	Effects of stress	Proteomic sample	Proteomic technologies	Effects on proteome	Protein biomarkers	Reference
Heat stress	Alteration of synthesis and secretion of milk (milk protein and fat)	Bovine mammary epithelial cells	iTRAQ LC-MS/MS Elisa Western Blotting	Effects associated with cell-substrate junction assembly, catabolic processes and metabolic processes	-	Li et al., 2017
Heat stress (long term)	Inflammatory response (tumor necrosis factor α interleukin-6)	Blood plasma	2-DE MALDI-TOF/TOF Western Blotting	Alteration of plasma proteins	Keratin, type II cytoskeletal 3-like Protein HP-25 homolog 1 and 2 Hepatitis A virus cellular receptor 1 Transthyretin precursor	Min et al., 2016
Heat stress	Deterioration of function liver during early lactation contributing to fatty liver disease	Liver biopsy	LC-MS/MS Western Blotting	Changes in oxidative phosphorylation, mitochondrial dysfunction, farnesoid X receptor/retinoid X receptor (FXR/RXR) activation, and the methylmalonyl pathway.	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1 Peroxidoxin-3	Skibiél et al., 2018
Heat stress	The stress increased the concentration of malondialdehyde and cortisol in blood plasma	Subcutaneous adipose tissue	Nano-UPLC-ESI Western Blotting	Differential abundance of 107 proteins in adipose of pregnant cows, affecting Nrf2-mediated response, and FXR/RXR and LXR/RXR activation	Dual-specificity mitogen-activity protein kinase kinase 1 GST Mu 1 Stress-induced-phosphoprotein 1	Zachut et al., 2017
Different management systems	Hardest conditions in the mountains induce a higher oxidative stress in the animal	Serum samples	Immunoblotting DIGE MALDI-TOF/TOF	Increased carbonyl content in plasma proteins and higher GPx and SOD activity	FGG protein Complement C3B Complement component C9 precursor Complement C1s subcomplement Serum albumin Paraoxonase Conglutinin Lactate dehydrogenase B Protein AMBP precursor Alpha-2-HS glycoprotein precursor Immunoglobulin J chain Selenium dependent glutathione peroxidase	Marco-Ramell et al., 2012

Stress sources	Effects of stress	Proteomic sample	Proteomic technologies	Effects on proteome	Protein biomarkers	Reference
Transportation, weaning and commingling	Increased incidence of bacterial and viral pneumonia detected in epithelial lining fluid of the lungs	Epithelial lining fluid of the lungs	2-DE LC-MS/MS Immunoblotting	Different abundance in eleven proteins which could be used as biomarkers for stress-associated disease susceptibility	Annexin A1 and A5 Odorant-binding protein Isocitrate dehydrogenase Fibrinogen Heme-binding protein α -2-HS-glycoprotein α -1-antichymotrypsin Albumin	Mitchel et al., 2008
Unknown	DFD meats	<i>Longissimus thoracis</i>	2-DE LC-MS/MS MALDI-TOF/TOF	Alteration of structural-contractile proteins and metabolism enzymes	Myosin light chain isoforms Skeletal myosin light chain 2 isoforms Troponin C type 2 Cofilin-2 Triosephosphate isomerase Beta-galactoside α -2,6-sialyltransferase	Franco et al., 2015 *
Unknown	DFD meats	Bovine loin samples	SDS-PAGE LC-MS/MS	Sarcoplasmic sub-proteome was strongly affected	Actin Phosphoglucomutase-1 Alpha-crystallin B Heat shock protein beta-6 Heat shock protein beta-1	Fuente-García et al., 2019*
Unknown	Dark cutting in meat	<i>Longissimus thoracis</i>	2-DE LC-MS/MS MALDI-TOF/TOF	Changes of upregulation of oxidative myofibril proteins affecting the myosin isoforms	Actin, alpha skeletal muscle Glycogenin 1 Isoform Beta-2 of Protein phosphatase Myomesin-1 Adenylate kinase isoenzyme 1 Peroxiredoxin-1 Desmin Spermine synthase Myosin regulatory light chain 2 Creatine kinase M-type Tropomyosin alpha-1 chain 14-3-3 protein gamma Alpha-crystallin B chain Heat shock 27 kDa protein 1	Mahmood et al., 2018*
Unknown	DFD meats	<i>Longissimus thoracis</i>	2-DE LC-MS/MS MALDI-TOF/TOF	Overall phosphorylation rates changed between DFD and normal meat	Troponin-T F-actin-cappin Small heat proteins	Mato et al., 2019*

6.2.2.2 *Leche de vacuno, estrés y proteómica*

El estrés también puede tener un efecto negativo en la leche en lo que respecta al rendimiento y la composición (Pragna *et al.*, 2017, West, 2003). En general, el estrés por calor es uno de los principales factores que afecta tanto a la calidad como a la cantidad de leche, causando enfermedades o reduciendo el crecimiento de los pequeños rumiantes (Berihulay *et al.*, 2019). Dentro del ganado lechero, el estrés es indudablemente una de las principales preocupaciones alrededor del mundo. Factores como la temperatura y la humedad relativa pueden dar lugar a una reducción de la producción de leche y a una menor calidad en relación con el contenido de grasa, proteínas, caseína y lactosa (Bernabucci *et al.*, 2014). El estrés térmico da lugar a una reducción de la producción de lípidos de triacilglicerol de ácidos grasos de cadena corta y media, mientras que los ácidos grasos de cadena larga aumentan. Esto conlleva cambios significativos en las propiedades físicas y el valor nutritivo de la leche (Liu *et al.*, 2017). Además, las vacas que sufren condiciones extremas de temperatura y humedad producen leche con menos lactosa y proteínas (García *et al.*, 2015). En la fracción de proteínas, las caseínas son las más importantes en la leche, representando alrededor del 78% de la proteína total. Un enfoque proteómico reveló que las proteínas expresadas diferencialmente por efecto del estrés térmico se asocian con los procesos de ensamblaje de la unión célula-sustrato y los procesos catabólicos y metabólicos, y en particular, con la síntesis y secreción de la leche, incluidas la proteína y la grasa de la leche. Se observó, que en condiciones de estrés térmico, se redujo el contenido de β -caseína junto con los ácidos grasos (Li *et al.*, 2017). Otro tejido relevante, que se ve muy afectado por este estrés, es el tejido adiposo subcutáneo, por lo que es interesante para la búsqueda de biomarcadores de proteínas. A este respecto, la respuesta al estrés oxidativo mediado por Nrf2 resultó ser la vía más afectada por el estrés térmico estacional en las vacas lecheras (Zachut *et al.*, 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, las vacas lecheras son más susceptibles a las enfermedades en condiciones de estrés por calor. De hecho, la mastitis bacteriana es una de las enfermedades más

importantes en las vacas lecheras. Las infecciones intramamarias dan lugar a un alto valor de células somáticas (leucocitos y células epiteliales) en la leche con respecto a la leche normal. Por esta razón, el recuento de células somáticas se evalúa para la detección de vacas infectadas con patógenos significativos. Se ha demostrado de que el recuento de células somáticas en la leche era más elevado en los animales sometidos a estrés térmico (estrés por frío y calor) debido a la depresión de la función inmunológica causada por el estrés oxidativo (Hammami *et al.*, 2013). Desde el punto de vista proteómico, el factor de necrosis tumoral en plasma - α y la interleucina-6, dos proteínas proinflamatorias, aumentaron en el plasma de la sangre de las vacas debido a las condiciones de calor a largo plazo (Min *et al.*, 2016). El estrés térmico también tiene consecuencias negativas en el rendimiento reproductivo, ya que disminuye las tasas de concepción durante las estaciones de verano, lo que afecta indirectamente a la producción de leche (Polsky & von Keyserlingk, 2017). Además, las vacas durante la lactancia temprana pueden sufrir una enfermedad del hígado graso provocada por el estrés térmico debido a un deterioro de la función del hígado. En un estudio proteómico del tejido hepático, las vías que difieren entre el grupo estresado por el frío y el calor se identificaron como la fosforilación oxidativa, la disfunción mitocondrial, la activación de los receptores X/receptores X farnesoides (FXR/RXR) y la vía del metilmalonilo (Skibieli *et al.*, 2018). Por lo tanto, los requisitos de las vacas lecheras lactantes deben considerarse para aumentar la producción y la calidad de la leche.

6.2.2.3 Otras fuentes y estrés en bovinos

Se han realizado pocos estudios proteómicos sobre otros tipos de fuentes de estrés en los animales bovinos. Sin embargo, los análisis proteómicos en vacas sometidas a diferentes sistemas de producción revelaron una respuesta de adaptación a ambientes adversos a través de cambios en el sistema redox (Marco-Ramell *et al.*, 2012). El estrés del transporte, el destete y la mezcla con individuos desconocidos se estudió para prevenir/detectar la neumonía bacteriana y viral en el

ganado y se identificaron nueve proteínas como biomarcadores proteicos mediante 2-DE y LC-MS/MS (Mitchell *et al.*, 2008).

6.2.2.4 *Enriquecimiento funcional para proteínas del tejido muscular*

El ganado en condiciones de estrés mostró diferencias significativas en el proteoma (Tabla 7), por lo que se identificó una amplia gama de biomarcadores de proteínas. Para analizarlos fue necesario un enfoque integrador, por lo que se realizó un enriquecimiento funcional del análisis (Fig. 22). Para ello, los 29 biomarcadores identificados en el músculo bovino se emplearon en el análisis de enriquecimiento de genes dentro de la categoría de proceso biológico. Los términos individuales de ontología génica (GO) se ordenaron por el *P*-valor (rojo), el porcentaje de genes (verde) y la referencia (*P* = 0,05, azul), y se representan conjuntamente. El término GO más relevante fue el “deslizamiento de los filamentos musculares” (*P* < 0,001) que incluye las isoformas de actina, isoformas de cadenas ligeras de miosina y troponina C. Este término está claramente relacionado con la contracción muscular debido al deslizamiento de filamentos de actina y filamentos gruesos de miosina. El segundo término GO afectado significativamente fue la “contracción muscular” que comprende proteínas como las isoformas de actina, cadena alfa cristalina B, miomesina, isoformas de cadena ligera de la miosina, isoformas de cadena ligera de la miosina esquelética y troponina C. El término GO, “regulación de la contracción muscular”, también está relacionado con las proteínas estructurales y la estructura de las miofibrillas. Consistentemente, las proteínas estructurales del sarcómero, como las mencionadas anteriormente, están involucradas en la tenderización de la carne de vacuno durante la maduración. Se ha mostrado que en las carnes DFD, un mayor pH causa una mayor repulsión electrostática entre las proteínas miofibrilares y una menor contracción lateral (Pearce *et al.*, 2015). Obviamente, estos aspectos tienen un impacto considerable en la ternura de la carne, la capacidad de retención de agua y el color que compone la calidad de la carne.

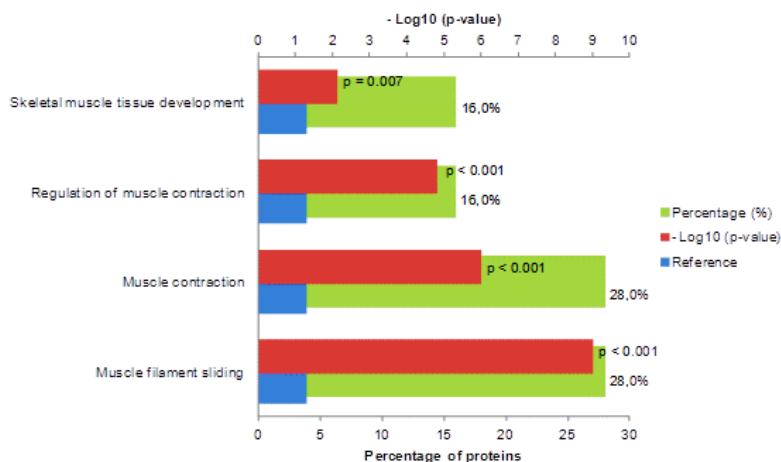


Figura 22. Análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas usando *FunRich Enrichment* de los procesos biológicos de las proteínas usando únicamente estudios del tejido muscular (Tabla 7). Fuente: Mouzo *et al.* (2020).

6.2.3 Enfoque proteómico para monitorizar la calidad del cerdo en respuesta al estrés

La producción mundial de carne de cerdo superó los 967 millones de cabezas siendo los principales productores China (440 millones), EE.UU. (73 millones), Brasil (41 millones) y España (29 millones) (FAOSTAT, 2019). Debido a su importancia estratégica, los investigadores de todo el mundo están haciendo un enorme esfuerzo para mejorar la calidad de la carne de cerdo. Muchas veces, la decisión de compra se asocia con el color de la carne o con pérdidas de agua en el envase. Además, la opinión del consumidor también se basa en la ternura, la grasa intramuscular, las pérdidas de cocción y la calidad sensorial. Para satisfacer a estos consumidores un punto clave es la detección de carne de cerdo defectuosa para evitar problemas tecnológicos durante el procesamiento. Evidentemente, la relación entre el estrés y la calidad de la carne ha sido ampliamente estudiada debido a su importancia económica (Dokmanović *et al.*, 2014; Gajana

et al., 2013; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2011). Los parámetros de la calidad del cerdo como el pH, el color, la WHC, la grasa intramuscular y el contenido de la proteína son afectadas fuertemente en cerdos estresados (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005; Sionek & Przybylski, 2016). A este respecto, se ha demostrado que el estrés en el cerdo se asocia con una carne pálida, blanda y exudada, (*pale, soft, exudative*, PSE), el defecto de calidad de la carne más común en los cerdos. Este importante defecto en la carne de cerdo causa importantes pérdidas económicas en la industria de la carne.

La carne PSE se define en relación con el pH en un momento dado después del sacrificio, así como con las alteraciones del color y problemas de textura (Zhang *et al.*, 2017). El músculo del cerdo tiene una gran concentración de fibras de tipo IIa y IIb con una importante actividad glucolítica y un mayor nivel de lactato, lo que provoca un rápido descenso del pH cuando la temperatura de la canal del cerdo está todavía caliente. Estos eventos causan una pérdida de agua por goteo y un color más claro. Por lo tanto, los cerdos con una mayor cantidad de fibras de tipo II son más susceptibles al estrés que los cerdos normales (Ryu & Kim, 2005). Esta reducción del pH causa cambios en la carga neta de proteínas que conducen a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares como la miosina y la actina. De esta manera, el agua fijada entre las miofibrillas puede ser expulsada debido a esta severa acidificación que resulta en una pérdida anormal de agua, por lo que el WHC se altera. Además, el color de la carne depende en gran medida de diferentes índices de refracción entre el sarcoplasma y las miofibrillas que varían con el pH.

6.2.3.1 *Gen halotano*

El PSE se asocia principalmente con la expresión del alelo recesivo halotano. El gen *Hal*, también llamado gen del síndrome de estrés porcino, produce una importante hipertermia causada por el estrés. Existen varios estudios sobre el estrés en genotipos halotanos bajo diferentes condiciones de transporte antes del sacrificio (Chai *et al.*, 2010), sistemas de cría (Foury *et al.*, 2011) o condiciones de comportamiento (D'Eath *et al.*, 2010). Tanto los portadores

heterocigotos (*Nn*) como los homocigotos (*nn*) de *Hal* se han relacionado con la sensibilidad al estrés (Rosenvold & Andersen, 2003). Ciertamente, se ha demostrado de que los animales *nn* mostraron una menor luminosidad de la carne y contenido en amarillo junto a una menor WHC (Salmi *et al.*, 2010). Esto se debe a que los cerdos recesivos *Hal* en condiciones de estrés previo a su sacrificio es probable que produzcan carne de cerdo PSE. A nivel celular, el canal de Ca^{2+} se altera en estos animales provocando una gran liberación de Ca^{2+} en condiciones de estrés. Estos factores conducen a una reducción del pH muscular y, consecuentemente, a la desnaturalización de las proteínas, lo que determina una reducción del WHC (Scheffler & Gerrard, 2007). En cuanto al músculo esquelético, el tipo de fibra muscular es significativamente diferente. Los cerdos portadores del gen halotano (*Nn*) mostraron más cantidad de IIB MyHC y menos de tipo I MyHC y los homocigotos obtuvieron una cantidad importante de IIX MyHC (Depreux *et al.*, 2002). En este momento, la proteómica es una herramienta poderosa para esta monitorización de las proteínas musculares que puede proporcionar una visión de los procesos moleculares producidos por el estrés en el músculo esquelético. Se están realizando considerables estudios relacionados con la alteración del proteoma y el estrés en la carne de cerdo para identificar biomarcadores que podrían utilizarse para evitar pérdidas económicas en la industria porcina.

Aparte de las consideraciones éticas de los granjeros y minoristas, el bienestar animal puede dar lugar a una importante pérdida económica y es una preocupación creciente de los consumidores. A pesar de estos hechos, no se han establecido actualmente criterios sólidos y objetivos para evaluar el estrés de los animales durante la cría y el sacrificio. A este respecto, un enfoque proteómico puede favorecer nuevos biomarcadores potenciales de estrés que son necesarios para la industria de la carne. En la Tabla 8 se muestra una lista representativa de trabajos que sugieren un conjunto de biomarcadores de proteínas de estrés bajo diferentes condiciones. Las mutaciones genéticas en cerdos como los mutante *HAL* (*nn*) con una alta incidencia de estrés agudo fueron estudiadas por Di Luca *et al.* (2013). La carne de estos cerdos presentaba un alto WHC medido como pérdida por goteo, lo que es

indicativo de carne de cerdo de baja calidad (PSE). Una posible explicación podría ser que estas muestras se asociaron con una menor abundancia de proteínas de estrés en comparación con el fenotipo intermedio.

Además, se informó de que la mutación HAL produce un aumento del nivel de fosforilación en las proteínas de señalización del calcio, la contracción muscular, el glucógeno, la glucosa y el metabolismo energético, y el estrés celular. Además, la proteína dependiente de Ca^{+2} /calmodulina quinasa II mostró un alto nivel de fosforilación en la mutación HAL (Huang *et al.*, 2018).



Tabla 8. Efecto del estrés en la calidad del cerco y búsqueda de biomarcadores proteómicos usando diferentes tecnologías proteómicas. Fuente: Mouzo *et al.* (2020).

Stress sources	Effects on pork quality	Proteomic sample	Proteomic technologies	Effects on proteome	Protein biomarkers	References
Halothane free	Alteration of water holding capacity	<i>Longissimus thoracis et lumborum</i> muscle	2D DIGE MALDI-TOF MS LC MS/MS Western blotting	Alteration of sixteen proteins associated with metabolic enzymes, stress response proteins and structural proteins Increased abundance of triosephosphate isomerase and transferrin	B-Tropomyosin Phosphoglucomutase 1 Stress-induced phosphoprotein 1 Poly(rC)-binding protein 1 Annexin A7 Creatin kinase M-type Titin Phosphoglycerate kinase 1 Transferrin Heat shock protein Tropomyosin alpha 1 chain Filaggrin 2 Triose phosphate isomerase Heat shock cognate 71	Di Luca <i>et al.</i> , 2013
Halothane free	The stress impact was not described	<i>Longissimus dorsi</i> muscle	iTRAQ TiO ₂ enrichment / Deglycosylation LC MS/MS	High phosphorylation in proteins related to calcium signalling, muscle contraction, glycogen, glucose and energy metabolism, and cellular stress	Phosphorylation of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase (II)	Huang <i>et al.</i> , 2018

Stress sources	Effects on pork quality	Proteomic sample	Proteomic technologies	Effects on proteome	Protein biomarkers	References
Heat stress	The stress impact was not described	<i>Semitendinosus</i> muscle	2D DIGE Quadrupole TOF MS Western blotting	Increased abundance of proteins involved in glycolysis, glycogenesis and glycogenolysis Decreased abundance of tubulins and soluble actin Increased phosphorylated cofilin 2	Manganese superoxide dismutase Peroxiredoxin 2 Tubulin Soluble actin Phosphorylated cofilin 2	*Cruzen et al., 2015
Heat stress	Intestinal integrity and barrier function in <i>ileum</i>	<i>Ileum</i> sample	2D DIGE MALDI-TOF MS mRNA analysis	Changes in the abundance of 281 spots Increased abundance of heat shock proteins Decreased abundance of metabolic proteins Changes in the abundance of 20 spots Decreased abundance of enzymes of peroxiredoxin-1 and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Heat shock protein 27, 70, 90- α and β Peroxidoxin-1 Peptidyl-propyl cis-trans isomerase A	Pearce et al., 2015
Reduced nutrient intake						

Stress sources	Effects on pork quality	Proteomic sample	Proteomic technologies	Effects on proteome	Protein biomarkers	References
Pre-slaughter fasting and chasing stress	Color and cooking loss in <i>Longissimus dorsi</i> muscle	<i>Longissimus dorsi</i> muscle	Immunoblotting 2-DE MALDI-TOF MS Q-TOF	Changes in the abundance of heat shock protein, myosin heavy chain, aldehyde dehydrogenase, glycerol-3 phosphate dehydrogenase, hemoglobin alpha chain, proteins related to complex with actin and Ca ²⁺ release channel,	Troponin-T Heat shock protein 27kD Myosin heavy chain Aldehyde dehydrogenase Glycerol-3 phosphate dehydrogenase Hemoglobin alpha chain Mitochondrial sodium/calcium exchanger protein	Hwang et al., 2004
Individual housing	Physical injury to tissues in serum samples	Serum samples	2D DIGE MALDI-TOF MS iTRAQ	Changes in the abundance of proteins haptoglobin, apolipoprotein A-I and α 1-antichymotrypsin 3, and the antioxidant enzyme peroxiredoxin 2 Changes in the abundance of lactotransferrin, protegrin 3 and galectin 1 belonging to innate immune system	Haptoglobin Apolipoprotein A-I α 1-antichymotrypsin 3 Peroxiredoxin 2 Lactotransferrin Protegrin 3 Galectin 1 Glutathione peroxidase 3	Marco-Ramell et al., 2016

Stress sources	Effects on pork quality	Proteomic sample	Proteomic technologies	Effects on proteome	Protein biomarkers	References
Transport before slaughter	The stress impact was not described	<i>Longissimus lumborum</i> muscle	2-DE MALDI-TOF MS	Changes in the abundance of oxidative stress enzymes such as peroxiredoxin 2 and glutathione peroxidase 3 Increased abundance of mitochondrial ATPase Shift of myosin light chain 2 (MLC2)	Myosin light chains ATPase F1 chain B	Morzel et al., 2004

6.2.3.2 *Calor térmico*

En la industria porcina, el estrés por calor es uno de los factores estresantes más importantes. Se ha demostrado que el estrés térmico produce una respuesta metabólica y fisiológica debido a que en el músculo del cerdo la energía metabólica es menos eficiente y hay un esfuerzo por reducir el daño de la oxidación en respuesta al calor (Cruzen *et al.*, 2015). El tracto gastrointestinal del cerdo presenta una mayor sensibilidad al estrés por calor, lo que produce problemas de alimentación. Las proteínas que intervienen en las vías glucolíticas y en el ciclo de Krebs del íleon podrían estar relacionadas con el estrés térmico y se ha observado un aumento de la concentración de sustancias reactivas de oxígeno (Pearce *et al.*, 2011). En ambas vías, las condiciones de calor durante la estabulación de los animales disminuyen la abundancia de isoformas de peroxiredoxina en el proteoma, que se ha descrito que proporcionan defensa contra el daño oxidativo y que participan en la señalización mediante el control de la concentración de H₂O₂ (Rhee *et al.*, 2001).

6.2.3.3 *Manejo pre-sacrificio*

Por otro lado, el ayuno previo a la matanza y el estrés en la persecución también causan una carne de mala calidad en términos de color y palatabilidad debido al alto valor de las pérdidas por cocción. Hwang *et al.* (2004) mostró cambios significativos en quince proteínas (contráctiles y enzimas) entre los cerdos de raza Korean, con luminosidad alta y baja, sugiriendo que estas proteínas podrían usarse como biomarcadores de color en condiciones de estrés pre-sacrificio. Otros factores que dan lugar a este estrés, aparte de los genéticos y nutricionales, están relacionados con la cría de cerdos. Por ejemplo, en las condiciones de alojamiento de los cerdos, se ha demostrado que los ambientes con espacio extra, turba y paja producen carnes más tiernas que el de otros cerdos en peores condiciones (Beattie *et al.*, 2000). Además, se ha mostrado que el confinamiento de las cerdas jóvenes produjo cambios significativos en el proteoma sérico, aumentando el

catabolismo de lípidos y proteínas y el estrés oxidativo, confirmado por la abundancia de peroxiredoxina-2 (Marco-Ramell *et al.*, 2016). Los procedimientos de manejo antes del sacrificio deberían controlarse más estrictamente, en particular las condiciones de transporte, porque se han detectado cambios del proteoma entre los cerdos trasladados el día antes del sacrificio o inmediatamente antes de éste, y se han propuesto las cadenas ligeras de miosina y la cadena B de la ATPasa F1 como biomarcadores candidatos (Morzel *et al.*, 2004).

6.2.3.4 *Enriquecimiento funcional de proteínas estresadas en cerdo*

Un enriquecimiento funcional se llevó a cabo con las proteínas expresadas diferencialmente bajo diferentes condiciones de estrés (Fig. 23). En la Tabla 8, las 43 proteínas mostradas como biomarcadores se analizaron mediante un enriquecimiento de genes en la categoría de proceso biológico. Los términos individuales GO fueron clasificados por el *P*-valor (rojo) y se representaron juntos con el porcentaje de genes que se vinculan con el término GO (verde) y la referencia (*P* = 0,05, azul). El término GO más significativo también fue el “deslizamiento de los filamentos musculares” (*P* < 0,001) que está relacionado con la contracción muscular producida por el deslizamiento de los filamentos finos de actina y los filamentos gruesos de miosina. En este proceso biológico, las proteínas incluidas son las troponina-T, la B-tropomiosina, la cadena ligera de miosina, titina, la cadena alfa 1 de la tropomiosina y la actina soluble, que están implicadas en la contracción de las fibras musculares. Estas evidencias explican que las condiciones de estrés de los animales están influyendo claramente en la terneza de la carne, uno de los parámetros de calidad de la carne más importantes y al mismo tiempo uno de los más difíciles de homogenizar. El segundo término GO con un alto nivel de significación es la “respuesta a la proteína desdoblada”, que está compuesta principalmente por proteínas de choque térmico (*HSP*). Las *HSP* son chaperonas moleculares cuya función principal es ayudar al montaje y desmontaje de las proteínas, su plegado y despliegue o replegado de las proteínas dañadas. Esto

significa que estas proteínas desempeñen un papel importante en la protección de las células y estructuras celulares contra el estrés. De hecho, la concentración de las *HSP90* estaba fuertemente correlacionada con las WHC (pérdidas por cocción y goteo) así como la luminosidad de la carne en el músculo del cerdo *longissimus dorsi* (Zhang *et al.*, 2014).

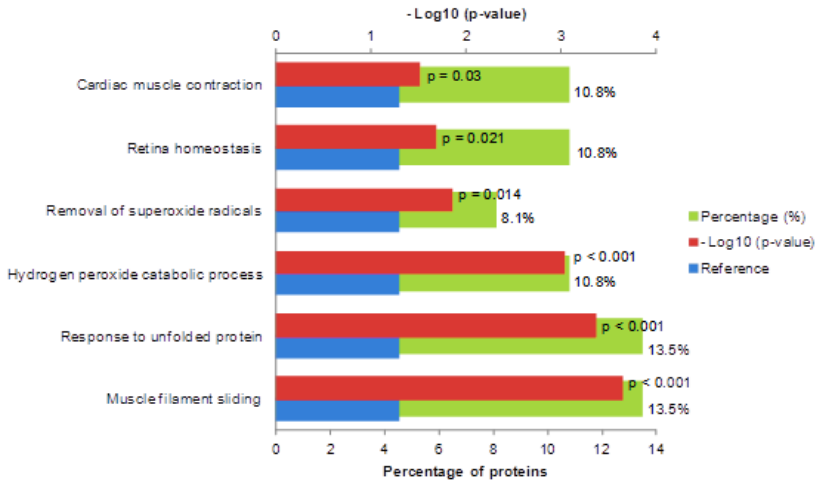


Figura 23. Análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas usando FunRich Enrichment de los procesos biológicos de los biomarcadores de estrés de proteínas. Fuente: Mouzo *et al.* (2020).

Por último, el tercer término GO con un alto grado de significación es el “proceso catabólico de peróxido de hidrógeno”. Las isoformas de peroxiredoxina, la superóxido dismutasa de manganeso y la glutatión peroxidasa se incluyen en esta categoría de la Tabla 8. Se propuso la peroxiredoxina como posible biomarcador proteico de la sensibilidad de la carne en el músculo *longissimus thoracis* (Jia *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2016). La superóxido dismutasa de manganeso y el glutatión peroxidasa son antioxidantes endógenos que ocurren en el músculo del cerdo, que tiene una influencia en la calidad del cerdo (Hu *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2015). En general, las proteínas de estrés de estos tres términos GO: deslizamiento del filamento muscular, la respuesta al proceso catabólico de la proteína desplegada y el peróxido de hidrógeno están claramente asociados con los parámetros de calidad de la carne de

cerdo. Las tecnologías proteómicas pueden constituir un valioso instrumento para controlar la calidad de la carne de cerdo a nivel industrial.

6.2.4 Enfoque proteómico para monitorizar la calidad del pollo en respuesta al estrés

La carne de ave y los huevos se consumen especialmente por encima de otros tipos de alimentos procedentes de animales, representando una importante fuente de proteína de alta calidad. En consecuencia, también se observa una tendencia creciente en el consumo de pollos, más notable en los países en desarrollo. En todo el mundo, hay una demanda creciente debido al bajo coste, la buena calidad nutricional y la sostenibilidad del proceso. Así pues, la industria avícola está creciendo rápidamente, y los programas de cría se centran en características como el rápido crecimiento de la pechuga y las patas (muslo y contramuslo). En los últimos años, la creciente demanda de carnes más procesadas junto con la preferencia por la pechuga ha llevado a seleccionar aves con un alto desarrollo de este músculo. Sin embargo, esta selección ha aumentado la incidencia de anomalías en la carne, como la carne PSE (Petracci *et al.*, 2015). La carne PSE es un grave problema en la carne de pechuga que reduce la percepción del consumidor debido a la presencia de humedad y un color más claro. Con este tipo de carnes, el valor normal del pH está por encima de 7 en el músculo de un animal vivo, disminuyendo a 5,8-5,9 a las 6 h *post-mortem*. El alto potencial glucolítico del músculo alterará la acidificación de la carne alcanzando valores de pH más bajos que la carne normal que muestra un color pálido y una baja WHC (Petracci *et al.*, 2015). De hecho, las enzimas del factor Ca^{2+} pueden desencadenar los síntomas del PSE deteriorando la calidad de la pechuga (Freitas *et al.*, 2017). Un estudio actual en el área de la proteómica demostró que las proteínas implicadas en varios procesos biológicos (glucolítico, contracción muscular, proteolítico, regeneración de ATP, metabolismo

energético e hidratación de CO₂) eran más abundantes en carnes PSE (Desai *et al.*, 2016).

6.2.4.1 Estrés térmico

Las aves de crecimiento rápido y de mayor peso son más susceptibles al estrés por calor debido a la reducción de la capacidad de termorregulación. Se ha demostrado que la selección para el crecimiento rápido ha reducido su capacidad para contrarrestar los efectos térmicos agudos con importantes implicaciones en la funcionalidad de las proteínas y, por consiguiente, en la calidad de la carne (Zaboli *et al.*, 2018, Sandercock *et al.*, 2006). A este respecto, el estrés térmico se considera el factor estresante ambiental más importante en la industria avícola. Según Xing *et al.* (2017), el estrés por calor produce un cambio en las proteínas implicadas en la vía de la glucólisis, la señalización del calcio y las chaperonas moleculares del músculo pectoral mayor. Como se ha explicado anteriormente, estas proteínas indicaban un aumento de la glucólisis en el *post-mortem* temprano, lo que provoca un rápido descenso del pH. De estos datos también se puede inferir una entrada anormal de Ca⁺² en las mitocondrias, lo que aumenta el potencial de conversión de energía. Además, las chaperonas como los *HSP* que participan en el ensamblaje de las proteínas, en la translocación de los pliegues y en la interacción con las proteínas dañadas se vieron afectadas por el estrés térmico en el músculo de la pechuga.

Algunas evidencias sugieren que el estrés por calor afecta particularmente a la respuesta inmune modulada por el sistema nervioso central y los ejes medulares hipotálamica-pituitaria-adrenal y simpático-adrenal (Lara & Rostagno, 2013). De hecho, órganos como el timo, el bazo y el hígado mostraron una reducción de peso significativa en las aves en condiciones de calor (Bartlett & Smith, 2003). Como se muestra en la Tabla 9, los tejidos hipotálamicos, bazo e hígado se estudiaron desde un enfoque proteómico. El hipotálamo como centro de regulación de la retención o disipación del calor fue dañado por el estrés térmico agudo debido al estrés oxidativo, el debilitamiento de las estructuras proteicas, la degradación de las

proteínas mal plegadas o la remodelación de los citoesqueletos (Tu *et al.*, 2018). Además, las citoquinas proinflamatorias de suero e interferones de tipo I, el peso del bazo y el espleonocito estaban indicando que una inmunidad innata y las vías de muerte celular pueden estar asociadas con el estrés térmico (Ma *et al.*, 2019). Para investigar la respuesta temporal al estrés térmico, (Tang *et al.*, 2015) emplearon el análisis cuantitativo sin etiquetas (SWATH) en el hígado de los pollos de engorde, lo que dio lugar a la inhibición de las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares. Esto afectó al metabolismo de los lípidos y aminoácidos e indujo una respuesta inmunitaria hepática asociada con el estrés térmico.



Tabla 9. Efectos del estrés en las aves de corral así como así como en el proteoma utilizando diferentes tecnologías proteómicas. Fuente: Mouzo *et al.* (2020).

Stress sources	A description of stress effects	Proteomic sample	Proteomic technologies	Effects on proteome	References
Acute heat stress	Productive performance	Hypothalamus	2D DIGE MALDI-TOF/TOF Western blotting	Most of the differentially expressed proteins were involved in cellular processes, metabolism, transport, and cellular component organization.	Tu et al., 2018
Heat stress	Induces immune dysfunction and cell death	Spleen sample	iTRAQ	Nine down regulated proteins related to innate immunity and six down or up regulated proteins related to cell death	Ma et al., 2019
Heat stress during transport	PSE meat	<i>Pectoralis major</i> muscle	iTRAQ	Glycolysis pathway, calcium signalling, and molecular chaperones exhibited significant differences	Xing et al., 2017
Heat stress	Production efficiency and meat yield	Liver	SWATH-MS	It was inhibited ERK signalling pathway, affected broiler liver lipid and amino acid metabolism and induced liver cell immune responses	Tang et al., 2015

Stress sources	A description of stress effects	Proteomic sample	Proteomic technologies	Effects on proteome	References
Restrain and transport	The stress impact was not described	Thigh muscle	2-DE MALDI-TOF	Cytoskeleton structure and carbohydrate metabolism networks were affected	Hazard et al., 2011
Fasting (24 h)	Delayed the growth of broiler chicken and poorer performance	Intestinal samples	2-DE MALDI-TOF	Differentially expressed proteins were involved in fatty acid binding and transport, general stress response and ion- or vesicle transport.	Simon et al., 2019
Time in transit before slaughtering	Ascites, pulmonary hypertension, dehydration and PSE meat	<i>Pectoralis superficialis</i> muscle	2-DE LC-MS/MS Western blotting	Metabolism, cell division and control of apoptosis were altered	Zanetti et al., 2013
High concentrations of atmospheric ammonia	Problems with broiler health	Liver	iTRAQ	30 differentially expressed proteins were involved in nutrient metabolism (energy, lipid, and amino acid), immune response, transcriptional and translational regulation, stress response, and detoxification	Zhang et al., 2015

6.2.4.2 Manejo pre-sacrificio

Otras condiciones previas al sacrificio que también afectan a la calidad de la carne de ave, son el transporte y el período de ayuno (Ali *et al.*, 2008). Estas etapas previas al sacrificio afectan a las reservas de glucógeno muscular cambiando las reacciones bioquímicas *post-mortem* en el proceso de transformación del músculo en carne y en el aumento de la incidencia de la PSE (Shimokomaki *et al.*, 2017). La respuesta a la restricción y el transporte en el músculo del muslo se evaluó utilizando un enfoque global (proteómica, transcriptómica y metabolómica) y dio lugar a la activación del eje hipotálamico-pituitaria-suprarrenal. Las proteínas alteradas estaban relacionadas principalmente con la estructura del citoesqueleto o el metabolismo de los carbohidratos (Hazard *et al.*, 2011). La edad y el tiempo de tránsito mostraron cambios proteómicos en funciones como el metabolismo, la división celular y el control de la apoptosis en el músculo pectoral. Sin embargo, el efecto de la edad demostró ser más relevante que el tiempo de tránsito (Zanetti *et al.*, 2013). El ayuno también provoca una reducción de la absorción intestinal y consecuentemente, del rendimiento en el último momento de la vida. En este sentido, la alteración en el intestino delgado desde el punto de vista proteómico, que da lugar a la expresión de proteínas estructurales, y proteínas asociadas al transporte de lípidos, la respuesta al estrés y la defensa intestinal como las más afectadas (Simon *et al.*, 2019).



DISCUSIÓN GENERAL





7 DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han establecido dos grandes bloques. Uno relativo al análisis de parámetros relacionados con la calidad de la carne y el otro a nivel proteómico. En el primer bloque se evaluó como los factores extrínsecos e intrínsecos del ganado vacuno podían afectar a la calidad de la carne a nivel fisicoquímico, sensorial o nutricional. Por otra parte, el estudio proteómico se subdividió en dos capítulos, uno basado en un estudio experimental, en el cual se aplicó un modelo estadístico para la diferenciación entre razas que permitirá obtener posibles biomarcadores para programas de mejora molecular y trazabilidad. Además, en este capítulo se evaluó que aspectos moleculares son los que mayormente influyen en las variaciones de la calidad de la carne de diferentes razas. La otra parte de este bloque se basó en una revisión bibliográfica de las aplicaciones proteómicas para predecir la calidad del alimento relacionado con el bienestar animal.

El Capítulo I de esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de la raza RG en términos de la calidad de carne bajo diferentes sistemas de producción (extensivo, semiextensivo, tradicional e intensivo) y el tipo de alimentación de acabado. Para evaluar estos factores se obtuvieron datos de los parámetros fisicoquímicos, nutricionales y sensoriales. En general se observó como el tipo de acabado y el sistema de producción influían en estos parámetros. En concreto, en los caracteres fisicoquímicos se comprobó como los grupos con alimentación basada en pasto presentaban tonalidades más oscuras de carne y un menor índice de grasa intramuscular. Además, el sistema semiextensivo presentaba valores bajos para la pérdida de cocinado y la fuerza de corte. En cuanto al valor nutricional la alimentación con pasto y suplementada con pienso comercial es la que presentó una menor cantidad de SFAs, pudiendo estar inhibida por la gran cantidad de PUFAs que tenía esta carne. Asimismo, en este grupo se observó como

la relación PUFA/SFA era la que presentaba los valores óptimos en términos de salud. Por el contrario, los animales con alimentación de acabado de pienso comercial suplementado con paja presentaban valores inversos. En general se demostró como los sistemas de producción extensivo y semiextensivo eran los que tenían las relaciones más saludables para la relación $n-3/n-6$.

Por otra parte, además del sistema de producción y la alimentación de acabado, también se analizó si la condición de manejo pre-sacrificio, el tiempo de maduración y la raza podrían influenciar sobre la calidad de la carne. Para ello, en el Capítulo II, se evaluaron estos factores en los parámetros sensoriales y fisicoquímicos en tres de las razas bovinas más importantes a nivel español (AV, RE y RG). En este estudio se demostró como la percepción final del consumidor es compleja debido a que las diferentes variables estaban interrelacionadas. Respecto a la comparación del sistema extensivo/intensivo y el efecto mezcla/no mezcla, se vio como estos factores estaban muy interrelacionados entre si. Por lo que es necesario un estudio por separado de cada uno para poder así observar su efecto en los parámetros fisicoquímicos de la calidad de la carne. Sin embargo, en los parámetros de pH, *drip loss* u oxidación proteica observados se comprobó como el efecto raza era el único factor que afectaba. La raza también obtuvo un efecto importante en los atributos sensoriales, en concreto sobre la fibrosidad, jugosidad y terneza, mientras que el sistema de producción fue el segundo parámetro más importante, influyendo en el olor, sabor y perfil textural (fibrosidad). Igualmente, la maduración también modificó el perfil de textura, que podría ser útil en el caso de la carne fibrosa como la RE, ya que presentan carnes menos tiernas y una mayor maduración supondría una mayor terneza. En cuanto al perfil de olor y sabor, la raza que más difería frente al resto era la RE. Estos parámetros sensoriales permitieron una separación según el tipo de raza a través de los componentes principales y análisis discriminante. En esta separación se comprobó como la raza RE era la que presentaba mayor sabor, olor y una mayor fibrosidad. Por su parte la raza RG presentaba carnes más untuosas y arenosas, y la AV mostraba algunas carnes más tiernas y jugosas. Estos datos se corroboraron con el análisis de CDA, los cuales presentaban el mismo patrón de separación.

Al realizar un análisis conjunto entre ambos capítulos, podemos observar que entre los parámetros de calidad de carne evaluados la mayoría mostraban interrelaciones entre la raza y los sistemas de producción y manejo. Esto dificulta entender a qué se debe la variación de cada parámetro por separado. Sin embargo, tanto el pH, *drip loss* y los carbonilos (7 días), mostraron que el factor raza era el único que influía en estos parámetros. Paralelamente, dos de ellos (pH y *drip loss*) se estudiaron dentro de la raza RG, observando que ambos se encontraban influenciados por la alimentación de acabado, siendo el pH también por el sistema de producción. Todo esto nos lleva a pensar que el efecto de raza es uno de los más influyentes a la hora de evaluar la calidad de la carne. Sin embargo, las condiciones de manejo y el sistema de producción muestran una importante influencia dentro de cada raza analizada. Por otro lado, a través de la comparación de ambos estudios a nivel sensorial, se pudo concluir que los parámetros de olor general, ternera o jugosidad presentan una importante variabilidad dependiendo de los sistemas de producción. Estos resultados muestran una utilidad potencial para mejorar la calidad y seguridad de la carne según las demandas de mercado.

Las diferencias entre las razas de vacuno que se observaron a nivel de percepción por parte de los catadores en el Capítulo II, establecieron que la raza AV-RG son más cercanas y la RE más lejana. Este patrón se correspondió con lo observado en el Capítulo III en el cual se llevó a cabo una evaluación a través de las distancias proteómicas, tanto cualitativas como cuantitativas, siendo estas últimas las únicas con diferencias estadísticas. Para ello se realizó una estimación cuantitativa, a través del estadístico *QD*, mostrando así diferencias proteómicas cuantitativas entre las tres razas bovinas (AV, RE y RG). Los resultados obtenidos mostraron como la raza RE era la más distante genéticamente de las tres razas, en concordancia con los datos sensoriales y de textura del capítulo anterior y con estudios previos. Asimismo, gracias a las técnicas proteómicas (2-DE y MS), estadísticos y técnicas bioinformáticas aquí aplicadas, se observaron 18 proteínas/isoformas miofibrilares y sarcoplasmáticas diferentes que contribuyen a las distancias proteómicas entre razas. Una de las proteínas con mayor contraste entre las carnes de RE y AV/RG fue la MYLPF, la cual tiene

un gran impacto en la terneza de la carne. Además de la MYLPPF (junto con las cinco proteínas que interacciona), las proteínas ANK2, la proteína precursora PRDX3 y la proteína YWHAE (posiblemente no fosforilada), se encontraron en las razas AV y RG cuyas carnes son más tiernas. Igualmente, en el Capítulo II se observó como uno de los atributos que mejor diferenciaba entre las razas de bovino española era la terneza, en la que se mostró una agrupación entre la AV/RG y el distanciamiento de la RE. Este patrón es lo que se plasmó en el estudio proteómico, pudiendo hipotetizar la gran importancia de las proteínas mencionadas anteriormente en las variaciones de terneza entra las razas bovinas españolas. Este análisis no sólo permite una diferenciación clara entre las razas, sino también propone biomarcadores candidatos para la autenticación del origen y la garantía de la seguridad alimentaria de la carne. Asimismo, podrían ser posibles candidatos *pQTL* para mejorar la calidad de carne a través de mejoras por entrecruzamiento.

Asimismo, las herramientas proteómicas serían muy interesantes para la evaluación de la calidad de la carne de vacuno, o de otros alimentos, relacionados con el bienestar animal. La importancia de estudiar el bienestar animal se debe a qué durante el manejo, hay muchas situaciones estresantes las cuales pueden tener un impacto en los procesos bioquímicos, afectando a la transformación del músculo en la carne. En el Capítulo IV se realizó una revisión acerca de los indicadores de estrés más usados: el cortisol, la creatina quinasa y el lactado en sangre animal. Sin embargo, todos estos indicadores bioquímicos muestran la desventaja de que únicamente expresan sus valores en un corto periodo de tiempo. Todo esto implica que vuelven rápidamente a sus niveles normales, convirtiéndose en indicadores difíciles de medir. De ahí, a la importancia de monitorizar a través de otros indicadores (ej. a través de técnicas proteómicas) los niveles de la calidad del alimento en respuesta al estrés.

En esta revisión, se recogieron diferentes listas de biomarcadores obtenidos a través de diferentes tecnologías proteómicas por las cuales se pueden evaluar diferentes efectos en el proteoma asociados al estrés. Como bien se ha demostrado en la revisión, el estrés provoca efectos negativos en las reses del vacuno causando carnes DFD o bien

problemas en la síntesis y secreción de la leche, cambios en la respuesta inflamatoria, deterioro del hígado o cambios en las proteínas del plasma (aumento de malondialdehído o del contenido en carbonilo) debido al aumento del estrés oxidativo. Por otro lado, los cambios en el bienestar animal como en el caso de los cerdos provocan aumentos de carne tipo PSE. Este puede ser debido a muchos factores como los genéticos (gen halotano); a estrés térmico que a su vez provoca cambios en el metabolismo, fisiología o el tracto gastrointestinal; o al estrés causado por un mal manejo pre-sacrificio, que no sólo afectará al musculo sino también al proteoma sérico. Por último, en las aves de corral los cambios en el bienestar animal afectan tanto a la carne como los huevos, principales alimentos de estos animales. El estrés por calor es uno de los factores más importantes provocando carnes PSE o afectando a las proteínas de los tejidos hipotalámicos, bazo e hígado. Además, el mal manejo pre-sacrificio también influyó a nivel proteico (proteínas estructurales, metabólicas, apoptóticas etc.) en las aves de corral.

Tanto en la carne de vacuno como en la carne de cerdo se realizaron estudios metaproteómicos con biomarcadores de proteínas. Para ello se realizó un acercamiento integrativo con un enriquecimiento funcional. El termino GO más importante fue el “deslizamiento del filamento del músculo”. Este es un término que está relacionado con la contracción muscular de los filamentos de actina y miosina. Dicho proceso está relacionado con el atributo de la terneza, y al mismo tiempo es uno de los más difíciles de homogeneizar. En general, se observó como en el ganado bovino y porcino las proteínas más importantes en el estrés están relacionadas con la contracción muscular y la regulación de esta, teniendo un gran impacto en la terneza de la carne, la capacidad de retención del agua y el color de la carne. Además, en el cerdo, el enriquecimiento mostró proteínas de respuesta a la proteína desdoblada y al proceso catabólico de peróxido de hidrógeno. Es decir, son proteínas relacionadas con la protección de las células ante el estrés en la carne del cerdo.

La falta de bienestar animal implica grandes pérdidas económicas en la industria de la alimentación. De ahí a que la obtención de una lista de biomarcadores para poder controlarlo ahorrará millones de euros en pérdidas económicas. De todos los tipos de estrés aquí investigados, se

comprobó que el estrés por calor es uno de los más problemáticos en la industria alimentaria, así como el sistema de manejo pre-sacrificio, viendo que afectaban en diferente grado tanto a la carne como a otros productos alimentarios. A pesar de que en el Capítulo II la diferencia entre la mezcla y no mezcla con animales desconocidos no es uno de los principales factores que afectan a la calidad de la carne, en esta revisión se observa como un mal manejo tiene consecuencias negativas en la calidad de la carne. Por todo esto, la tecnología proteómica aquí expuesta permite abordar los problemas que se asocian a la pérdida de bienestar animal en la búsqueda de biomarcadores relacionados con la calidad alimentaria, para poder así obtener un conocimiento más en profundidad sobre los procesos biológicos que subyacen estos cambios asociados al estrés.

A lo largo de esta Tesis se analiza desde diferentes puntos de vista como diversos factores afectan a la calidad de la carne, pudiendo estudiarlos desde un punto de vista del consumidor (evaluación a nivel sensorial de la palatabilidad de la carne), pasando por el estudio de los aspectos fisicoquímicos y nutricionales asociados y acabar adentrándonos en los procesos moleculares que subyacen a dichas variaciones a nivel proteómico

CONCLUSIONES



8 CONCLUSIONES

8.1 El presente estudio permitió profundizar en el efecto que se produce en la calidad de la carne de la raza Rubia Gallega (RG) al considerar diferentes sistemas de producción en conjunción con variaciones en la dieta de acabado. Los resultados mostraron que la alimentación de acabado tiene una gran influencia en la calidad de la carne, mientras que el sistema de producción presenta un menor efecto en la mayoría de los parámetros de calidad evaluados. En concreto, la carne obtenida de terneros del grupo extensivo con alimentación de acabado basada en pasto y suplementación con pienso comercial resultó la más saludable y la de mayor palatabilidad.

8.2 La carne producida usando pasto está en línea con las actuales expectativas y demandas del consumidor. Estos sistemas contribuyen a la obtención de carne con un mayor valor nutricional y con una mayor sostenibilidad medioambiental, debido al empleo de recursos propios de las explotaciones que permite reducir la huella de carbono.

8.3 El estudio comparativo del análisis sensorial y fisicoquímico de la carne de las razas bovinas Asturiana de los Valles (AV), Retinta (RE) y RG, reveló que los atributos de calidad de las tres razas fueron significativamente diferentes. Además, los resultados obtenidos demostraron que el efecto raza tiene un fuerte impacto en la fibrosidad, jugosidad y terniza, lo que podría utilizarse para mejorar la textura de la carne de vacuno, cuando se seleccionan genotipos o se llevan a cabo cruces industriales. Estos tipo de análisis comparativos son una herramienta útil para garantizar el origen de los productos cárnicos a la hora de diferenciarlos de otros productos existentes en el mercado.

8.4 El análisis de los resultados demostró, aunque con menos efectividad que la raza, que el efecto de otros factores como el sistema de producción (incluyendo la edad de sacrificio y sus posibles interacciones), el manejo pre-sacrificio y la maduración podrían jugar un papel clave en la calidad de la carne. Concretamente, los resultados

sugieren que los terneros jóvenes de la raza RG (sacrificados a los 9 meses) necesitarían una maduración más corta que otros terneros de mayor edad de las razas RE y AV (sacrificados a los 15 meses), para la obtención de una textura óptima.

8.5 La estimación de las distancias proteómicas cuantitativas entre las tres razas permite concluir que este tipo de distancias es una valiosa herramienta para la evaluación del grado de divergencia general del genoma funcional entre poblaciones, del subproteoma asociado a las variaciones en los caracteres biológicos e identificación de marcadores proteicos de las poblaciones. Además, las distancias proteómicas cuantitativas proporcionaron información más fiable que las cualitativas sobre el alcance de la diferenciación proteómica entre las poblaciones.

8.6 La mayoría de las 18 proteínas/isoformas miofibrilares y sarcoplasmáticas identificadas que mostraron una abundancia diferencial estadísticamente significativa entre las tres razas españolas tiene relación funcional con las variaciones en la terneza de la carne. Por tanto, estas proteínas, podrían ser *pQTL* candidatas para la mejora de la calidad de la carne. Además, dichas proteínas podrían ser marcadores útiles para reducir el riesgo de la pérdida de etiquetado y fraudes asociados con estas razas de ganado bovino española con la Denominación de Origen Protegida.

8.7 Los resultados obtenidos sugieren nuevas vías para la investigación en la proteómica de poblaciones, incluyendo la evaluación de la eficiencia relativa de los estudios proteómicos basados en gel y *gel-free* para la estimación de la distancia proteómica, las variaciones espacio-temporales de la distancia proteómica y la relación entre la distancia proteómica y la diferenciación fenotípica de los caracteres biológicos.

8.8 El estudio de revisión bibliográfica mostró que la proteómica es una tecnología útil en la búsqueda de biomarcadores potenciales de las variaciones de la calidad del alimento asociadas con el bienestar animal. En particular, la aplicación de la 2-DE y la espectrometría de masas, ha permitido obtener la identificación de proteínas asociadas al estrés para la búsqueda de biomarcadores proteicos.

8.9 Los análisis de enriquecimiento funcional indicaron una clara relación entre el estrés y las proteínas asociadas a funciones estructurales-contráctiles. Estas proteínas podrían ser usadas como biomarcadores del bienestar animal en el caso de la carne de vacuno y del cerdo.





BIBLIOGRAFÍA



9 BIBLIOGRAFÍA

- Aaslyng, M.D., Meinert, L., 2017. Meat flavour in pork and beef – From animal to meal. *Meat Sci.* 132, 112–117.
- Acharjee, A., Chibon, P.Y., Kloosterman, B., America, T., Renaut, J., Maliepaard, C., Visser, R.G.F., 2018. Genetical genomics of quality related traits in potato tubers using proteomics. *BMC Plant Biol.* 18, 1–10.
- ACRUGA, 2020. Asociación Nacional de Criadores de Ganado Vacún Selecto de Raza Rubia Gallega (A.C.R.U.G.A.). [WWW Document]. URL <https://acruga.com/> (accessed 3.28.20).
- Adzitey, F., Nurul, H., 2011. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: Causes and measures to reduce these incidences - a mini review. *Int. Food Res. J.* 18, 11–20.
- Agrawal, G.K., Thelen, J.J., 2009. A high-resolution two dimensional Gel- and Pro-Q DPS-based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. *Methods Mol. Biol.* 527, 3–19.
- Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., Jahangir, M., 2016. Oxidation of Lipids in Foods. *Sarhad J. Agric.* 32, 230–238.
- Ajmone-Marsan, P., Garcia, J.F., Lenstra, J.A., Consortium, T.G., 2010. On the Origin of Cattle: How Aurochs Became Cattle and Colonized the World. *Evol. Anthropol. Issues, News, Rev.* 19, 148–157.

- Albertí, P., Panea, B., Sañudo, C., Olleta, J.L., Ripoll, G., Ertbjerg, P., Christensen, M., Gigli, S., Failla, S., Concetti, S., Hocquette, J.F., Jailler, R., Rudel, S., Renand, G., Nute, G.R., Richardson, R.I., Williams, J.L., 2008. Live weight, body size and carcass characteristics of young bulls of fifteen European breeds. *Livest. Sci.* 114, 19–30.
- Albertí, P., Ripoll, G., Goyache, F., Lahoz, F., Olleta, J.L., Panea, B., Sañudo, C., 2005. Carcass characterisation of seven Spanish beef breeds slaughtered at two commercial weights. *Meat Sci.* 71, 514–521.
- Aldai, N., Murray, B.E., Oliván, M., Martínez, A., Troy, D.J., Osoro, K., Nájera, A.I., 2006. The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physico-chemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. *Meat Sci.* 72, 486–495.
- Aldai, N., Nájera, A.I., Martínez, A., Celaya, R., Osoro, K., 2007. Correlation between carcass conformation and fat cover degree, and muscle fatty acid profile of yearling bulls depending on breed and mh-genotype. *Livest. Sci.* 107, 199–212.
- Alfaia, C.M.M., Alves, S.P., Lopes, A.F., Fernandes, M.J.E., Costa, A.S.H., Fontes, C.M.G.A., Castro, M.L.F., Bessa, R.J.B., Prates, J.A.M., 2010. Effect of cooking methods on fatty acids, conjugated isomers of linoleic acid and nutritional quality of beef intramuscular fat. *Meat Sci.* 84, 769–777.
- Alfaia, C.P.M., Alves, S.P., Martins, S.I. V, Costa, A.S.H., Fontes, C.M.G.A., Lemos, J.P.C., Bessa, R.J.B., Prates, J.A.M., 2009. Effect of the feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. *Food Chem.* 114,

939–946.

- Ali, M.S., Kang, G.-H., Joo, S.T., 2008. A Review: Influences of Pre-slaughter Stress on Poultry Meat Quality. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 21, 912–916.
- Alonso, R., Salavert, F., Garcia-Garcia, F., Carbonell-Caballero, J., Bleda, M., Garcia-Alonso, L., Sanchis-Juan, A., Perez-Gil, D., Marin-Garcia, P., Sanchez, R., Cubuk, C., Hidalgo, M.R., Amadoz, A., Hernansaiz-Ballesteros, R.D., Alemán, A., Tarraga, J., Montaner, D., Medina, I., Dopazo, J., 2015. Babelomics 5.0: Functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res.* 43, W117–W121.
- Angel, T.E., Aryal, U.K., Hengel, S.M., Baker, E.S., Kelly, R.T., Robinson, E.W., Smith, R.D., 2012. Mass spectrometry-based proteomics: Existing capabilities and future directions. *Chem. Soc. Rev.* 41, 3912–3928.
- Appleby, M., Cussen, V., Garcés, L., Lambert, L.A., Turner, J., 2008. Long Distance Transport and Welfare of Farm Animals. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Aslan, O., Sweeney, T., Mullen, A.M., Hamill, R.M., 2010. Regulatory polymorphisms in the bovine Ankyrin 1 gene promoter are associated with tenderness and intramuscular fat content. *BMC Genet.* 11, 1–14.
- Avilés, C., Juárez, M., Peña, F., Domenech, V., Clemente, I., Molina, A., 2013. Association of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 and CAST genes with beef tenderness from Spanish commercial feedlots. *Czech J. Anim. Sci.* 58, 479–487.
- Avilés, C., Martínez, A.L., Domenech, V., Peña, F., 2015. Effect of feeding system and breed on growth performance, and carcass and

- meat quality traits in two continental beef breeds. *Meat Sci.* 107, 94–103.
- Baiwir, D., Nanni, P., Susanne, M., Smargiasso, N., Morsa, D., Pauw, E. De, Mazzucchelli, G., 2018. Gel-Free Proteomics. In: de Almeida, A.M., Eckersall, D., Miller, I. (Eds.), *Proteomics in Domestic Animals: From Farm in Systems Biology*. Springer, Cham, pp. 55–101.
- Banović, M., Grunert, K.G., Barreira, M.M., Fontes, M.A., 2009. Beef quality perception at the point of purchase: A study from Portugal. *Food Qual. Prefer.* 20, 335–342.
- Bartlett, J.R., Smith, M., 2003. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poult. Sci.* 82, 1580–1588.
- Baudin, B., 2012. Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE). In: Magdelin, S. (Ed.), *Gel Electrophoresis-Principles and Basics*. Tech, Rijeka, Croatia, pp. 137–156.
- Beattie, V.E., O’Connell, N.E., Moss, B.W., 2000. Influence of environmental enrichment on the behaviour, performance and meat quality of domestic pigs. *Livest. Prod. Sci.* 65, 71–79.
- Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Ferrand, N., Casoli, A., Goyache, F., Royo, L.J., Conti, S., Lari, M., Martini, A., Ouragh, L., Magid, A., Atash, A., Zsolnai, A., Boscato, P., Triantaphylidis, C., Ploumi, K., Sineo, L., Mallegni, F., Taberlet, P., Erhardt, G., Sampietro, L., Bertranpetit, J., Barbujani, G., Luikart, G., Bertorelle, G., 2006. The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8113–8118.
- Belew, J.B., Brooks, J.C., McKenna, D.R., Savell, J.W., 2003. Warner-

- Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. *Meat Sci.* 64, 507–512.
- Belk, K. E., Dikeman, M.E., Calkins, C.R., Andy King, D., Shackelford, S.D., Hale, D., Laird, H., 2015. Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness. Champaign, IL.
- Bellido, M., Escribano Sánchez, M., Mesías Díaz, F.J., Rodríguez De Ledesma Vega, A., Pulido García, F., 2001. Sistemas Extensivos De Producción Animal Extensive Systems in Animal Production. *Arch. Zootec.* 50, 465–489.
- Bendixen, E., 2005. The use of proteomics in meat science. *Meat Sci.* 71, 138–149.
- Berggren, K.N., Schulenberg, B., Lopez, M.F., Steinberg, T.H., Bogdanova, A., Smejkal, G., Wang, A., Patton, W.F., 2002. An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: Comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* 2, 486–498.
- Berihulay, H., Abied, A., He, X., Jiang, L., Ma, Y., 2019. Adaptation Mechanisms of Small Ruminants to Environmental Heat Stress. *Animals* 9, 1–9.
- Bernabucci, U., Biffani, S., Buggiotti, L., Vitali, A., Lacetera, N., Nardone, A., 2014. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97, 471–486.
- Binns, D., Dimmer, E.C., Huntley, R.P., Barrell, D.G., O'Donovan, C., Apweiler, R., 2009. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* 25, 3045–3046.
- Bispo, E., Monserrat, L., González, L., Franco, D., Moreno, T., 2010a.

- Effect of weaning status on animal performance and meat quality of Rubia Gallega calves. *Meat Sci.* 86, 832–838.
- Bispo, E., Moreno, T., Latorre, A., González, L., Herradón, P.G., Franco, D., Monserrat, L., 2010b. Effect of weaning status on lipids of Galician Blond veal: Total fatty acids and 18:1 *cis* and *trans* isomers. *Meat Sci.* 86, 357–363.
- Blanco-Penedo, I., López-Alonso, M., Shore, R.F., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2012. Evaluation of organic, conventional and intensive beef farm systems: Health, management and animal production. *Animal* 6, 1503–1511.
- Bonneau, M., Lebret, B., 2010. Production systems and influence on eating quality of pork. *Meat Sci.* 84, 293–300.
- Borggaard, C., 2014. On-line measurement of meat quality. In: Dikeman, M., Devine, C. (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences* (Second Edition). Academic Press, Oxford, pp. 489–497.
- Bouley, J., Chambon, C., Picard, B., 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811–1824.
- Bowker, B., 2017. Developments in our understanding of water-holding capacity. In: Petracci, M., Berri, C. (Eds.), *Poultry Quality Evaluation: Quality Attributes and Consumer Values*. Woodhead Publishing, pp. 77–113.
- Bragaglio, A., Napolitano, F., Pacelli, C., Pirlo, G., Sabia, E., Serrapica, F., Serrapica, M., Braghieri, A., 2018. Environmental impacts of Italian beef production: A comparison between different systems. *J. Clean. Prod.* 172, 4033–4043.
- Brea, T., García, J., Carballo, J.A., Sánchez, L., Monserrat, L., 1996. Sanidad y producción de rumiantes en el área del mediterráneo. In:

- Felipe, C. y (Ed.), Murcia, pp. 575–578.
- Brea, T., García, J., Monserrat, L., Sánchez, L., Carballo, J.A., 1998. Modelización, crecimiento y rendimiento potencial de machos y hembras de raza Rubia Galega, Memoria CI. ed. Conselleía de Agricultura, Gandería Política Agroalimentaria.
- Brown, S.N., Warriss, P.D., Nute, G.R., Edwards, J.E., Knowles, T.G., 1998. Meat quality in pigs subjected to minimal preslaughter stress. *Meat Sci.* 49, 257–265.
- Bruce, H.L., Stark, J.L., Beilken, S.L., 2004. The effects of finishing diet and postmortem ageing on the eating quality of the *M. longissimus thoracis* of electrically stimulated Brahman steer carcasses. *Meat Sci.* 67, 261–268.
- Burrow, H.M., Moore, S.S., Johnston, D.J., Barendse, W., Bindon, B.M., 2001. Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: A review. *Aust. J. Exp. Agric.* 41, 893–919.
- Caine, W.R., Aalhus, J.L., Best, D.R., Dugan, M.E.R., Jeremiah, L.E., 2003. Relationship of texture profile analysis and Warner-Bratzler shear force with sensory characteristics of beef rib steaks. *Meat Sci.* 64, 333–339.
- Calkins, C.R., Hodgen, J.M., 2007. A fresh look at meat flavor. *Meat Sci.* 77, 63–80.
- Cañas-Álvarez, J.J., González-Rodríguez, A., Munilla, S., Varona, L., Díaz, C., Baro, J.A., Altarriba, J., Molina, A., Piedrafita, J., 2015. Genetic diversity and divergence among Spanish beef cattle breeds assessed by a bovine high-density SNP chip. *J. Anim. Sci.* 93, 5164–5174.
- Cañón, J., García, D., Delgado, J. V., Dunner, S., Telo da Gama, L., Landi, V., Martín-Burriel, I., Martínez, A., Penedo, C., Rodellar,

- C., Zaragoza, P., Ginja, C., 2011. Relative breed contributions to neutral genetic diversity of a comprehensive representation of Iberian native cattle. *Animal* 5, 1323–1334.
- Cao, L., Hou, C., Shen, Q., Zhang, D., Wang, Z., 2019. Phosphorylation of myosin regulatory light chain affects actomyosin dissociation and myosin degradation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 54, 2246–2255.
- Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C.J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S., Hub, A., Working group, W. presence, 2009. AmiGO: Online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25, 288–289.
- Carpenter, C.E., Cornforth, D.P., Whittier, D., 2001. Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction. *Meat Sci.* 57, 359–363.
- Chai, J., Xiong, Q., Zhang, C.X., Miao, W., Li, F.E., Zheng, R., Peng, J., Jiang, S.W., 2010. Effect of pre-slaughter transport plant on blood constituents and meat quality in halothane genotype of NN Large White×Landrace pigs. *Livest. Sci.* 127, 211–217.
- Chaijan, M., Panpipat, W., 2017. Mechanism of oxidation in foods of animal origin. In: Press., A.A. (Ed.), *Natural Antioxidants*. pp. 21–58.
- Chail, A., Legako, J.F., Pitcher, L.R., Griggs, T.C., Ward, R.E., Martini, S., MacAdam, J.W., 2016. Legume finishing provides beef with positive human dietary fatty acid ratios and consumer preference comparable with grain-finished beef. *J. Anim. Sci.* 94, 2184–2197.
- Chakravarti, B., Fathy, P., Sindicich, M., Mallik, B., Chakravarti, D.N., 2010. Comparison of SYPRO Ruby and Flamingo fluorescent stains for application in proteomic research. *Anal. Biochem.* 398, 1–6.

- Chambaz, A., Scheeder, M.R.L., Kreuzer, M., Dufey, P.A., 2003. Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. *Meat Sci.* 63, 491–500.
- Chauhan, S.S., Ponnampalam, E.N., Dunshea, F.R., Warner, R.D., 2019. Breed and Nutrition Effects on Meat Quality and Retail Color after Lamb Pre-Slaughter Stress. *Meat Muscle Biol.* 3, 147–157.
- Chaze, T., Bouley, J., Chambon, C., Barboiron, C., Picard, B., 2006. Mapping of alkaline proteins in bovine skeletal muscle. *Proteomics* 6, 2571–2575.
- Chaze, T., Hocquette, J.-F., Meunier, B., Renand, G., Jurie, C., Chambon, C., Journaux, L., Rousset, S., Denoyelle, C., Lepetit, J., Picard, B., 2013. Biological Markers for Meat Tenderness of the Three Main French Beef Breeds Using 2-DE and MS Approach BT - Proteomics in Foods: Principles and Applications. In: Toldrá, F., Nollet, L.M.L. (Eds.), . Springer US, Boston, MA, pp. 127–146.
- Chen, L., Li, X., Ni, N., Liu, Y., Chen, L., Wang, Z., Shen, Q.W., Zhang, D., 2016. Phosphorylation of myofibrillar proteins in post-mortem ovine muscle with different tenderness. *J. Sci. Food Agric.* 96, 1474–1483.
- Cherfaoui, M., Durand, D., Bonnet, M., Cassar-Malek, I., Bauchart, D., Thomas, A., Gruffat, D., 2012. Expression of enzymes and transcription factors involved in n-3 long chain PUFA biosynthesis in Limousin bull tissues. *Lipids* 47, 391–401.
- Cho, S., Kang, G., Seong, P.N., Park, B., Kang, S.M., 2015. Effect of slaughter age on the antioxidant enzyme activity, color, and oxidative stability of Korean Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) cow

- beef. *Meat Sci.* 108, 44–49.
- Colle, M.J., Richard, R.P., Killinger, K.M., Bohlscheid, J.C., Gray, A.R., Loucks, W.I., Day, R.N., Cochran, A.S., Nasados, J.A., Doumit, M.E., 2016. Influence of extended aging on beef quality characteristics and sensory perception of steaks from the biceps femoris and semimembranosus. *Meat Sci.* 119, 110–117.
- Commision, E., 2020. Common agricultural policy [WWW Document]. URL https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/key-policies/common-agricultural-policy_en (accessed 10.7.20).
- Corbin, C.H., O’Quinn, T.G., Garmyn, A.J., Legako, J.F., Hunt, M.R., Dinh, T.T.N., Rathmann, R.J., Brooks, J.C., Miller, M.F., 2015. Sensory evaluation of tender beef strip loin steaks of varying marbling levels and quality treatments. *Meat Sci.* 100, 24–31.
- Cruzen, S.M., Pearce, S.C., Baumgard, L.H., Gabler, N.K., Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M., 2015. Proteomic changes to the sarcoplasmic fraction of predominantly red or white muscle following acute heat stress. *J. Proteomics* 128, 141–153.
- D’Alessandro, A., Zolla, L., 2012. We Are What We Eat: Food Safety and Proteomics. *J. Proteome Res.* 11, 26–36.
- D’Alessandro, A., Zolla, L., 2013. Foodomics to investigate meat tenderness. *Trends Anal. Chem.* 52, 47–53.
- D’Eath, R.B., Turner, S.P., Kurt, E., Evans, G., Thölking, L., Looft, H., Wimmers, K., Murani, E., Klont, R., Foury, A., Ison, S.H., Lawrence, A.B., Mormède, P., 2010. Pigs’ aggressive temperament affects pre-slaughter mixing aggression, stress and meat quality. *Animal* 4, 604–616.
- Dannenberger, D., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Scollan, N., Steinhart, H., Ender, K., 2005. Effect of pasture vs. concentrate

- diet on CLA isomer distribution in different tissue lipids of beef cattle. *Lipids* 40, 589–598.
- Dashdorj, D., Tripathi, V.K., Cho, S., Kim, Y., Hwang, I., 2016. Dry aging of beef; Review. *J. Anim. Sci. Technol.* 58, 1–11.
- De Backer, C.J.S., Hudders, L., 2015. Meat morals: relationship between meat consumption consumer attitudes towards human and animal welfare and moral behavior. *Meat Sci.* 99, 68–74.
- De Souza Rodrigues, R.T., Chizzotti, M.L., Vital, C.E., Baracat-Pereira, M.C., Barros, E., Busato, K.C., Gomes, R.A., Ladeira, M.M., Da Silva Martins, T., 2017. Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. *PLoS One* 12, e0170294.
- Decker, J.E., McKay, S.D., Rolf, M.M., Kim, J.W., Molina Alcalá, A., Sonstegard, T.S., Hanotte, O., Götherström, A., Seabury, C.M., Praharani, L., Babar, M.E., Correia de Almeida Regitano, L., Yildiz, M.A., Heaton, M.P., Liu, W.S., Lei, C.Z., Reecy, J.M., Saif-Ur-Rehman, M., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., 2014. Worldwide Patterns of Ancestry, Divergence, and Admixture in Domesticated Cattle. *PLoS Genet.* 10, e1004254.
- Del Campo, M., Brito, G., De Lima, J.M.S., Martins, D.V., Sañudo, C., Julián, R.S., Hernández, P., Montossi, F., 2008. Effects of feeding strategies including different proportion of pasture and concentrate, on carcass and meat quality traits in Uruguayan steers. *Meat Sci.* 80, 753–760.
- Depreux, F.F.S., Grant, A.L., Gerrard, D.E., 2002. Influence of halothane genotype and body-weight on myosin heavy chain composition in pig muscle as related to meat quality. *Livest. Prod. Sci.* 73, 265–273.

- Desai, M.A., Jackson, V., Zhai, W., Suman, S.P., Nair, M.N., Beach, C.M., Schilling, M.W., 2016. Proteome basis of pale, soft, and exudative-like (PSE-like) broiler breast (*Pectoralis major*) meat. *Poult. Sci.* 95, 2696–2706.
- Descalzo, A.M., Insani, E.M., Biolatto, A., Sancho, A.M., García, P.T., Pensel, N.A., Josifovich, J.A., 2005. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Sci.* 70, 35–44.
- Destefanis, G., Brugiapaglia, A., Barge, M.T., Dal Molin, E., 2008. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner–Bratzler shear force. *Meat Sci.* 78, 153–156.
- Di Luca, A., Elia, G., Hamill, R., Mullen, A.M., 2013. 2D DIGE proteomic analysis of early post mortem muscle exudate highlights the importance of the stress response for improved water-holding capacity of fresh pork meat. *Proteomics* 13, 1528–1544.
- Dilzer, A., Park, Y., 2012. Implication of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Human Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 488–513.
- Dokmanovic, M., Ivanovic, J., Janjic, J., Boskovic, M., Laudanovic, M., Pantic, S., Baltic, M.Z., 2017. Effect of lairage time, behaviour and gender on stress and meat quality parameters in pigs. *Anim. Sci. J.* 88, 500–506.
- Dokmanović, M., Velarde, A., Tomović, V., Glamočlija, N., Marković, R., Janjić, J., Baltić, M.Z., 2014. The effects of lairage time and handling procedure prior to slaughter on stress and meat quality parameters in pigs. *Meat Sci.* 98, 220–226.
- Domingo, G., Iglesias, A., Monserrat, L., Sanchez, L., Cantalapiedra, J., Lorenzo, J.M., 2015. Effect of crossbreeding with Limousine, Rubia Gallega and Belgium Blue on meat quality and fatty acid

profile of Holstein calves. *Anim. Sci. J.* 86, 913–921.

- Drabovich, A.P., Pavlou, M.P., Batruch, I., Diamandis, E.P., 2013. Chapter 2 - Proteomic and Mass Spectrometry Technologies for Biomarker Discovery. In: Issaq, H.J., Veenstra, T.D. (Eds.), *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*. Academic Press, Boston, pp. 17–37.
- Duckett, S., Neel, J.P.S., Lewis, R., Fontenot, J., Clapham, W., 2013. Effects of Forage Species or Concentrate Finishing on Animal Performance, Carcass and Meat Quality [WWW Document]. . Digit. Nebraska. URL <https://digitalcommons.unl.edu/animalscifacpub/814/> (accessed 9.26.19).
- Dunne, P.G., Monahan, F.J., Moloney, A.P., 2011. Current perspectives on the darker beef often reported from extensively-managed cattle: Does physical activity play a significant role? *Livest. Sci.* 142, 1–22.
- Dunne, P.G., Monahan, F.J., O'Mara, F.P., Moloney, A.P., 2009. Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat Sci.* 81, 28–45.
- Efron, B., 1982. The jackknife, the bootstrap, and other resampling plans. SIAM.
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J.* 8: 1461.
- Endres, M.I., Schwartzkopf-Genswein, K., 2018. Overview of cattle

- production systems. In: *Advances in Cattle Welfare*. Elsevier Ltd, pp. 1–26.
- Estévez, M., 2011. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci.* 89, 259–279.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ramírez, R., Ventanas, J., Cava, R., 2004. Extensively reared Iberian pigs versus intensively reared white pigs for the manufacture of liver pâté. *Meat Sci.* 67, 453–461.
- Europea, U., 2020. Política Agrícola Común (PAC) [WWW Document]. URL https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/key-policies/common-agricultural-policy_es (accessed 10.6.20).
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O., Muchenje, V., 2014. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* 64, 171–181.
- FAO, 2010. Fats and fatty acids in human nutrition: report of an expert consultation. Food Agric. Organ. United Nations. Geneva FAO.
- FAO, 2015. The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/3/a-i4787e.pdf> (accessed 3.26.20).
- FAO, 2020. Agriculture and Consumer Protection Department Animal Production and Health [WWW Document]. URL http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/quality_meat.html (accessed 10.7.20).
- FAOSTAT, 2018. FAOSTAT. [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize> (accessed 12.20.20).
- Faustman, C., Cassens, R.G., 1990. The biochemical basis for

- discoloration in fresh meat: a review. *J. Muscle Foods* 1, 217–243.
- Ferguson, D.M., Warner, R.D., 2008. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Sci.* 80, 12–19.
- Fidan, E.D., Türkyılmaz, M.K., Nazlıgül, A., Ünübol Aypak, S., Karaarslan, S., 2015. Effect of Preslaughter Shackling on Stress, Meat Quality Traits, and Glycolytic Potential in Broilers. *J. Agric. Sci. Technol.* 17, 1141–1150.
- Font-i-Furnols, M., Guerrero, L., 2014. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Sci.* 98, 361–371.
- Fontanesi, L., 2017. Meat Authenticity and Traceability. In: Lawrie's Meat Science. Elsevier Ltd, pp. 585–633.
- Foury, A., Leuret, B., Chevillon, P., Vautier, A., Terlouw, C., Mormède, P., 2011. Alternative rearing systems in pigs: Consequences on stress indicators at slaughter and meat quality. *Animal* 5, 1620–1625.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F.J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Parrado, M., Gallardo, J.M., Zapata, C., 2015. Tackling proteome changes in the *longissimus thoracis* bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *J. Proteomics* 122, 73–85.
- Fraser, A.F., Broom, D.M., 1990. Farm animal behaviour. In: Farm Animal Behaviour and Welfare. International, Wallingford, Oxon, UK ; New York, NY, USA.
- Freitas, A.S., Carvalho, L.M., Soares, A.L., Oliveira, M.E. da S., Madruga, M.S., Neto, A.C. de S., Carvalho, R.H., Ida, E.I., Shimokomak, M., 2017. Pale, Soft and Exudative (PSE) and Dark, Firm and Dry (DFD) Meat Determination in Broiler Chicken

- Raised Under Tropical Climate Management Conditions. *Int. J. Poult. Sci.* 16, 81–87.
- French, P., O’Riordan, E.G., Monahan, F.J., Caffrey, P.J., Vidal, M., Mooney, M.T., Troy, D.J., Moloney, A.P., 2000a. Meat quality of steers finished on autumn grass, grass silage or concentrate-based diets. *Meat Sci.* 56, 173–180.
- French, P., Riordan, E.G.O., Monahan, F.J., Caffrey, P.J., Mooney, M.T., Troy, D.J., Moloney, A.P., 2001. The eating quality of meat of steers fed grass and / or concentrates. *Meat Sci.* 57, 379–386.
- French, P., Stanton, C., Lawless, F., O’Riordan, E.G., Monahan, F.J., Caffrey, P.J., Moloney, A.P., 2000b. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *J. Anim. Sci.* 78, 2849–2855.
- Fu, H., Subramanian, R.R., Masters, S.C., 2000. 14-3-3 P PROTEINS : Structure , Function , and Regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 617–647.
- Fuente-Garcia, C., Aldai, N., Sentandreu, E., Oliván, M., García-Torres, S., Franco, D., Zapata, C., Sentandreu, M.A., 2019. Search for proteomic biomarkers related to bovine pre-slaughter stress using liquid isoelectric focusing (OFFGEL) and mass spectrometry. *J. Proteomics* 198, 59–65.
- Gagaoua, M., Terlouw, C., Richardson, I., Hocquette, J.-F., Picard, B., 2019. The associations between proteomic biomarkers and beef tenderness depend on the end-point cooking temperature, the country origin of the panelists and breed. *Meat Sci.* 157, 107871.
- Gajana, C.S., Nkukwana, T.T., Marume, U., Muchenje, V., 2013. Effects of transportation time, distance, stocking density,

- temperature and lairage time on incidences of pale soft exudative (PSE) and the physico-chemical characteristics of pork. *Meat Sci.* 95, 520–525.
- García-Torres, S., López-Gajardo, A., Mesías, F.J., 2016. Intensive vs. free-range organic beef. A preference study through consumer liking and conjoint analysis. *Meat Sci.* 114, 114–120.
- Garcia, A.B., Angeli, N., Machado, L., de Cardoso, F.C., Gonzalez, F., 2015. Relationships between heat stress and metabolic and milk parameters in dairy cows in southern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 47, 889–894.
- Gatellier, P., Mercier, Y., Juin, H., Renerre, M., 2005. Effect of finishing mode (pasture- or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. *Meat Sci.* 69, 175–186.
- Gil, M., Serra, X., Gispert, M., Àngels Oliver, M., Sañudo, C., Panea, B., Olleta, J.L., Campo, M., Oliván, M., Osoro, K., García-Cachán, M.D., Cruz-Sagredo, R., Izquierdo, M., Espejo, M., Martín, M., Piedrafita, J., 2001. The effect of breed-production systems on the myosin heavy chain 1, the biochemical characteristics and the colour variables of *Longissimus thoracis* from seven Spanish beef cattle breeds. *Meat Sci.* 58, 181–188.
- Glitsch, K., 2000. Consumer perceptions of fresh meat quality: cross-national comparison. *Br. Food J.* 102, 177–194.
- Gobert, M., Sayd, T., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., 2014. Application to proteomics to understand and modify meat quality. *Meat Sci.* 98, 539–543.
- González-Rodríguez, A., Munilla, S., Mouresan, E.F., Cañas-Álvarez, J.J., Baro, J.A., Molina, A., Díaz, C., Altarriba, J., Piedrafita, J.,

- Varona, L., 2017. Genomic differentiation between Asturiana de los Valles, Avileña-Negra Ibérica, Bruna dels Pirineus, Morucha, Pirenaica, Retinta and Rubia Gallega cattle breeds. *Animal* 11, 1667–1679.
- González, L., Moreno, T., Bispo, E., Dugan, M.E.R., Franco, D., 2014. Effect of supplementing different oils: Linseed, sunflower and soybean, on animal performance, carcass characteristics, meat quality and fatty acid profile of veal from “Rubia Gallega” calves. *Meat Sci.* 96, 829–836.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 9, 1037–53.
- Gorraiz, C., Beriain, M.J., Chasco, J., Insausti, K., 2002. Effect of aging time on volatile compounds, odor, and flavor of cooked beef from Pirenaica and Friesian bulls and heifers. *J. Food Sci.* 67, 916–922.
- Grabež, V., Kathri, M., Phung, V., Moe, K.M., Slinde, E., Skaugen, M., Saarem, K., Egelanddal, B., 2015. Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 93, 1967–1979.
- Grandin, T., 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.* 75, 249–257.
- Grandin, T., 2007. Introduction: Effect of customer requirements, international standards and marketing structure on the handling and transport of livestock and poultry. In: Grandin, T. (Ed.), *Livestock Handling and Transport*. UK: CABI Publishi, pp. 1–18.
- Gregory, K.E., Cundiff, L. V., Koch, R.M., Dikeman, M.E., Koohmaraie, M., 1994. Breed effects, retained heterosis, and

- estimates of genetic and phenotypic parameters for carcass and meat traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 72, 1174–1183.
- Grigor, P.N., Cockram, M.S., Steele, W.B., McIntyre, J., Williams, C.L., Leushuis, I.E., Van Reenen, C.G., 2004. A comparison of the welfare and meat quality of veal calves slaughtered on the farm with those subjected to transportation and lairage. *Livest. Prod. Sci.* 91, 219–228.
- Guerrero, A., Sañudo, C., Albertí, P., Ripoll, G., Campo, M.M., Olleta, J.L., Panea, B., Khliji, S., Santolaria, P., 2013. Effect of production system before the finishing period on carcass, meat and fat qualities of beef. *Animal* 7, 2063–2072.
- Hammami, H., Bormann, J., M'hamdi, N., Montaldo, H.H., Gengler, N., 2013. Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *J. Dairy Sci.* 96, 1844–1855.
- Hardman, M., Makarov, A.A., 2003. Interfacing the Orbitrap Mass Analyzer to an Electrospray Ion Source. *Anal. Chem.* 75, 1699–1705.
- Hartung, J., Nowak, B., Springorum, A.C., 2009. Animal welfare and meat quality. In: Kerry, J.P., Ledward, D. (Eds.), *Improving the Sensory and Nutritional Quality of Fresh Meat*. pp. 628–646.
- Hazard, D., Fernandez, X., Pinguet, J., Chambon, C., Letisse, F., Portais, J.-C., Wadih-Moussa, Z., Rémignon, H., Molette, C., 2011. Functional genomics of the muscle response to restraint and transport in chickens¹. *J. Anim. Sci.* 89, 2717–2730.
- Hollung, K., Veiseth, E., Jia, X., Færgestad, E.M., Hildrum, K.I., 2007. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Sci.* 77, 97–104.

- Honikel, K.O., 1997. Reference methods supported by OECD and their use in Mediterranean meat products. *Food Chem.* 59, 573–582.
- Horcada, A., López, A., Polvillo, O., Pino, R., Cubiles-de-la-vega, D., Tejerina, D., 2017. Fatty acid profile as a tool to trace the origin of beef in pasture- and grain-fed young bulls of Retinta breed. *Spanish J. Agric. Res.* 15, 1–11.
- Horcada, A., Polvillo, O., Juárez, M., Avilés, C., Martínez, A.L., Peña, F., 2016. Influence of feeding system (concentrate and total mixed ration) on fatty acid profiles of beef from three lean cattle breeds. *J. Food Compos. Anal.* 49, 110–116.
- Hu, H., Wu, C., Ding, Y., Zhang, X., Yang, M., Wen, A., Yin, Z., 2019. Comparative analysis of meat sensory quality, antioxidant status, growth hormone and orexin between Anqingliubai and Yorkshire pigs. *J. Appl. Anim. Res.* 47, 357–361.
- Huang, H., Scheffler, T.L., Gerrard, D.E., Larsen, M.R., Lametsch, R., 2018. Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics Analysis Revealed Different Regulatory Mechanisms of Halothane and Rendement Napole Genes in Porcine Muscle Metabolism. *J. Proteome Res.* 17, 2834–2849.
- Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M., 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* 71, 194–204.
- Hughes, J.M., Oiseth, S.K., Purslow, P.P., Warner, R.D., 2014. A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Sci.* 98, 520–532.
- Hui, Y.H., Aalhus, J.L., Cocolin, L., Guerrero-Legarreta, I., Nollet, L.M., Purchas, R.W., Schilling, M.W., Stanfield, P., Xiong, Y.L.,

2012. Handbook of Meat and Meat Processing, Second Edition.
- Humada, M.J., Sañudo, C., Serrano, E., 2014. Chemical composition, vitamin E content, lipid oxidation, colour and cooking losses in meat from Tudanca bulls finished on semi-extensive or intensive systems and slaughtered at 12 or 14 months. *Meat Sci.* 96, 908–915.
- Humada, M.J., Serrano, E., Sañudo, C., Rolland, D.C., Dugan, M.E.R., 2012. Production system and slaughter age effects on intramuscular fatty acids from young Tudanca bulls. *Meat Sci.* 90, 678–685.
- Hunter, R.R., Mitchell, M.A., Carlisle, A.J., Quinn, A.D., Kettlewell, P.J., Knowles, T.G., Warriss, P.D., 1998. Physiological responses of broilers to pre-slaughter lairage: Effects of the thermal micro-environment? *Br. Poult. Sci.* 39.
- Hwang, I.H., Park, B.Y., Cho, S.H., Kim, J.H., Choi, Y.S., Lee, J.M., 2004. Identification of Muscle Proteins Related to Objective Meat Quality in Korean Native Black Pig. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 17, 1599–1607.
- Irurueta, M., Cadoppi, A., Langman, L., Grigioni, G., Carduza, F., 2008. Effect of aging on the characteristics of meat from water buffalo grown in the Delta del Paraná region of Argentina. *Meat Sci.* 79, 529–533.
- ISO, 1973. Determination of total fat content, ISO 1443:1973 standard. In: International Standards Meat and Meat Products. Genève, Switzerland.
- ISO, 1978. Determination of nitrogen content, ISO 937:1978 standard. In: International Standards Meat and Meat Products. Genève, Switzerland.

- ISO, 1997. Determination of moisture content, ISO 1442:1997 standard. In: In International Standards Meat and Meat Products. Genève, Switzerland.
- ISO, 1998. Determination of ash content, ISO 936:1998 standard. In: International Standards Meat and Meat Products. Genève, Switzerland.
- ISO, 2012. Sensory analysis — General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors 8586:2012.
- ISO, 2016. Sensory analysis - Methodology - General guidance for establishing a sensory profile 13299:2016.
- Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. la Soc. vaudoise des Sci. Nat.* 44, 223–270.
- Jayasooriya, S.D., Torley, P.J., D’Arcy, B.R., Bhandari, B.R., 2007. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *Semitendinosus* and *Longissimus* muscles. *Meat Sci.* 75, 628–639.
- Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K.I., Hollung, K., 2009. Peroxiredoxin-6—A potential protein marker for meat tenderness in bovine *longissimus thoracis* muscle. *J. Anim. Sci.* 87, 2391–2399.
- Jiang, T., Busboom, J.R., Nelson, M.L., Mengarelli, R., 2011. Omega-3 fatty acids affected human perception of ground beef negatively. *Meat Sci.* 89, 390–399.
- Kadim, I.T., Mahgoub, O., Al-Ajmi, D.S., Al-Maqbaly, R.S., Al-Mugheiry, S.M., Bartolome, D.Y., 2004. The influence of season on quality characteristics of hot-boned beef *m. longissimus thoracis*. *Meat Sci.* 66, 831–836.

- Karre, L., Lopez, K., Getty, K.J.K., 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Sci.* 94, 220–227.
- Keane, M.G., Allen, P., 1998. Effects of production system intensity on performance, carcass composition and meat quality of beef cattle. *Livest. Prod. Sci.* 56, 203–214.
- Kerth, C.R., Braden, K.W., Cox, R., Kerth, L.K., Rankins, D.L., 2007. Carcass, sensory, fat color, and consumer acceptance characteristics of Angus-cross steers finished on ryegrass (*Lolium multiflorum*) forage or on a high-concentrate diet. *Meat Sci.* 75, 324–331.
- Khan, M.I., Jung, S., Nam, K.C., Jo, C., 2016. Postmortem Aging of Beef with a Special Reference to the Dry Aging. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 36, 159–169.
- Klieve, A. V., Hennessy, D., Ouwerkerk, D., Forster, R.J., Mackie, R.I., Attwood, G.T., 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *J. Appl. Microbiol.* 95, 621–630.
- Koohmaraie, M., Babiker, A.S., Merkel, R.A., Doutson, T.R., 1988. Role of Ca⁺⁺-Dependent Proteases and Lysosomal Enzymes in Postmortem Changes in Bovine Skeletal Muscle. *J. Food Sci.* 53, 1253–1257.
- Koutsidis, G., Elmore, J.S., Oruna-Concha, M.J., Campo, M.M., Wood, J.D., Mottram, D.S., 2008. Water-soluble precursors of beef flavour. Part II: Effect of post-mortem conditioning. *Meat Sci.* 79, 270–277.
- Králová, M., 2015. The effect of lipid oxidation on the quality of meat and meat products. *Maso Int. J. Food Sci. Technol.* 2, 125–132.
- Lana, A., Zolla, L., 2016. Proteolysis in meat tenderization from the

- point of view of each single protein: A proteomic perspective. *J. Proteomics* 147, 85–97.
- Lanari, M.C., Brewster, M., Yang, A., Tume, R.K., 2002. Pasture and grain finishing affect the color stability of beef. *J. Food Sci.* 67, 2467–2473.
- Lara, L., Rostagno, M., 2013. Impact of Heat Stress on Poultry Production. *Animals* 3, 356–369.
- Lee, P.Y., Saraygord-Afshari, N., Low, T.Y., 2020. The evolution of two-dimensional gel electrophoresis - from proteomics to emerging alternative applications. *J. Chromatogr. A* 1615, 460763.
- Lepetit, J., Grajales, A., Favier, R., 2000. Modelling the effect of sarcomere length on collagen thermal shortening in cooked meat: Consequence on meat toughness. *Meat Sci.* 54, 239–250.
- Leroy, B., Lambotte, S., Dotreppe, O., Lecocq, H., Istasse, L., Clinquart, A., 2004. Prediction of technological and organoleptic properties of beef *Longissimus thoracis* from near-infrared reflectance and transmission spectra. *Meat Sci.* 66, 45–54.
- Li, L., Wang, Y., Li, C., Wang, G., 2017. Proteomic analysis to unravel the effect of heat stress on gene expression and milk synthesis in bovine mammary epithelial cells. *Anim. Sci. J.* 88, 2090–2099.
- Li, L., Zhu, Y., Wang, X., He, Y., Cao, B., 2014. Effects of different dietary energy and protein levels and sex on growth performance, carcass characteristics and meat quality of F1 Angus × Chinese Xiangxi yellow cattle. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 1–12.
- Liu, Z., Ezernieks, V., Wang, J., Arachchillage, N.W., Garner, J.B., Wales, W.J., Cocks, B.G., Rochfort, S., 2017. Heat stress in dairy cattle alters lipid composition of milk. *Sci. Rep.* 7, 1–10.

- Lobb, K., Chow C.K., 2007. Fatty acid classification and Nomenclature. In: Chow, C.K. (Ed.), *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, Third Edition. CRC Press, Suite, pp. 1–15.
- López-Bote, C., 2017. Chemical and Biochemical Constitution of Muscle. In: *Lawrie's Meat Science*. pp. 99–158.
- López-Pedrouso, M., Bernal, J., Franco, D., Zapata, C., 2014. Evaluating two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 62, 7200–7208.
- López-Pedrouso, M., Pérez-Santaescolástica, C., Franco, D., Fulladosa, E., Carballo, J., Zapata, C., Lorenzo, J.M., 2018. Comparative proteomic profiling of myofibrillar proteins in dry-cured ham with different proteolysis indices and adhesiveness. *Food Chem.* 244, 238–245.
- López-Pedrouso, M., Rodríguez-Vázquez, R., Purriños, L., Oliván, M., García-Torres, S., Sentandreu, M.Á., Lorenzo, J.M., Zapata, C., Franco, D., 2020. Sensory and physicochemical analysis of meat from bovine breeds in different livestock production systems, pre-slaughter handling conditions, and ageing time. *Foods* 9, 1–17.
- Lorenzo, J.M., Cittadini, A., Munekata, P.E., Domínguez, R., 2015. Physicochemical properties of foal meat as affected by cooking methods. *Meat Sci.* 108, 50–54.
- Lorenzo, J.M., Domínguez, R., 2014. Cooking losses, lipid oxidation and formation of volatile compounds in foal meat as affected by cooking procedure. *Flavour Fragr. J.* 29, 240–248.
- Loudon, K.M.W., Tarr, G., Lean, I.J., Polkinghorne, R., McGilchrist,

- P., Dunshea, F.R., Gardner, G.E., Pethick, D.W., 2019. The Impact of Pre-Slaughter Stress on Beef Eating Quality. *Animals* 9, 1–14.
- Lucero-Borja, J., Pouzo, L.B., de la Torre, M.S., Langman, L., Carduza, F., Corva, P.M., Santini, F.J., Pavan, E., 2014. Slaughter weight, sex and age effects on beef shear force and tenderness. *Livest. Sci.* 163, 140–149.
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M., 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 83–95.
- Lusk, J.L., Fox, J.A., Schroeder, T.C., Mintert, J., Koohmaraie, M., 2001. In-store valuation of steak tenderness. *Am. J. Agric. Econ.* 83, 539–550.
- Ma, D., Liu, Q., Zhang, M., Feng, J., Li, X., Zhou, Y., Wang, X., 2019. iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of the spleen reveals innate immunity and cell death pathways associated with heat stress in broilers (*Gallus gallus*). *J. Proteomics* 196, 11–21.
- Macfie, H.J., Bratchell, N., Greenhoff, K., Vallis, L. V., 1989. Designs To Balance the Effect of Order of Presentation and First-Order Carry-Over Effects in Hall Tests. *J. Sens. Stud.* 4, 129–148.
- Mahmood, S., Turchinsky, N., Paradis, F., Dixon, W.T., Bruce, H.L., 2018. Proteomics of dark cutting *longissimus thoracis* muscle from heifer and steer carcasses. *Meat Sci.* 137, 47–57.
- Mancini, R.A., Hunt, M.C., 2005. Current research in meat color. *Meat Qual. Genet. Environ. Factors* 71, 100–121.
- MAPAMA, 2018. Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D. O. P.), Indicaciones Geográficas Protegidas (I. G. P.) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (E. T. G.) de Productos Agroalimentarios. Secretaría General de Agricultura y

- Alimentación. [WWW Document]. URL https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/informedop_igp_2018_ver6_tcm30-513985.pdf (accessed 3.27.20).
- MAPAMA, 2020. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [WWW Document]. URL <https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/default.aspx> (accessed 10.7.20).
- Mapiye, C., Chimonyo, M., Dzama, K., Hugo, A., Strydom, P.E., Muchenje, V., 2011. Fatty acid composition of beef from Nguni steers supplemented with Acacia karroo leaf-meal. *J. Food Compos. Anal.* 24, 523–528.
- Marco-Ramell, A., Arroyo, L., Peña, R., Pato, R., Saco, Y., Fraile, L., Bendixen, E., Bassols, A., 2016. Biochemical and proteomic analyses of the physiological response induced by individual housing in gilts provide new potential stress markers. *BMC Vet. Res.* 12, 1–11.
- Marco-Ramell, A., Arroyo, L., Saco, Y., García-Heredia, A., Camps, J., Fina, M., Piedrafita, J., Bassols, A., 2012. Proteomic analysis reveals oxidative stress response as the main adaptative physiological mechanism in cows under different production systems. *J. Proteomics* 75, 4399–4411.
- Marino, R., Albenzio, M., della Malva, A., Caroprese, M., Santillo, A., Sevi, A., 2014. Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds. *Meat Sci.* 98, 178–186.
- Marino, R., Albenzio, M., Girolami, A., Muscio, A., Sevi, A., Braghieri, A., 2006. Effect of forage to concentrate ratio on growth performance, and on carcass and meat quality of Podolian young

- bull. *Meat Sci.* 72, 415–424.
- Marquès, K., Sarazin, B., Chané-Favre, L., Zivy, M., Thiellemen, H., 2001. Comparative proteomics to establish genetic relationships in the Brassicaceae family. *Proteomics* 1, 1457–1462.
- Martín, M., Pulido, F., Escribano, M., 1997. Ganadería extensiva y producciones compatibles. In: *La Ganadería Extensiva En Los Países Mediterráneos de La Unión Europea.* , Junta de Extremadura-FEDER, pp. 13–41.
- Martinez-Rodríguez, R., Roldan-San, P., Flores-Pei, S., Ramirez-Te, J.A., Mora-Medin, P., Trujillo-O, M.E., Gonzalez-L, M., Becerril-H, M., Sanchez-He, M., Mota-Rojas, D., 2011. Deterioration of Pork Quality Due to the Effects of Acute Ante Mortem Stress: An Overview. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6, 1170–1184.
- Martins, T. da S., Lemos, M.V.A. de, Mueller, L.F., Baldi, F., Amorim, T.R. de, Ferrinho, A.M., Muñoz, J.A., Fuzikawa, I.H. de S., Moura, G.V. de, Gemelli, J.L., Pereira, A.S.C., 2018. Fat Deposition, Fatty Acid Composition, and Its Relationship with Meat Quality and Human Health. *Meat Sci. Nutr.*
- Mato, A., Rodríguez-Vázquez, R., López-pedrouso, M., Bravo, S., Franco, D., Zapata, C., 2019. The first evidence of global meat phosphoproteome changes in response to pre-slaughter stress. *BMC Genomics* 20, 1–15.
- McIlveen, H., Buchanan, J., 2001. The impact of sensory factors on beef purchase and consumption. *Nutr. Food Sci.* 31, 286–292.
- Medeiros De Oliveira Silva, R., Stafuzza, N.B., Fragomeni, B.D.O., Ferreira De Camargo, G.M., Ceacero, T.M., Cyrillo, J.N.D.S.G., Baldi, F., Boligon, A.A., Mercadante, M.E.Z., Lourenco, D.L., Misztal, I., De Albuquerque, L.G., 2017. Genome-wide

- association study for carcass traits in an experimental nelore cattle population. *PLoS One* 12, e0169860.
- Mennecke, B.E., Townsend, A.M., Hayes, D.J., Lonergan, S.M., 2007. A study of the factors that influence consumer attitudes toward beef products using the conjoint market analysis tool. *J. Anim. Sci.* 85, 2639–2659.
- Menzi, H., Oenema, O., Burton, C., Shipin, O., Gerber, P., Robinson, T., Franceschini, G., 2013. Impacts of intensive livestock production and manure management on the environment. In: *Livestock in a Changing Landscape*. pp. 139–163.
- Mezgebo, G.B., Moloney, A.P., O’Riordan, E.G., McGee, M., Richardson, R.I., Monahan, F.J., 2017. Comparison of organoleptic quality and composition of beef from suckler bulls from different production systems. *Animal* 11, 538–546.
- Milán, M.J., Bartolomé, J., Quintanilla, R., García-Cachán, M.D., Espejo, M., Herráiz, P.L., Sánchez-Recio, J.M., Piedrafita, J., 2006. Structural characterisation and typology of beef cattle farms of Spanish wooded rangelands (dehesas). *Livest. Sci.* 99, 197–209.
- Millen, D.D., Pacheco, R.D.L., Meyer, P.M., Rodrigues, P.H.M., De Beni Arrigoni, M., 2011. Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. *Anim. Front.* 1, 46–52.
- Miller, M., 2007. Dark, firm and dry beef. Beefresearch.
- Miller, R.K., 2017. The Eating Quality of Meat. *Lawrie’s Meat Sci.* 461–499.
- Min, B., Ahn, D.U., 2005. Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *Food Sci. Biotechnol.* 14, 152–163.
- Min, B., Nam, K.C., Cordray, J., Ahn, D.U., 2008. Endogenous factors

- affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *J. Food Sci.* 73, 439–446.
- Min, L., Zheng, N., Zhao, S., Cheng, J., Yang, Y., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., 2016. Long-term heat stress induces the inflammatory response in dairy cows revealed by plasma proteome analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 471, 296–302.
- Miranda-de la Lama, G.C., Villarroel, M., María, G.A., 2014. Livestock transport from the perspective of the pre-slaughter logistic chain: A review. *Meat Sci.* 98, 9–20.
- Mitchell, G.B., Clark, M.E., Siwicky, M., Caswell, J.L., 2008. Stress alters the cellular and proteomic compartments of bovine bronchoalveolar lavage fluid. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 111–125.
- Moholisa, E., Hugo, A., Strydom, P.E., van Heerden, I., 2017. The effects of animal age, feeding regime and a dietary beta-agonist on tenderness of three beef muscles. *J. Sci. Food Agric.* 97, 2375–2381.
- Moloney, A.P., Mooney, M.T., Kerry, J.P., Troy, D.J., 2001. Producing tender and flavoursome beef with enhanced nutritional characteristics. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 221–229.
- Moloney, A.P., Mooney, M.T., Troy, D.J., Keane, M.G., 2011. Finishing cattle at pasture at 30 months of age or indoors at 25 months of age: Effects on selected carcass and meat quality characteristics. *Livest. Sci.* 141, 17–23.
- Monserrat, L., 1990. Sistemas de producción de carne con vacas madres en Galicia. *Mundo Ganad.* 35–43.
- Monsón, F., Sañudo, C., Sierra, I., 2005. Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in

- intensively reared beef. *Meat Sci.* 71, 471–479.
- Montowska, M., Pospiech, E., 2012. Myosin light chain isoforms retain their species-specific electrophoretic mobility after processing, which enables differentiation between six species: 2DE analysis of minced meat and meat products made from beef, pork and poultry. *Proteomics* 12, 2879–2889.
- Montserrat, L., Sánchez, L., 2000. Producción intensiva de carne con raza Rubia Gallega. *Bovis* 92, 35–44.
- Mora, L., Gallego, M., Toldrá, F., 2018. New approaches based on comparative proteomics for the assessment of food quality. *Curr. Opin. Food Sci.* 22, 22–27.
- Morales, R., Menéndez-Buxadera, A., Avilés, C., Molina, A., 2013. Direct and maternal genetic effects for preweaning growth in Retinta cattle estimated by a longitudinal approach throughout the calving trajectory of the cow. *J. Anim. Breed. Genet.* 130, 425–434.
- Moran, J., 2002. Calf Rearing. A Practical Guide. Landlinks Press, Collingwood.
- Moreno, T., Varela, A., Oliete, B., Carballo, J.A., Sánchez, L., Montserrat, L., 2006. Nutritional characteristics of veal from weaned and unweaned calves: Discriminatory ability of the fat profile. *Meat Sci.* 73, 209–217.
- Morzel, M., Chambon, C., Hamelin, M., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Monin, G., 2004. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci.* 67, 689–696.
- Mouzo, D., Bernal, J., López-Pedrouso, M., Franco, D., Zapata, C., 2018a. Advances in the biology of seed and vegetative storage

- proteins based on two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Molecules* 23, 1–28.
- Mouzo, D., López-Pedrouso, M., Bernal, J., García, L., Franco, D., Zapata, C., 2018b. Association of Patatin-Based Proteomic Distances with Potato (*Solanum tuberosum* L.) Quality Traits. *J. Agric. Food Chem.* 66, 11864–11872.
- Mouzo, D., Rodríguez-vázquez, R., Lorenzo, J.M., Franco, D., Zapata, C., López-pedrouso, M., 2020. Proteomic application in predicting food quality relating to animal welfare . A review. *Trends Food Sci. Technol.* 99, 520–530.
- Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P.E., Hugo, A., Raats, J.G., 2009a. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. *Food Chem.* 112, 279–289.
- Muchenje, V., Hugo, A., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P.E., Raats, J.G., 2009b. Cholesterol levels and fatty acid profiles of beef from three cattle breeds raised on natural pasture. *J. Food Compos. Anal.* 22, 354–358.
- Muir, P.D., Deaker, J.M., Bown, M.D., 1998. Effects of forage- and grain-based feeding systems on beef quality: A review. *New Zeal. J. Agric. Res.* 41, 623–635.
- Muroya, S., Ohnishi-Kameyama, M., Oe, M., Nakajima, I., Shibata, M., Chikuni, K., 2007. Double phosphorylation of the myosin regulatory light chain during rigor mortis of bovine longissimus muscle. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3998–4004.
- Napolitano, F., Girolami, A., Sauro, V.N., 2001. L ’ allevamento del bovino podolico. *Zootec. Etol.* 13–16.

- Neely, T.R., Lorenzen, C.L., Miller, R.K., Tatum, J.D., Wise, J.W., Taylor, J.F., Buyck, M.J., Reagan, J.O., Savell, J.W., 1998. Beef Customer Satisfaction: Role of Cut, USDA Quality Grade, and City on In-Home Consumer Ratings. *J. Anim. Sci.* 76, 1027–1033.
- Nei, M., Li, W.-H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5269–5273.
- Nemecek, T., Huguenin-Elie, O., Dubois, D., Gaillard, G., Schaller, B., Chervet, A., 2011. Life cycle assessment of Swiss farming systems: II. Extensive and intensive production. *Agric. Syst.* 104, 233–245.
- Newton, K.G., Gill, C.O., 1981. The microbiology of DFD fresh meats: A review. *Meat Sci.* 5, 223–232.
- Niessen, W.M.A., 2003. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J. Chromatogr. A* 1000, 413–436.
- Nishimura, T., 2010. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Anim. Sci. J.* 81, 21–27.
- Novaković, S., Tomašević, I., 2017. A comparison between Warner-Bratzler shear force measurement and texture profile analysis of meat and meat products: A review. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 85, 012063.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- O'Quinn, T.G., Brooks, J.C., Polkinghorne, R.J., Garmyn, A.J., Johnson, B.J., Starkey, J.D., Rathmann, R.J., Miller, M.F., 2012.

- Consumer assessment of beef strip loin steaks of varying fat levels. *J. Anim. Sci.* 90, 626–634.
- O’Quinn, T.G., Legako, J.F., Brooks, J.C., Miller, M.F., 2018. Evaluation of the contribution of tenderness, juiciness, and flavor to the overall consumer beef eating experience. *Transl. Anim. Sci.* 2, 26–36.
- Ohsaki, H., Okada, M., Sasazaki, S., Hinenoya, T., Sawa, T., Iwanaga, S., Tsuruta, H., Mukai, F., Mannen, H., 2007. Proteomic Comparison between Japanese Black and Holstein Cattle by Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification of Proteins. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20, 638–644.
- Oliete, B., Carballo, J.A., Varela, A., Moreno, T., Monserrat, L., Sánchez, L., 2006. Effect of weaning status and storage time under vacuum upon physical characteristics of meat of the Rubia Gallega breed. *Meat Sci.* 73, 102–108.
- Oliván, M., Martínez, A., Osoro, K., Sañudo, C., Panea, B., Olleta, J.L., Campo, M.M., Oliver, M.À., Serra, X., Gil, M., Piedrafita, J., 2004. Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Sci.* 68, 567–575.
- Oliveira, B.M., Coorsen, J.R., Martins-de-Souza, D., 2014. 2DE: The Phoenix of Proteomics. *J. Proteomics* 104, 140–150.
- Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., Stadtman, E.R., 1987. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 5488–5491.
- Pandey, A., Mann, M., 2000. Proteomics to study genes and genomes.

Nature 405, 837–846.

- Panea, B., Olleta, J.L., Sañudo, C., del Mar Campo, M., Oliver, M.A., Gispert, M., Serra, X., Renand, G., del Carmen Oliván, M., Jabet, S., García, S., López, M., Izquierdo, M., García-Cachán, M.D., Quintanilla, R., Piedrafita, J., 2018. Effects of breed-production system on collagen, textural, and sensory traits of 10 European beef cattle breeds. *J. Texture Stud.* 49, 528–535.
- Paredi, G., Raboni, S., Bendixen, E., de Almeida, A.M., Mozzarelli, A., 2012. “Muscle to meat” molecular events and technological transformations: The proteomics insight. *J. Proteomics* 75, 4275–4289.
- Paredi, G., Sentandreu, M.A., Mozzarelli, A., Fadda, S., Hollung, K., de Almeida, A.M., 2013. Muscle and meat: New horizons and applications for proteomics on a farm to fork perspective. *J. Proteomics* 88, 58–82.
- Pateiro, M., Lorenzo, J.M., Diaz, S., Gende, J.A., Fernandez, M., Gonzalez, J., Garcia, L., Rial, F.J., Franco, D., 2013. Meat quality of veal: Discriminatory ability of weaning status. *Spanish J. Agric. Res.* 11, 1044–1056.
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C.S., Gangoda, L., Quek, C.Y.J., Williamson, N.A., Mouradov, D., Sieber, O.M., Simpson, R.J., Salim, A., Bacic, A., Hill, A.F., Stroud, D.A., Ryan, M.T., Agbinya, J.I., Mariadason, J.M., Burgess, A.W., Mathivanan, S., 2015. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* 15, 2597–2601.
- Pearce, K.L., Rosenvold, K., Andersen, H.J., Hopkins, D.L., 2011. Water distribution and mobility in meat during the conversion of

- muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes - A review. *Meat Sci.* 89, 111–124.
- Pearce, S.C., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E., Baumgard, L.H., Gabler, N.K., 2015. Acute Heat Stress and Reduced Nutrient Intake Alter Intestinal Proteomic Profile and Gene Expression in Pigs. *PLoS One* 10, e0143099.
- Pereira, A.L.F., Abreu, V.K.G., 2018. Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products. In: *Lipid Peroxidation Research*. IntechOpen, pp. 1–14.
- Perkins, A., Nelson, K.J., Parsonage, D., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2015. Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40, 435–445.
- Petracci, M., Mudalal, S., Soglia, F., Cavani, C., 2015. Meat quality in fast-growing broiler chickens. *Worlds. Poult. Sci. J.* 71.
- Picard, B., Berri, C., Lefaucheur, L., Molette, C., Sayd, T., Terlouw, C., 2010. Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings Funct. Genomics Proteomics* 9, 259–278.
- Picard, B., Gagaoua, M., 2017. Proteomic Investigations of Beef Tenderness. *Proteomics Food Sci. From Farm to Fork* 177–197.
- Picard, B., Gagaoua, M., 2020. Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. *Food Res. Int.* 127, 108739.
- Piedrafita, J., Quintanilla, R., Sañudo, C., Olleta, J.L., Campo, M.M., Panea, B., Renand, G., Turin, F., Jabet, S., Osoro, K., Oliván, M.C., Noval, G., García, P., García, M.D., Oliver, M.A., Gispert,

- M., Serra, X., Espejo, M., García, S., López, M., Izquierdo, M., 2003. Carcass quality of 10 beef cattle breeds of the Southwest of Europe in their typical production systems. *Livest. Prod. Sci.* 82, 1–13.
- Polsky, L., von Keyserlingk, M.A.G., 2017. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *J. Dairy Sci.* 100, 8645–8657.
- Pragna, P., Archana, P.R., Aleena, J., Sejian, V., Krishnan, G., Bagath, M., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E.K., Varma, G., Bhatta, R., 2017. Heat Stress and Dairy Cow: Impact on Both Milk Yield and Composition. *Int. J. Dairy Sci.* 12, 1–11.
- Priolo, A., Micol, D., Agabriel, J., 2001. Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour. A review. *Anim. Res.* 50, 185–200.
- Probst, J.K., Hillmann, E., Leiber, F., Kreuzer, M., Spengler Neff, A., 2013. Influence of gentle touching applied few weeks before slaughter on avoidance distance and slaughter stress in finishing cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 144, 14–21.
- Purriños, L., Bermúdez, R., Franco, D., Carballo, J., Lorenzo, J.M., 2011. Development of Volatile Compounds during the Manufacture of Dry-Cured “Lacón,” a Spanish Traditional Meat Product. *J. Food Sci.* 76, 89–97.
- Purslow, P.P., 2018. Contribution of collagen and connective tissue to cooked meat toughness; some paradigms reviewed. *Meat Sci.* 144, 127–134.
- Raes, K., De Smet, S., Demeyer, D., 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and

- conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113, 199–221.
- Ramayo-Caldas, Y., Renand, G., Ballester, M., Saintilan, R., Rocha, D., 2016. Multi-breed and multi-trait co-association analysis of meat tenderness and other meat quality traits in three French beef cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 48, 1–9.
- Realini, C.E., Duckett, S.K., Brito, G.W., Dalla Rizza, M., De Mattos, D., 2004. Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Sci.* 66, 567–577.
- Reiche, A.M., Oberson, J.L., Silacci, P., Messadène-Chelali, J., Hess, H.D., Dohme-Meier, F., Dufey, P.A., Terlouw, E.M.C., 2019. Pre-slaughter stress and horn status influence physiology and meat quality of young bulls. *Meat Sci.* 158, 107892.
- Resconi, V.C., Campo, M.M., Font i Furnols, M., Montossi, F., Sañudo, C., 2010. Sensory quality of beef from different finishing diets. *Meat Sci.* 86, 865–869.
- Revilla, I., Vivar-Quintana, A.M., 2006. Effect of breed and ageing time on meat quality and sensory attributes of veal calves of the “Ternera de Aliste” quality label. *Meat Sci.* 73, 189–195.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.-S., Jeong, W., Kim, K., 2001. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)* 52, 35–41.
- Rocha, L.M., Dionne, A., Saucier, L., Nannoni, E., Faucitano, L., 2014. Hand-held lactate analyzer as a tool for the real-time measurement of physical fatigue before slaughter and pork quality prediction.

Animal 9, 707–714.

- Rodríguez-Vázquez, R., Mato, A., López-Pedrouso, M., Franco, D., Sentandreu, M.A., Zapata, C., 2020a. Measuring quantitative proteomic distance between Spanish beef breeds. *Food Chem.* 315, 126293.
- Rodríguez-Vázquez, R., Pateiro, M., López-Pedrouso, M., Gende, A., Crecente, S., Serrano, M.P., González, J., Lorenzo, J.M., Zapata, C., Franco, D., 2020b. Influence of production system and finishing feeding on meat quality of Rubia Gallega calves. *Spanish J. Agric. Res.* 18, e0606
- Rodríguez-Vázquez, R., Zapata, C., 2019. A novel measure of quantitative proteomic distance. Poster Sess. Present. 2nd Food Chemistry Conf. Sevilla, S.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Bihan, M. Le, Thaysen-andersen, M., Roepstorff, P., 2013. 2D gels still have a niche in proteomics. *J. Proteomics* 88, 4–13.
- Romero, M.H., Uribe-Velásquez, L.F., Sánchez, J.A., Rayas-Amor, A.A., Miranda-de la Lama, G.C., 2017. Conventional versus modern abattoirs in Colombia: Impacts on welfare indicators and risk factors for high muscle pH in commercial Zebu young bulls. *Meat Sci.* 123, 173–181.
- Rosenvold, K., Andersen, H.J., 2003. Factors of significance for pork quality—a review. *Meat Sci.* 64, 219–237.
- Rutherford, N.H., Lively, F.O., Arnott, G., 2019. Evaluation of rumen temperature as a novel indicator of meat quality: Rumen temperature and haematological indicators of stress during the pre-

- slaughter period as predictors of instrumental meat quality in bulls. *Meat Sci.* 158, 107913.
- Ryu, Y.C., Kim, B.C., 2005. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle. *Meat Sci.* 71, 351–357.
- Salih, A.M., Smith, D.M., Price, J.F., Dawson, L.E., 1987. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult. Sci.* 66, 1483–1488.
- Salmi, B., Trefan, L., Bloom-Hansen, J., Bidanel, J.P., Doeschl-Wilson, A.B., Larzul, C., 2010. Meta-analysis of the effect of the halothane gene on 6 variables of pig meat quality and on carcass leanness. *J. Anim. Sci.* 88, 2841–2855.
- Sammet, K., Duehlmeier, R., Sallmann, H.P., Von Canstein, C., Von Mueffling, T., Nowak, B., 2006. Assessment of the antioxidative potential of dietary supplementation with α -tocopherol in low-nitrite salami-type sausages. *Meat Sci.* 72, 270–279.
- Sánchez, L., Monserrat, L., 2000. Producción intensiva de carne con raza Rubia Gallega. *Bovis* 92, 35–44.
- Sandercock, D.A., Hunter, R.R., Mitchell, M.A., Hocking, P.M., 2006. Thermoregulatory capacity and muscle membrane integrity are compromised in broilers compared with layers at the same age or body weight. *Br. Poult. Sci.* 47, 322*9.
- Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B., Santos-Silva, F., 2002. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livest. Prod. Sci.* 77, 187–194.

- Sañudo, C., Macie, E.S., Olleta, J.L., Villarroel, M., Panea, B., Albertí, P., 2004. The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Sci.* 66, 925–932.
- Saraswathy, N., Ramalingam, P., 2011a. 10 - Introduction to proteomics. In: Saraswathy, N., Ramalingam, P. (Eds.), *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*, Woodhead Publishing Series in Biomedicine. Woodhead Publishing, pp. 147–158.
- Saraswathy, N., Ramalingam, P., 2011b. 11 - Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. In: Saraswathy, N., Ramalingam, P. (Eds.), *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*, Woodhead Publishing Series in Biomedicine. Woodhead Publishing, pp. 159–170.
- Scheffler, T.L., Gerrard, D.E., 2007. Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci.* 77, 7–16.
- Scherr, S.J., McNeely, J.A., 2012. *Farming with nature: the science and practice of ecoagriculture*, Island Pre. ed.
- Schilling, M.W., Suman, S.P., Zhang, X., Nair, M.N., Desai, M.A., Cai, K., Ciaramella, M.A., Allen, P.J., 2017. Proteomic approach to characterize biochemistry of meat quality defects. *Meat Sci.* 132, 131–138.
- Scollan, N.D., Choi, N.-J., Kurt, E., Fisher, A. V., Enser, M., Wood, J.D., 2001. Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *Br. J. Nutr.* 85, 115–124.

- Scollan, N.D., Dannenberger, D., Nuernberg, K., Richardson, I., Mackintosh, S., Hocquette, J., Moloney, A.P., 2014. Enhancing the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *MESC* 97, 384–394.
- Sentandreu, M.A., Fraser, P.D., Halket, J., Patel, R., Bramley, P.M., 2010. A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes. *J. Proteome Res.* 9, 3374–3383.
- Sentandreu, M.A., Sentandreu, E., 2011. Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Sci.* 89, 280–285.
- Serra, X., Guerrero, L., Guàrdia, M.D., Gil, M., Sañudo, C., Panea, B., Campo, M.M., Olleta, J.L., García-Cachán, M.D., Piedrafita, J., Oliver, M.A., 2008. Eating quality of young bulls from three Spanish beef breed-production systems and its relationships with chemical and instrumental meat quality. *Meat Sci.* 79, 98–104.
- Sevane, N., Canón, J., Williams, J.L., Levéziel, H., Valentini, A., Dunner, S., 2015. SNP included in candidate genes involved in muscle, lipid and energy metabolism behave like neutral markers. *Anim. Prod. Sci.* 55, 1164–1171.
- Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Meade, M.K., Reagan, J.O., Byrnes, B.L., Koohmaraie, M., 2001. Consumer impressions of tender select beef. *J. Anim. Sci.* 79, 2605–2614.
- Shah, M.A., Bosco, S.J.D., Mir, S.A., 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci.* 98, 21–33.
- Shimokomaki, M., Ida, E.I., Soares, A.L., Oba, A., Kato, T., Pedrão, M.R., Coró, F.A.G., Carvalho, R.H., 2017. Animal Welfare and Meat Quality: Methodologies to Reduce Pre-slaughter Stress in

- Broiler Chicken. In: Barbosa-Cánovas, G., Pastore, G., Candoğan, K., Medina Meza, I.G., Caetano Da Silva Lannes, S., Buckle, K., Yada, R., Rosenthal, A. (Eds.), *Global Food Security and Wellness*. Springer PP - New York, pp. 301–313.
- Sierra, V., Guerrero, L., Fernández-Suárez, V., Martínez, A., Castro, P., Osoro, K., Rodríguez-Colunga, M.J., Coto-Montes, A., Oliván, M., 2010. Eating quality of beef from biotypes included in the PGI “Ternera Asturiana” showing distinct physicochemical characteristics and tenderization pattern. *Meat Sci.* 86, 343–351.
- Simon, Á., Gulyás, G., Mészár, Z., Bhide, M., Oláh, J., Bai, P., Csósz, É., Jávora, A., Komlósi, I., Remenyik, J., Czeglédi, L., 2019. Proteomics alterations in chicken jejunum caused by 24 h fasting. *PeerJ* 7, 1–19.
- Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56, 365–379.
- Simopoulos, A.P., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 233, 674–688.
- Šimová, V., Večerek, V., Passantino, A., Voslářová, E., 2016. Pre-transport factors affecting the welfare of cattle during road transport for slaughter - A review. *Acta Vet. Brno* 85, 303–318.
- Sionek, B., Przybylski, W., 2016. The impact of *ante-* and *post-mortem* factors on the incidence of pork defective meat – A review. *Ann. Anim. Sci.* 16, 333–345.
- Skibieli, A.L., Zachut, M., do Amaral, B.C., Levin, Y., Dahl, G.E., 2018.

- Liver proteomic analysis of postpartum Holstein cows exposed to heat stress or cooling conditions during the dry period. *J. Dairy Sci.* 101, 705–716.
- Smith, G.C., Belk, K.E., Sofos, J.N., Tatum, J.D., Williams, S.N., 2000. Economic implications of improved colour stability in beef. In: Decker, E.A., Faustman, C., Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*.
- Smith, G.C., Culp, G.R., Carpenter, Z.L., 1978. *Postmortem* Aging of Beef Carcasses. *J. Food Sci.* 43, 823–826.
- Smith, R.D., Nicholson, K.L., Nicholson, J.D.W., Harris, K.B., Miller, R.K., Griffin, D.B., Savell, J.W., 2008. Dry *versus* wet aging of beef: Retail cutting yields and consumer palatability evaluations of steaks from US Choice and US Select short loins. *Meat Sci.* 79, 631–639.
- Soladoye, O.P., Juárez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., Estévez, M., 2015. Protein oxidation in processed meat: Mechanisms and potential implications on human health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 106–122.
- Spanier, A.M., Flores, M., McMillin, K.W., Bidner, T.D., 1997. The effect of post-mortem aging on meat flavor quality in Brangus beef. Correlation of treatments, sensory, instrumental and chemical descriptors. *Food Chem.* 59, 531–538.
- Stadtman, E.R., 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 315–325.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of

- free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207–218.
- Stull, J.T., Kamm, K.E., Vandenboom, R., 2011. Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 510, 120–128.
- Suman, S.P., Joseph, P., 2013. Myoglobin Chemistry and Meat Color. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 79–99.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Von Mering, C., 2019. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47, D607–D613.
- Tang, X., Meng, Q., Gao, J., Zhang, S., Zhang, H., Zhang, M., 2015. Label-free quantitative analysis of changes in broiler liver proteins under heat stress using SWATH-MS technology. *Sci. Rep.* 5, 15119.
- Tarrant, P. V., 1990. Transportation of cattle by road. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 28, 153–170.
- Telleria, J., Biron, D.G., Brizard, J., Demetree, E., Séveno, M., Barnabé, C., 2010. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *PNAS* 107, 20411–20416.
- Terlouw, E.M.C., Arnould, C., Auperin, B., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Deiss, V., Lefèvre, F., Lensink, B.J., Mounier, L., 2008. Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and

- possible future research. *Animal* 2, 1501–1517.
- Timperio, A.M., D’Alessandro, A., Pariset, L., D’Amici, G.M., Valentini, A., Zolla, L., 2009. Comparative proteomics and transcriptomics analyses of livers from two different *Bos taurus* breeds: “Chianina and Holstein Friesian.” *J. Proteomics* 73, 309–322.
- Torrico, D.D., Hutchings, S.C., Ha, M., Bittner, E.P., Fuentes, S., Warner, R.D., Dunshea, F.R., 2018. Novel techniques to understand consumer responses towards food products: A review with a focus on meat. *Meat Sci.* 144, 30–42.
- Tosto, G., Reitz, C., 2016. Use of “omics” technologies to dissect neurologic disease. In: Rosano, C., Ikram, M.A., Ganguli, M. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., pp. 91–106.
- Toutain, B., Ickowicz, A., Dutilly-Diane, C., Reid, R.S., Tamsir Drop, A., Kumar Taneja, V., Gibon, A., Genin, D., Ibrahim, M., Behnke, R., Ash, A., 2010. Impacts of livestock systems on terrestrial ecosystems. In: *Livestock in a Changing Landscape, Volume 1: Drivers, Consequences, and Responses*,. Island Press, pp. 1165–1195.
- Traore, S., Aubry, L., Gatellier, P., Przybylski, W., Jaworska, D., Kajak-Siemaszko, K., Santé-Lhoutellier, V., 2012. Higher drip loss is associated with protein oxidation. *Meat Sci.* 90, 917–924.
- Tricon, S., Yaqoob, P., 2006. Conjugated linoleic acid and human health: A critical evaluation of the evidence. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9, 105–110.

- Trocino, A., Zomeño, C., Birolo, M., Di Martino, G., Stefani, A., Bonfanti, L., Bertotto, D., Gratta, F., Xiccato, G., 2018. Impact of pre-slaughter transport conditions on stress response, carcass traits, and meat quality in growing rabbits. *Meat Sci.* 146, 68–74.
- Troy, D.J., Kerry, J.P., 2010. Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Sci.* 86, 214–226.
- Tu, W.-L., Cheng, C.-Y., Chen, C.-J., Chan, H.-L., Wang, S.-H., Tang, P.-C., Chen, C.-F., Chen, H.-H., Lee, Y.-P., Chen, S.-E., Huang, S.-Y., 2018. Proteomic analysis of the hypothalamus of broiler-type Taiwan country chickens in response to acute heat stress. *Anim. Sci. J.* 89, 1475–1485.
- Van Ba, H., Ryu, K.S., Lan, N.T.K., Hwang, I., 2013. Influence of particular breed on meat quality parameters, sensory characteristics, and volatile components. *Food Sci. Biotechnol.* 22, 651–658.
- Van De Water, G., Verjans, F., Geers, R., 2003. The effect of short distance transport under commercial conditions on the physiology of slaughter calves; pH and colour profiles of veal. *Livest. Prod. Sci.* 82, 171–179.
- Van Elswyk, M.E., McNeill, S.H., 2014. Impact of grass/forage feeding versus grain finishing on beef nutrients and sensory quality: The U.S. experience. *Meat Sci.* 96, 535–540.
- Varela, A., Oliete, B., Moreno, T., Portela, C., Monserrat, L., Carballo, J.A., Sanchez, L., 2004. Effect of pasture finishing on the meat characteristics and intramuscular fatty acid profile of steers of the Rubia Gallega breed. *Meat Sci.* 67, 515–522.

- Vestergaard, M., Oksbjerg, N., Henckel, P., 2000. Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of *semitendinosus*, *longissimus dorsi* and *supraspinatus* muscles of young bulls. *Meat Sci.* 54, 177–185.
- Villarroel, M., María, G.A., Sañudo, C., Olleta, J.L., Gebresenbet, G., 2003. Effect of transport time and sensorial aspects of beef meat quality. *Meat Sci.* 63, 353–357.
- von Holleben, K., Henke, S., Schmidt, T., Al., E., 2003. Handling of slaughter cattle in pre and post transport situations including loading and unloading on journeys up to 8 hours in Germany. *DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschrift.* 110, 93–99.
- Wang, Z., He, F., Rao, W., Ni, N., Shen, Q., Zhang, D., 2016. Proteomic analysis of goat *Longissimus dorsi* muscles with different drip loss values related to meat quality traits. *Food Sci. Biotechnol.* 25, 425–431.
- Warner, R.D., 2017. The Eating Quality of Meat-IV Water-Holding Capacity and Juiciness, Lawrie's Meat Science: Eighth Edition. Elsevier Ltd.
- Warren, H.E., Scollan, N.D., Enser, M., Hughes, S.I., Richardson, R.I., Wood, J.D., 2008. Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition. *Meat Sci.* 78, 256–269.
- Warriss, P.D., 2000. Meat Science, An Introductory Text. CAB Int.
- Waters, S.M., Kelly, J.P., O'Boyle, P., Moloney, A.P., Kenny, D.A.,

2009. Effect of level and duration of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the transcriptional regulation of $\Delta 9$ -desaturase in muscle of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 87, 244–252.
- Webb, E.C., Casey, N.H., 2010. Physiological limits to growth and the related effects on meat quality. *Livest. Sci.* 130, 33–40.
- Webb, E.C., Erasmus, L.J., 2013. The effect of production system and management practices on the quality of meat products from ruminant livestock. *South African J. Anim. Sci.* 43, 413–423.
- Webb, E.C., O'Neill, H.A., 2008. The animal fat paradox and meat quality. *Meat Sci.* 80, 28–36.
- West, J.W., 2003. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 86, 2131–2144.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., 1996. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19–50.
- Williamson, C., Foster, R., Stanner, S., Buttriss, J., 2005. Red meat in the diet. *Nurs. Stand.* 30, 323–355.
- Wimmers, K., Murani, E., Te Pas, M.F.W., Chang, K.C., Davoli, R., Merks, J.W.M., Henne, H., Muraniova, M., Da Costa, N., Harlizius, B., Schellander, K., Böll, I., Braglia, S., De Wit, A.A.C., Cagnazzo, M., Fontanesi, L., Prins, D., Ponsuksili, S., 2007. Associations of functional candidate genes derived from gene-expression profiles of prenatal porcine muscle tissue with meat quality and muscle deposition. *Anim. Genet.* 38, 474–484.

- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M., 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* 78, 343–358.
- Wood, J.D., Enser, M., Richardson, R.I., Whittington, F.M., 2007. Fatty acids in meat and meat products. *Fat. Acids Foods their Heal. Implic.* Third Ed. 87–107.
- Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A. V, Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R., Enser, M., 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* 66, 21–32.
- Wood, Z., Schroder, E., Harris, J., Poole, L., 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.
- Wu, W., Fu, Y., Therkildsen, M., Li, X.M., Dai, R.T., 2015. Molecular Understanding of Meat Quality Through Application of Proteomics. *Food Rev. Int.* 31, 13–28.
- Xie, Y.R., Busboom, J.R., Cornforth, D.P., Shenton, H.T., Gaskins, C.T., Johnson, K.A., Reeves, J.J., Wright, R.W., Cronrath, J.D., 1996. Effects of time on feed and *post-mortem* aging on palatability and lipid composition of crossbred Wagyu beef. *Meat Sci.* 43, 157–166.
- Xing, T., Gao, F., Tume, R.K., Zhou, G., Xu, X., 2019. Stress Effects on Meat Quality: A Mechanistic Perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18, 380–401.
- Xing, T., Wang, C., Zhao, X., Dai, C., Zhou, G., Xu, X., 2017. Proteome analysis using isobaric tags for relative and absolute

- analysis quantitation (iTRAQ) reveals alterations in stress-induced dysfunctional chicken muscle. *J. Agric. Food Chem.* 65, 2913–2922.
- Xiong, Y.L., 2000. Protein oxidation and implications for muscle food quality. In: Decker, E., Faustman, C., Lopez-Bote, C. (Eds.), *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 85–111.
- Yancey, E.J., Dikeman, M.E., Hachmeister, K.A., Chambers IV, E., Milliken, G.A., 2005. Flavor characterization of top-blade, top-sirloin, and tenderloin steaks as affected by pH, maturity, and marbling. *J. Anim. Sci.* 83, 2618–2623.
- Yüksel, S., Yanar, M., Aksu, M.I., Kopuzlu, S., Kaban, G., Sezgin, E., Oz, F., 2012. Effects of different finishing systems on carcass traits, fatty acid composition, and beef quality characteristics of young Eastern Anatolian Red bulls. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 1521–1528.
- Zaboli, G., Huang, X., Feng, X., Ahn, D.U., 2018. How can heat stress affect chicken meat quality? – a review. *Poult. Sci.* 98.
- Zachut, M., Kra, G., Livshitz, L., Portnick, Y., Yakoby, S., Friedlander, G., Levin, Y., 2017. Seasonal heat stress affects adipose tissue proteome toward enrichment of the Nrf2-mediated oxidative stress response in late-pregnant dairy cows. *J. Proteomics* 158, 52–61.
- Zanetti, E., Masi, A., Pivato, M., Tolin, S., Trentin, A., Guler, C., Yalçın, S., Cassandro, M., 2013. A note on protein expression changes in chicken breast muscle in response to time in transit before slaughtering. *Proteome Sci.* 11, 1–10.

- Zhang, C., Luo, J., Yu, B., Zheng, P., Huang, Z., Mao, X., He, J., Yu, J., Chen, J., Chen, D., 2015. Dietary resveratrol supplementation improves meat quality of finishing pigs through changing muscle fiber characteristics and antioxidative status. *Meat Sci.* 102, 15–21.
- Zhang, M., Wang, D., Geng, Z., Bian, H., Liu, F., Zhu, Y., Xu, W., 2014. The level of heat shock protein 90 in pig *Longissimus dorsi* muscle and its relationship with meat pH and quality. *Food Chem.* 165, 337–341.
- Zhang, W., Xiao, S., Ahn, D.U., 2013. Protein Oxidation: Basic Principles and Implications for Meat Quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 1191–1201.
- Zhang, X., Owens, C.M., Schilling, M.W., 2017. Meat: the edible flesh from mammals only or does it include poultry, fish, and seafood? *Anim. Front.* 7, 12–18.
- Zhou, G.H., Zhao, G.M., 2007. Biochemical changes during processing of traditional Jinhua ham. *Meat Sci.* 77, 114–120.
- Zimerman, M., Domingo, E., Grigioni, G., Taddeo, H., Willems, P., 2013. The effect of pre-slaughter stressors on physiological indicators and meat quality traits on Merino lambs. *Small Rumin. Res.* 111, 6–9.



ANEXOS



10 ANEXOS

Anexo I. Volumen medio (\pm SE) y CI al 95% para spots de 2-DE con diferencias estadísticamente significativas entre muestras de carne bovino del músculo *longissimus thoracis* de Asturiana de los Valles (AV), Retinta (RE) y Rubia Gallega (RG). Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a).

Spot code ^a	AV		RE		RG		P-value ^d		
	Volume ^b	95 % bootstrap CI (CL, CU) ^c	Volume ^b	95 % bootstrap CI (CL, CU) ^c	Volume ^b	95 % bootstrap CI (CL, CU) ^c	AV-RE	AV-RG	RE-RG
1	188 \pm 47	69, 320	188 \pm 13	152, 222	-	-	ns	< 0.05	< 0.05
2	354 \pm 56	206, 499	412 \pm 30	329, 499	208 \pm 23	145, 279	ns	ns	< 0.05
3	262 \pm 27	197, 342	-	-	278 \pm 82	48, 482	< 0.05	ns	< 0.05
4	-	-	343 \pm 67	203, 564	-	-	< 0.05	N/A	< 0.05
5	759 \pm 223	191, 1426	-	-	-	-	< 0.05	< 0.05	N/A
6	-	-	181 \pm 14	155, 227	-	-	< 0.05	N/A	< 0.05
7	343 \pm 17	296, 388	247 \pm 19	199, 295	229 \pm 35	146, 328	< 0.05	ns	ns
8	430	262, 568	340 \pm 51	224, 511	-	-	ns	< 0.05	< 0.05
9	1099 \pm 369	183, 2111	1645 \pm 527	463, 3357	-	-	ns	< 0.05	< 0.05
10	920 \pm 90	703, 1123	661 \pm 53	549, 824	464 \pm 99	227, 707	ns	< 0.05	ns
11	497 \pm 60	353, 684	-	-	284 \pm 43	188, 421	< 0.05	ns	< 0.05
12	1041 \pm 95	812, 1294	675 \pm 49	578, 809	449 \pm 86	226, 661	< 0.05	< 0.05	ns
13	390 \pm 37	285, 493	679 \pm 113	455, 989	-	-	ns	< 0.05	< 0.05
14	-	-	315 \pm 51	162, 447	-	-	< 0.05	N/A	< 0.05
15	-	-	542 \pm 96	208, 768	484 \pm 60	308, 629	< 0.05	< 0.05	ns
16	420 \pm 68	252, 602	1004 \pm 137	633, 1411	646 \pm 96	369, 881	< 0.05	ns	ns
17	1839 \pm 115	1586, 2243	1521 \pm 153	1059, 1917	1120 \pm 133	813, 1464	ns	< 0.05	ns
18	573 \pm 89	399, 873	286 \pm 23	218, 344	386 \pm 41	295, 513	< 0.05	ns	ns

Spot code ^a	AV		RE		RG		P-value ^d		
	Volume ^b	95 % bootstrap CI (CL, CU) ^c	Volume ^b	95 % bootstrap CI (CL, CU) ^c	Volume ^b	95 % bootstrap CI (CL, CU) ^c	AV-RE	AV-RG	RE-RG
19	155 ± 18	104, 208	-	-	-	-	< 0.05	< 0.05	N/A
20	855 ± 186	359, 1337	-	-	-	-	< 0.05	< 0.05	N/A
21	613 ± 54	440, 733	-	-	491 ± 131	134, 834	< 0.05	ns	< 0.05
22	633 ± 106	335, 901	473 ± 25	383, 518	-	-	ns	< 0.05	< 0.05
23	2805 ± 117	2495, 3189	1769 ± 330	1067, 2717	1316 ± 206	773, 1936	ns	< 0.05	ns
24	-	-	819 ± 215	419, 1361	-	-	< 0.05	N/A	< 0.05
25	1859 ± 213	1134, 2361	3111 ± 296	2448, 3980	2115 ± 297	1246, 2871	< 0.05	ns	ns
26	-	-	259 ± 55	67, 370	-	-	< 0.05	N/A	< 0.05
27	524 ± 46	417, 664	321 ± 35	227, 406	420 ± 29	359, 529	< 0.05	ns	ns
28	201 ± 12	165, 232	-	-	-	-	< 0.05	< 0.05	N/A
29	10643 ± 2720	3337, 18142	30974 ± 3253	21885, 38915	112258 ± 2516	6497, 19628	< 0.05	ns	< 0.05
30	18414 ± 3337	8176, 25263	14254 ± 1129	10849, 16897	20273 ± 725	18058, 22047	ns	ns	< 0.05
31	17907 ± 6060	4013, 35511	1561 ± 152	1138, 1946	111622 ± 3115	3655, 19059	< 0.05	ns	< 0.05
32	941 ± 53	784, 1057	804 ± 83	595, 1016	547 ± 95	256, 675	ns	< 0.05	ns
33	815 ± 38	717, 921	153 ± 57	20, 324	423 ± 88	151, 610	< 0.05	< 0.05	ns
34	1809 ± 151	1470, 2240	691 ± 146	211, 1020	283 ± 108	24, 551	< 0.05	< 0.05	ns
35	267 ± 75	69, 493	-	-	-	-	< 0.05	< 0.05	N/A
36	1023 ± 119	638, 1293	-	-	227 ± 101	28, 581	< 0.05	< 0.05	< 0.05
37	637 ± 72	472, 854	486 ± 84	265, 734	322 ± 51	158, 414	ns	< 0.05	ns

^a Gel position of marked spots is shown in Fig. 14.

^b Mean volumes from six biological replicates.

^c CI, Confidence interval; CL, lower bound; CU, upper bound; 95% bootstrap CIs were obtained by the bias-corrected percentile method and adjusted by the Bonferroni method for multiple comparisons.

^d P-value < 0.05: statistically significant difference in mean volume between Spanish bovine breeds; ns: not statistically significant difference (P > 0.05); N/A: not applicable.

Anexo II. Fold change (FC) y relative change (RC) de proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) entre las muestras de carne bovino del músculo LT de Asturiana de los Valles (AV), Retinta (RE) y Rubia Gallega (RG).

Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020^a).

Spot code ^a	Protein name (Abbrev.)	AV-RE		AV-RG		RE-RG	
		FC	RC	FC	RC	FC	RC
1	Myosin binding protein H (MYBPH)	ns	ns	-∞	-0.009	-∞	-0.009
3	Myosin binding protein H (MYBPH-1)	-∞	-0.013	ns	ns	+∞	+0.014
9	Creatine kinase M-type (CKM)	ns	ns	-∞	-0.054	-∞	-0.081
11	Thioredoxin-dependent peroxide reductase (PRDX3), 239psilon239rial precursor	-∞	-0.024	ns	ns	+∞	+0.014
12	Actin Alpha 1 skeletal muscle (ACTA1)	-1.54	-0.018	-	-0.029	ns	ns
13	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHB)	ns	ns	-∞	-0.019	-∞	-0.033
16	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHB-1)	+2.39	+0.029	ns	ns	ns	ns
17	Troponin T, slow skeletal muscle (TNNT1)	ns	ns	-	-0.035	ns	ns
18	Actin, 239psil skeletal muscle (ACTA1-1)	-2.00	-0.014	1.64	ns	ns	ns
19	Ankyrin-2 (ANK2)	+∞	-0.008	-∞	-0.008	N/A	N/A

Spot code ^a	Protein name (Abbrev.)	AV-RE		AV-RG		RE-RG	
		FC	RC	FC	RC	FC	RC
21	14-3-3 protein 240pilon (YWHAE)	-∞	-0.030	ns	ns	+∞	+0.024
22	Cyclin-G1 (CCNG1)	ns	ns	-∞	-0.031	-∞	-0.023
25	Myosin, light chain 6B, smooth muscle and non-muscle (MYL6B)	+1.67	+0.062	ns	ns	ns	ns
26	Thioredoxin-dependent peroxide reductase (PRDX3-1)	+∞	+0.013	N/A	N/A	-∞	-0.013
27	Transmembrane protein 233 (TMEM233)	-1.63	-0.010	ns	ns	ns	ns
29	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MYL6B)	+2.91	+1.000	ns	ns	-2.53	-0.921
30	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MYL6B-1)	ns	ns	ns	ns	+1.42	+0.296
31	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MYL6B-2)	-11.47	-0.804	ns	ns	+7.45	+0.495

^a Gel position of marked spots is shown in Fig 14.
 Ns: not statistically significant difference ($P > 0.05$).
 N/A: not applicable.

Anexo III. Identificadores y términos (componente, función y procesos) de Ontología Génica (GO) para proteínas diferencialmente abundantes en las carnes de LT de las razas Asturiana de los Valles, Retinta y Rubia Gallega obtenidas por la herramienta *QuickGo*. Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a).

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensembl gene accession number	GO Identifier and GO term name
Myosin binding protein H	MYBPH	G3X6W9	ENSBTAG00000011465	<p>Component: GO:0005859 (muscle myosin complex), GO:0030018 (Z disc), GO:0031430 (M band)</p> <p>Function: GO:0008307 (structural constituent of muscle), GO:0051015 (actin filament binding), GO:0051371 (muscle alpha-actinin binding), GO:0097493 (structural molecule activity conferring elasticity)</p> <p>Process: GO:0006941 (striated muscle contraction), GO:0007015 (actin filament organization), GO:0045214 (sarcomere organization), GO:0071688 (striated muscle myosin thick filament assembly)</p>
Creatine kinase M-type	CKM	Q9XSC6	ENSBTAG00000013921	<p>Component: GO:0005615 (extracellular space), GO:0005737 (cytoplasm)</p> <p>Function: GO:0000166 (nucleotide binding), GO:0003824 (catalytic activity), GO:0004111 (creatine kinase activity), GO:0005524 (ATP binding), GO:0016301 (kinase activity), GO:0016740 (transferase activity), GO:0016772 (transferase activity, transferring phosphorus-containing groups)</p>

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensembl gene accession number	GO Identifier and GO term name
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	PRDX3	P35705	ENSBTAG00000008731	<p>Process: GO:0009408 (response to heat), GO:0016310 (phosphorylation), GO:0046314 (phosphocreatine biosynthetic process)</p> <p>Component: GO:0005737 (cytoplasm), GO:0005739 (mitochondrion), GO:0005759 (mitochondrial matrix), GO:0005768 (endosome), GO:0005769 (early endosome), GO:0005829 (cytosol), GO:0008385 (IκB kinase complex), GO:0043209 (myelin sheath), GO:0043234 (protein complex).</p> <p>Function: GO:0004601 (peroxidase activity), GO:0008022 (protein C-terminus binding), GO:0008379 (thioredoxin peroxidase activity), GO:0016209 (antioxidant activity), GO:0016491 (oxidoreductase activity), GO:0019900 (kinase binding), GO:0042802 (identical protein binding), GO:0043027 (cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process), GO:0051920 (peroxiredoxin activity)</p> <p>Process: GO:0001893 (maternal placenta development), GO:0006915 (apoptotic process), GO:0006979 (response to oxidative stress), GO:0007005 (mitochondrion organization), GO:0008284 (positive regulation of cell proliferation), GO:0018171 (peptidyl-cysteine oxidation), GO:0030099 (myeloid cell differentiation), GO:0032496 (response to lipopolysaccharide), GO:0033673 (negative regulation of kinase activity), GO:0034599 (cellular response to oxidative stress), GO:0042542 (response to hydrogen peroxide), GO:0042744</p>

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensembl gene accession number	GO Identifier and GO term name
				(hydrogen peroxide catabolic process), GO:0043066 (negative regulation of apoptotic process), GO:0043154 (negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process), GO:0045454 (cell redox homeostasis), GO:0051092 (positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity), GO:0051881 (regulation of mitochondrial membrane potential), GO:0055114 (oxidation-reduction process), GO:0098869 (cellular oxidant detoxification)
Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	P68138	ENSBTAG00000046332	Component: GO:0001725 (stress fiber), GO:0005737 (cytoplasm), GO:0005856 (cytoskeleton), GO:0005865 (striated muscle thin filament), GO:0005884 (actin filament), GO:0015629 (actin cytoskeleton), GO:0030017 (sarcomere), GO:0030027 (lamellipodium), GO:0030175 (filopodium), GO:0044297 (cell body) Function: GO:0000166 (nucleotide binding), GO:0005524 (ATP binding) Process: GO:0010628 (positive regulation of gene expression), GO:0030240 (skeletal muscle thin filament assembly), GO:0048741 (skeletal muscle fiber development), GO:0090131 (mesenchyme migration)
Pyruvate dehydrogenase E1 component	PDHB	P11966	ENSBTAG00000021724	Component: GO:0005654 (nucleoplasm), GO:0005739 (mitochondrion), GO:0005759 (mitochondrial matrix), GO:0045254 (pyruvate dehydrogenase complex)

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensembl gene accession number	GO Identifier and GO term name
subunit beta mitochondrial				<p>Function: GO:0003824 (catalytic activity), GO:0004738 (pyruvate dehydrogenase activity), GO:0004739 (pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity), GO:0016491 (oxidoreductase activity), GO:0034604 (pyruvate dehydrogenase (NAD+) activity)</p> <p>Process: GO:0005975 (carbohydrate metabolic process), GO:0006006 (glucose metabolic process), GO:0006086 (acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate), GO:0006099 (tricarboxylic acid cycle), GO:0008152 (metabolic process), GO:0055114 (oxidation-reduction process)</p>
Troponin T, slow skeletal muscle	TNNT1	Q8MKH6	ENSBTAG00000006419	<p>Component: GO:0005861 (troponin complex)</p> <p>Function: GO:0005523 (tropomyosin binding)</p> <p>Process: GO:0003009 (skeletal muscle contraction), GO:0006937 (regulation of muscle contraction), GO:0014883 (transition between fast and slow fiber), GO:0045932 (negative regulation of muscle contraction)</p>
Ankyrin-2	ANK2	G3N0C1	ENSBTAG00000002392	<p>Component: GO:0043034 (costamere)</p> <p>Function: GO:0030507 (spectrin binding)</p> <p>Process: GO:0007165 (signal transduction), GO:0098910 (regulation of atrial cardiac muscle cell action potential)</p>

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensembl gene accession number	GO Identifier and GO term name
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	P62261	ENSBTAG00000005664	<p>Component: GO:0005634 (nucleus), GO:0005737 (cytoplasm), GO:0005739 (mitochondrion), GO:0005886 (plasma membrane), GO:0042470 (melanosome)</p> <p>Function: GO:0005246 (calcium channel regulator activity), GO:0015459 (potassium channel regulator activity), GO:0019899 (enzyme binding), GO:0019904 (protein domain specific binding), GO:0031625 (ubiquitin protein ligase binding); GO:0042802 (identical protein binding); GO:0042826 (histone deacetylase binding), GO:0044325 (ion channel binding), GO:0045296 (cadherin binding), GO:0046982 (protein heterodimerization activity), GO:0050815 (phosphoserine residue binding), GO:0051219 (phosphoprotein binding), GO:0097110 (scaffold protein binding)</p> <p>Process: GO:0000165 (MAPK cascade), GO:0001764 (neuron migration), GO:0006605 (protein targeting), GO:0021766 (hippocampus development), GO:0021987 (cerebral cortex development), GO:0034605 (cellular response to heat), GO:0035308 (negative regulation of protein dephosphorylation), GO:0046827 (positive regulation of protein export from nucleus), GO:0051480 (regulation of cytosolic calcium ion concentration), GO:0060306 (regulation of membrane repolarization), GO:1901016 (regulation of potassium ion transmembrane transporter activity), GO:1901020 (negative regulation of calcium ion transmembrane transporter activity), GO:1902309 (negative regulation of peptidyl-serine dephosphorylation),</p>

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensembl gene accession number	GO Identifier and GO term name
Cyclin-G1	CCNG1	Q5E911	ENSBTAG0000006607	GO:1905913 (negative regulation of calcium ion export across plasma membrane) Function: GO:0005634 (nucleus) Process: GO:0007049 (cell cycle), GO:0051301 (cell division), GO:0051726 (regulation of cell cycle)
Myosin, light chain 6B, smooth, alkali, muscle and non-muscle	MYL6B	Q148H2	ENSBTAG00000031217	Function: GO:0005509 (calcium ion binding)
Transmembrane protein 233	TMEM223	A5PJW2	ENSBTAG00000009487	Component: GO:0005739 (mitochondrion), GO:0016020 (membrane), GO:0016021 (integral component of membrane) Process: GO:0007399 (nervous system development)
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	MYLPF	Q0P571	ENSBTAG00000021218	Component: GO:0016459 (myosin complex) Function: GO:0005509 (calcium ion binding), GO:0008307 (structural constituent of muscle), (metal ion binding) Process: GO:0007519 (skeletal muscle tissue development)

Anexo IV: Estimaciones de las distancias proteómicas cualitativas y cuantitativas entre las razas bovinas Asturiana de los Valles (AV), Retinta (RE) y Rubia Gallega (RG) de las carnes del músculo LT. Fuente: Rodríguez-Vázquez *et al.* (2020a)

Distance measure	AV-RE ^a	AV-RG ^a	RE-RG ^a
Nei & Li's <i>D</i>	0.057 (0.029, 0.102)	0.042 (0.019, 0.084)	0.055 (0.027, 0.097)
Jaccard's <i>D</i>	0.107 (0.057, 0.186)	0.081 (0.037, 0.156)	0.104 (0.052, 0.178)
<i>QD</i>	0.0145 (0.0020, 0.0383)	0.0014 (0.0007, 0.0019)	0.0142 (0.0023, 0.0340)

^a 95% bootstrap CI are shown in parentheses.



Anexo V. Trabajos publicados o aceptados

Publicación N°1: Artículo original.

***“Influence of production system and finishing feeding on meat quality of
Rubia Gallega calves”***

<https://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/16438>





Publicación N°2: Artículo original.

“Sensory and physicochemical analysis of meat from bovine breeds in different livestock production systems, pre-slaughter handling conditions, and ageing time”

<https://www.mdpi.com/2304-8158/9/2/176>





Publicación N°3: Artículo original.

“Measuring quantitative proteomic distance between Spanish beef breeds”

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620301424>





Publicación N° 4: Artículo original.

“Proteomic application in predicting food quality relating to animal welfare. A review”

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224419311471>





Anexo VI Criterio de calidad de los artículos donde los resultados de la presente tesis han sido publicados.

Publicación N°1

“Influence of production system and finishing feeding on meat quality of Rubia Gallega calves”

Rodríguez-Vázquez, R¹.; Pateiro, M².; López-Pedrouso, M¹.; Gende, A³.; Crecente, S⁴.; Serrano, M.P⁵.; González, J³.; Lorenzo, J.M².; Zapata, C¹.; Franco, D². (2020)

¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, 15872 Santiago de Compostela, España; ²Centro Tecnológico de la Carne de Galicia. Rúa Galicia nº 4, Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, Ourense, España; ³Indicación Geográfica Protegida Ternera Gallega, Recinto Ferial de Amio, 15891, Santiago de Compostela, España; ⁴Instituto Gallego de la Calidad Agroalimentaria, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, 15318 La Coruña, España; ⁵Universidad de Castilla-La Mancha; Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Albacete sección de CSIC-UCLM-JCCM. Campus Universitario, 02071 Albacete, España

Spanish Journal of Agricultural Research 18, e0606. Editorial: INIA, eISSN: 2171-9292, ISSN: 1695-971X

DOI: 10.5424/sjar/2020183-16438

I) **Factor de Impacto de la revista *Spanish Journal of Agricultural Research* (ISI Journal Citation Reports, 2019): 1,037**

Posición relativa de *Spanish Journal of Agricultural Research* dentro de cada categoría (ISI Journal Citation Reports, 2019):

Agricultura, multidisciplinar (28/58) (Q2)

II) **Contribución de Rodríguez-Vázquez R.:** Redacción del artículo.

III) **Revista open access:** <https://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/16438>

Publicación N°2

“Sensory and physicochemical analysis of meat from bovine breeds in different livestock production systems, pre-slaughter handling conditions, and ageing time”

López-Pedrouso, M¹.; Rodríguez-Vázquez, R¹.; Purriños, L².; Oliván, M^{3,4}.; García-Torres, S⁵.; Sentandreu, M. A⁶.; Lorenzo, J.M².; Zapata, C¹.; Franco, D². (2020)

¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, 15872 Santiago de Compostela, España; ² Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N° 4, Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, España. ³ Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Apdo. 13, 33300 Villaviciosa, España; ⁴ ISPA, Avda Roma s/n, 33011 Oviedo, España; ⁵ CICYTEX (Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura), Junta de Extremadura. Ctra. A-V, Km372, 06187 Guadajira, España; ⁶Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenida Agustín Escardino, 7, Paterna, 46980 Valencia, España.

Foods 9, 176. Editorial:MDPI. ISSN 2304-8158

DOI: 10.3390/foods9020176

- I) **Factor de Impacto de la revista *Foods*** (ISI Journal Citation Reports, 2019): **4,092**
Posición relativa de *Foods* dentro de cada categoría (ISI Journal Citation Reports, 2019)
Ciencia de la alimentación & Tecnología (**27/139**) (**Q1**)
- II) **Contribución de Rodríguez-Vázquez R.**: Manejo y análisis de los datos. Interpretación de los datos, revisión y edición del manuscrito.
- III) **Revista open access:** <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/2/176>

Publicación N°3

“Measuring quantitative proteomic distance between Spanish beef breeds”

Rodríguez-Vázquez, R¹.; Mato, A¹.; López-Pedrouso, M¹.; Franco, D². Sentandreu, M. A³.; Zapata, C¹.; (2020)

¹ Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, 15872, Santiago de Compostela, España; ² Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N° 4, Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, España. ³ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenida Agustín Escardino, 7, Paterna, 46980 Valencia, España.

Food Chemistry 315, 126293. Editorial: Elsevier ISSN 0308-8146, Eissn: 1873-7072.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126293

I) **Factor de Impacto de la revista *Food Chemistry*** (ISI Journal Citation Reports, 2019): **6,306**

Posición relativa de *Food Chemistry* dentro de cada categoría (ISI Journal Citation Reports, 2019)

Química, aplicada (5/71) (Q1)

Ciencia de la alimentación & Tecnología (6/139) (Q1)

Nutrición & Dietética (10/89) (Q1)

II) **Contribución de Rodríguez-Vázquez R.:** Metodología, manejo de datos; análisis formal; Redacción del borrador original

III) **Autorización de revista para el uso de la publicación en la Tesis Doctoral (Editorial Elsevier):**

<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions> (Accedido el 27/11/20).

Artículo original:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620301424>

“Proteomic application in predicting food quality relating to animal welfare. A review”

Mouzo, D¹.; Rodríguez-Vázquez, R¹.; Lorenzo, J.M².; Franco, D². Zapata, C¹.; López-Pedrouso, M¹. (2020)

¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, 15872 Santiago de Compostela, España; ² Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N° 4, Parque Tecnológico de Galicia, 32900 San Cibrao das Viñas, España.

Trends in Food Science & Technology 99, 520-530. Editorial: Elsevier; ISSN 0924-2244

DOI: 10.1016/j.tifs.2020.03.029

I) **Factor de Impacto de la revista *Trends in Food Science & Technology* (ISI Journal Citation Reports, 2019): 11,077**

Posición relativa de *Trends in Food Science & Technology* dentro de cada categoría (ISI Journal Citation Reports, 2019)

Ciencia de la alimentación & Tecnología (1/139) (Q1)

II) **Contribución de Rodríguez-Vázquez R.: Análisis formal**

III) **Autorización de revista para el uso de la publicación en la Tesis Doctoral (Editorial Elsevier):**

<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions> (Accedido el 27/11/20).

Artículo original:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224419311471>

