

# Behi-haragiaren samurtasuna aztergai: estrategia proteomiko berri baten garapena

(Tenderness analysis in bovine meat: a novel proteomic approach)

Lorea R. Beldarrain<sup>1,2\*</sup>, Noelia Aldai<sup>1</sup>, Miguel Angel Sentandreu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Lactiker Ikerketa Taldea - Animalia Jatorriko Elikagaien Kalitatea eta Segurtasuna  
Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Gasteiz

<sup>2</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Valencia

\* lorea.rivera@ehu.eus; loretx\_@hotmail.com

DOI: 10.1387/ekaia.19096

Jasoa: 2018-01-31

Onartua: 2018-04-13

**Laburpena:** Samurtasuna behi-haragiaren kalitatean eragiten duen ezaugarri garrantzitsua da, kontsumitzaileak produktua aukeratzeko orduan gehien balioesten duenen artean dagoena. Hori dela eta, muskulua haragi bihurtu bitarteko prozesu biokimikoaren azterketak berebiziko garrantzia dauka. Izan ere, ontze-prozesu honetan garatzen da neurri handi batean amaierako produktuaren samurtasuna.

Prozesu honetan proteinek daukaten garrantzizko papera laburbilduko da artikulu honetan, bai eta teknika proteomikoek haragiaren kalitatea aztertze eta optimizatzeko eskaintzen dituzten aukerak ere, haragi-industriari begira probetxuzkoak izan daitezkeenak. Zentzu honetan, gure taldeak garatutako estrategia proteomiko berria aurkeztuko da, isoelektrofokatzeko likidoa (OFFGEL) eta elektroforesia oinarri dituenak. Maine Anjou behi arrazako animalien haragian burututako esperimentuan samurtasunaren adierazgarri diren 7 banda identifikatu eta neurtu dira, muskuluaren proteoma ikertzeko metodologia berritzaile honen potentziala agerian utziz.

**Hitz gakoak:** behi-haragia, haragiaren samurtasuna, proteomika, isoelektrofokatzeko likidoa, OFFGEL.

**Abstract:** Tenderness is an important organoleptic trait that determines bovine meat quality and consumer satisfaction. Therefore, it is essential to understand the biochemical processes taking place in the conversion of muscle into meat. In fact, this ageing process is determinant for the tenderness of the final product.

This article will summarize the decisive role of proteins in the ageing process, and the opportunities that proteomic techniques provide in order to analyze and pre-

dict meat tenderness, which is profitable for beef industry. In this sense, a recently developed approach will be introduced, which is based on liquid isoelectric focusing (OFFGEL) and electrophoresis. Seven bands capable to discriminate between tender and tough samples were identified and measured in a study performed on beef from Maine Anjou bovine breed. Therefore, this methodology constitutes a promising alternative for the study of muscle proteome.

**Keywords:** bovine meat, meat tenderness, proteomics, liquid isoelectric focusing, OFFGEL.

## 1. SARRERA

Samurtasuna behi-haragian gehien balioesten den ezaugarri organoleptikoen artean dago, urtsutasunarekin, zaporearekin eta kolorearekin batera. Izan ere, samurtasun ezegokia kontsumitzaileak produktua berriz ez erosteko arrazoi nagusietakoa da [1]. Produktuaren ezaugarri hau, samurtasuna, hainbat faktoreren menpe dago; *pre mortem* direnen artean, animaliairen arraza, sexua, adina, ekoizpen-sistema edota animaliairen elikadura eta ehunaren ezaugarriak, besteak beste [2]. Muskulu-zuntzak inguratzen dituen ehun konektiboak adibidez, oinarritzko gogortasun-maila bat eragiten du haragian. Ehun hau osatzen duten kolageno-proteina zuntzen kopuruaren eta gurutzapenaren arabera izango da maila hau, eta animaliairen ezaugarrien arabera aldatuko da [3].

Horretaz gain, beste zenbait *ante* eta *post mortem* faktoreen zerikusia ere deskribatu da: hiltegi bitarteko baldintzek animaliaengan sor dezaketen estresa, hiltzeko modua, edo baldintza higienikoetan lan egin ezean mikroorganismoen eragina, besteak beste [4, 5]. Honen eraginez eta merkatan bistaratzen denaren arabera, samurtasuna oso ezaugarri aldakorra eta kontrolatzen zaila dela esan daiteke.

Hiltzearen ostean gertatzen den ontze-prozesua da azken produktuaren samurtasunean eraginik handiena duena. Ontze-prozesu honetan produktuaren kalitatean erabakigarriak izango diren aldaketa biokimiko konplexuak gertatzen dira giharretan eta aurretik aipatutako faktoreen eraginpean daude [6]. Aldaketa hauen artean gehienak giharretako zuntzak osatzen dituzten proteinen degradazioarekin erlazionatuta daude [7]. Hori dela eta, samurtasunaren aldakortasuna azaldu ahal izateko, proteomikan oinarritutako ikerketen kopuruak gora egin du azken urte hauetan.

Alde batetik, amaierako produktuan haragiaren samurtasuna neurtzeko teknika estandarrak garatu dira, Warner Bratzler mozketak-indarraren neurketa, adibidez. Bestalde, hiltzea eta berehala, kalitatea aurreratu duten adierazle biologikoak ezagutu, animalia bakoitza bere ezaugarri potentzialen arabera erabilpen egoki batean baliozta daiteke [8]. Hori dela eta, ontze-

prozesuaren ezaugarritze biokimiko sakona mesedegarria da haragi-industriaren hobekuntzarako. Gainera, kalitate desberdineko haragietan proteinen espresioa neurtzeak prozesua bera ulertzeko gakoak eskaintzen ditu.

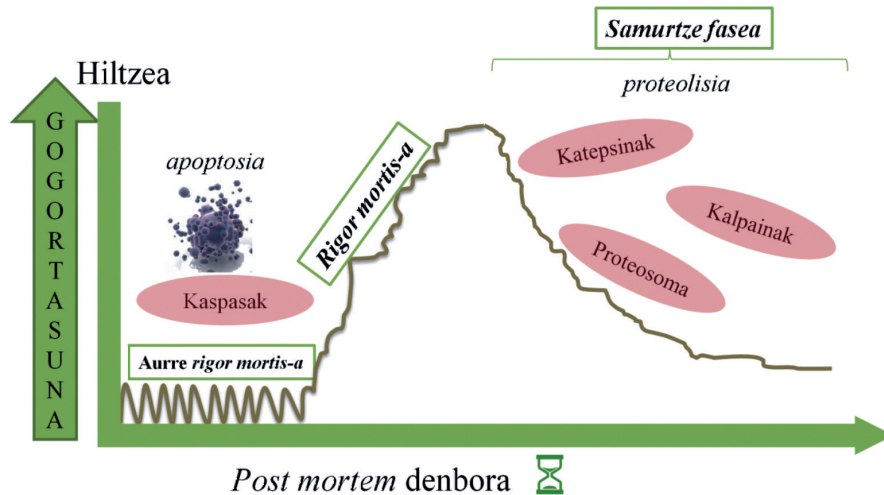
## 2. HARAGIAREN SAMURTASUNAREN IKERKETA OINARRIAK

### 2.1. Haragiaren samurtasunaren garapena eta proteinen degradazioa

Samurtasunaren garapena aztertzeo, ezinbestekoa da muskulu ildasatuaren zelulen egitura ulertzea. Zelula hauek uzkurdu-prozesuaren makineria diren miozuntzez osatuta daude, eta hauek proteinaz osaturiko sarkomero izeneko unitate errepikakorrez eratuta daude. Proteinak antolaketa-maila altuko sarean kokatzen dira miozuntzetako proteina frakzioa osatuz. Aktina eta miosina dira frakzio honen osagai nagusiak, eta hurrenez hurren harizpi lodi eta meheak eratzen dituzte. Uzkurdu zikloaren oinarria aktinaren eta miosinaren arteko lotura sortu eta desegitea da. Gainera, aipatutako bi hauek gain, muskuluaren egiturari eta uzkurdu garrantzizkoak diren beste proteina askok osatzen dute sarea: troponina konplexua, tropomiosina, miozenina eta titina, besteak beste [9].

Hiltzearen osteko prozesua **1. irudian** erakusten da; han, hiltze momentuan hasi eta muskulua haragi bihurtzen den arteko pausuak irudikatu dira. Hasierako fase batean, aurre *rigor mortis*-ean, muskulua kitzikakortasunari eusten dio eta uzkurdu zikloa betetzeko gai da. Izan ere, oxigenoa hartzea eta bizi funtzioak eten diren arren, ATP-a eta oxigeno hondarrak geratzen dira animalian. ATP erreserbak agortzean, ordea, metabolismo aerobikotik glikolisi anaerobikora aldatu eta *rigor mortis* fasea hasten da. Momentu honetan, glikolisi anaerobikoak uzkurdu zikloarekin jarraitzeko ATP nahikorik ez du ekoizten eta aktina-miosina loturak itzulezin bihurtzen hasten dira. Prozesu honen eraginez gogortasuna ere handitu egiten da eta *rigor mortis* etapa honen amaieran lortzen dira gogortasun baliarik altuenak [10].

*Rigor mortis* etaparen ondoren, muskulua samurtzen hasten da proteolisi prozesuaren eraginez (**1. irudia**). Prozesu hau proteinen degradazio edo oxidazioan oinarritzen da eta funtzionamenduari dagokionez guztiz argitu gabe egon arren, jakina da izaera entzimatikoa duela. Esan bezala, miozuntzetako frakzioa osatzen duten egitura-proteinak dira neurri handi batean degradazioa jasango dutenak, baina muskuluaren egiturari parte hartzen ez duten proteinek ere jasango dituzte aldaketak. Proteolisiaren eragileei dagokionez ikuspegi desberdinak daude; alde batetik, ohiko kalpainak eta katepsinak aztertu dira eragile proteolitiko moduan, eta beste alde batetik, ikerketa modernoagoetan proteasoma gehitu da eragile gisa eta kaspasen eragina ere baieztatu da apoptosia deitzen den hiltzearen osteko hasierako fasean [11, 12].



**1. irudia.** Hiltzearen ostean samurtasunak denboran duen bilakaeraren errepresentazio eskematikoa [8].

Teknika proteomikoen bitartez egindako ikerketen helburuetako bat proteolisi fase honen ezaugarriatzea da. Honetarako izaera desberdineko animalia eta muskuletan proteinen degradazioa (zeintzuk eta zer mailatan pairatzen duten) aztertzen da. Modu horretan, samurtasunaren adierazle diren proteinak identifika daitezke.

## 2.2. Proteomikaren aplikazioa haragiaren kalitatean

Proteoma terminoak momentu konkretu batean zelula edota ehun jakin batean espresatutako proteina guztiei egiten die erreferentzia. Hortaz, genomaren eta ezaugarri funtzionalen arteko lokarria dela esan daiteke. Genomaren edukia funtzio fisiologikoak betetzen dituzten sistemen informazio erabilgarrian itzultzea da helburua. Informazio horrek hipotesi biologikoak eraikitzeko aukera ematen du. Genoma animaliaien bizitzan zehar konstante mantentzen bada ere, proteoma aldakorra da eta inguruko faktoreen menpe dago [13]. Zentzu batean, proteomaren azterketa etengabe aldatzen ari den sistema bati ateratako argazki batekin alderatu daiteke.

Muskuluen konposizioak eta proteinek samurtze prozesuan duten paper garrantzitsua kontuan izanda, agerikoa da proteomikak haragiaren ikerkuntzan duen potentziala. Azken 40 urteetan, proteoma ulertzeko tresna eraginkor hauek erabiliaz egindako lanak ugaritu egin dira, eta, aldi berera, metodoak hobetu egin dira aurrerapen teknologikoen eraginez. Ikerketa hauetan, oro har, haragiaren kalitatearekin zerikusia duten proteinetan gertatzen diren aldaketak identifikatu eta azaltzen dira, eta etorkizunean lagungarria izango den jakintza sortzen dute [14].

Proteomika konparatiboan animalia, tratamendu, edo muskulu desberdinen proteomak alderatzen dira. Honela, ezaugarri bati (haragi samurrari, adibidez) loturiko proteina bereizgarriak zeintzuk diren bilatzea da helburua, hau da, proteina biomarkatzaileak zeintzuk diren. Haragiaren ekoizte edo prozesatze-metodoak hobetzen laguntzeaz gain haragiaren kalitatea aurreikustea da molekula biomarkatzaileen xedea.

Proteoma karakterizatu ahal izateko, beharrezkoa da giharreko proteinak frakzionatzea. Gaur egungo teknikak aldi berean proteina ugari analizatzeko gaitasuna daukate. Hala ere, muskuluaren proteoma osoaren konplexutasuna txikitzeko eta banaketa hobetzeko interesekoa den proteina frakzioa erazten da gihar-zuntzetatik: miozuntz frakzioa (egitura-proteinez osatua) edo frakzio sarkoplasmikoa (proteina metabolikoz osatua). Ondoren, dimentsio bakarreko (1-DE) edo biko (2-DE) gel elektroforesia erabili ohi da frakzio bakoitzeko proteinak banatzeko. 2-DE izan da azken urteetako teknikarik erabiliena, non proteinak immobilizatutako pH gradiente (IPG) tira batean fokatzen baitira puntu isoelektrikoaren (pI) arabera lehen dimentsioan. Horretaz gain, perpendikularki poliakrilamidazko gelean egindako elektroforesi (SDS-PAGE) bidez banatzen dira bakoitzaren pisu molekularren (Mw) arabera, bi dimentsioko banaketa lortuz. Proteinak ikusarazteko lortutako gelak tindatze-teknika desberdinen bidez errebelatzen dira eta azkenik proteinen identifikazioa burutzen da. Honetarako teknika ohikoena masa espektrometria (MS) oinarritutakoak dira [14]. 2-DE-n oinarritutako estrategien garapenari esker proteomaren ezaugarritzea izugarri aurreratu da. Aurreko metodo biokimikoekin alderatuz, zeintzuetan proteina bakarraren analisia burutzen baita, aldibereko 500-2.000 proteinen banaketa eta analisia burutu daiteke; gainera, isoforma desberdinak eta aldaketa post-translazionalek ere desberdinu daitezke [15, 16].

Hala ere, eskulan handia eta denbora luzea eskatzen duen teknika da, eta askotan erreproduzigarritasuna ere baxua da. Beste desabantaila batzuen artean, proteina basiko eta hidrofobikoekiko diskriminazioa, ugariak diren proteinekiko lehenetasuna eta arazo teknikoak adierazi dira [17, 18]. Eragozpen hauei aurre egiteko, aldaketa edota konbinazio berritzaileak proposatu dira; 2-DE-an oinarritutako estrategia alternatiboak eta zatikapen metodo berriak, besteak beste [19, 20].

### 3. ATAL ESPERIMENTALA

#### 3.1. OFFGEL-ean oinarritutako estrategia

Ikerketa honetan giharra osatzen duten miozuntzetako proteinen profila ezaugarritzeko estrategia berria garatu da, eta estrategia hau samurtasuna baldintzatzen duten proteina biomarkatzaileen bilaketan aplikatu da. Lehe-

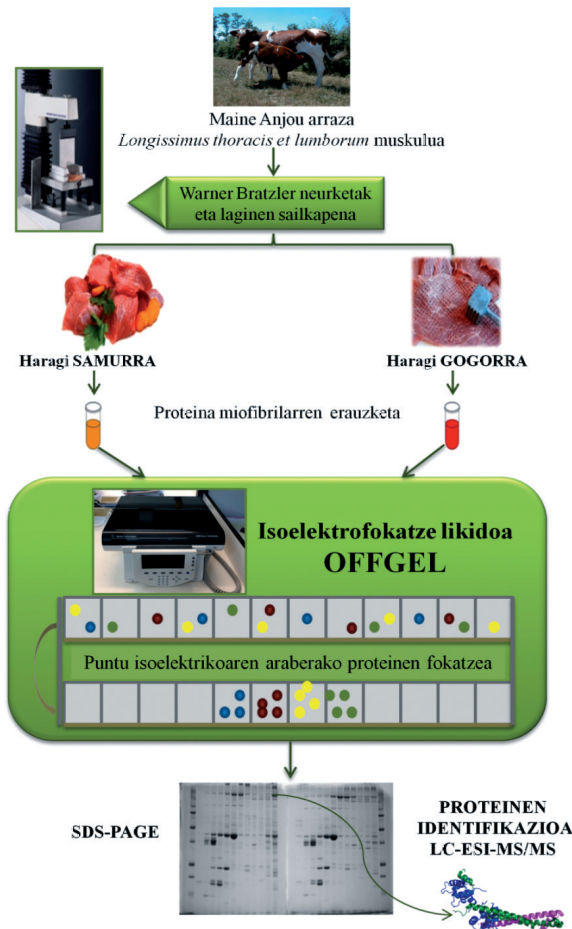
nik, isoelektrofokatzeko likidoaren bidez (OFFGEL) miozuntz erauzia zatikatu da eta bereizketa onargarria lortu, eta gero, proteinen banaketa pisu molekularren arabera burutu da 1-DE bidez, 2-DE baino sinpleagoa eta errepikakorragoa delako.

Aurkeztutako estrategia honek ez ditu 2.2 puntuan jorratutako 2-DE-aren desabantaila guztiak gainditzen. Nahiz eta zatiketak eskulan txikiagoa behar duen OFFGEL-a modu automatikoan kudeatzen delako, analisi denbora oraindik ere luzea da. Horretaz gain, 2-DE-aren kasuan bezala, proteina basiko eta hidrofobikoekiko diskriminatzen duen teknika da. Hala ere, 2-DE-rekin alderatuz estrategia honek duen abantaila nagusi bat frakzioak egoera likidoan eskuratzea da. Horrela, laginaren kutsadura murriztu eta errepikakortasuna hobetzen da. Hau dela eta, teknika honek iruzkin positiboak jaso ditu hainbat arlotan egindako proteomika-ikerketetan [21].

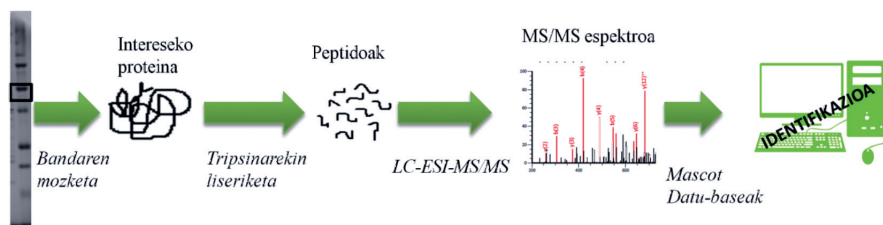
Hiltzea burutu eta 24 ordura giharrean (*Longissimus thoracis et lumborum*, LTL muskulua) neurtutako Warner Bratzler mozketa-indarraren arabera «gogortzat» (Warner Bratzler > 60 N) eta «samurtzat» (< 31 N) sailkatu dira Maine Anjou frantziar behi arrazako 8 animaliatatik eratorritako laginak (n = 4/taldeko). Giharretik miozuntz frakzioa erauzi eta gero, isoelektrofokatzeko likidoa burutu da. Azkenengo pausu honetan, erauzi bakoitzeko miligramo bat zatikatu da Agilent 3100 OFFGEL ekipoan proteinen fokatzeko gaiztatuz. Honen oinarria 12 gelaxkatan banatuta eta marko baten bidez estalitako IPG bat da. Animalia bakoitzari dagokion erauzi likidoa kargatu ostean, 50 mA-ko korrontea aplikatzen da. Gelaxken artean konezio fluidikorik ez dagoenez, proteinak IPGtik migratzera behartuta daude beren pI-rekin bat egiten duen pH-dun gelaxkan gelditu arte. Puntu honetan migrazioa eten egiten da, proteinak kargarik ez dutelako. Fokatzeko ekipoa kudeatzen du eta zortzi laginen fokatzeko burutu daiteke batera. Ondoren, lortutako 12 frakzio likidoak pipeta bidez jaso dira (**2. Irudia**).

Animalia bakoitzaren erauzitako lortutako 12 frakzio likidorekin bi elektroforesi (SDS-PAGE) burutu dira (erreplikak) poliakrilamidazko gelak erabiliaz. Gel bakoitzean lagin bati dagozkion 12 frakzioak txertatu dira eta 50 mA-ko korronte konstantepean burutu da SDS-PAGE-a. Gero, %10 azido trikloroazetikodun soluzioarekin proteinak finkatu eta gau osoan Coomassie koloidalarekin tindatzen utzi dira [22]. Banden intentsitatea neurtzeko ur destilatuekin tindua kendu eta gelen digitalizazioa burutu da (**2. Irudia**). Behin intentsitate balioak izanda, t-testaren Welch aldaera erabili da lagin gogorren eta samurren artean modu adierazgarrian desberdinak diren bandak identifikatzeko ( $p < 0,05$ ). Intereseko banda hauek tripsinarekin liseritu eta tandemeko masa espektrometriari akoplatutako kromatografia likido (LC-ESI-MS/MS) bidez analizatu dira. *Bos taurus* espezieko proteinak identifikatzeko, lortutako MS/MS espektroak Mascot bilatzailea erabiliz tratatu eta Uniprot KB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) datu basearekin alderatu dira (**3. Irudia**).

*Behi-haragiaren samurtasuna aztergai: estrategia proteomiko berri baten garapena*



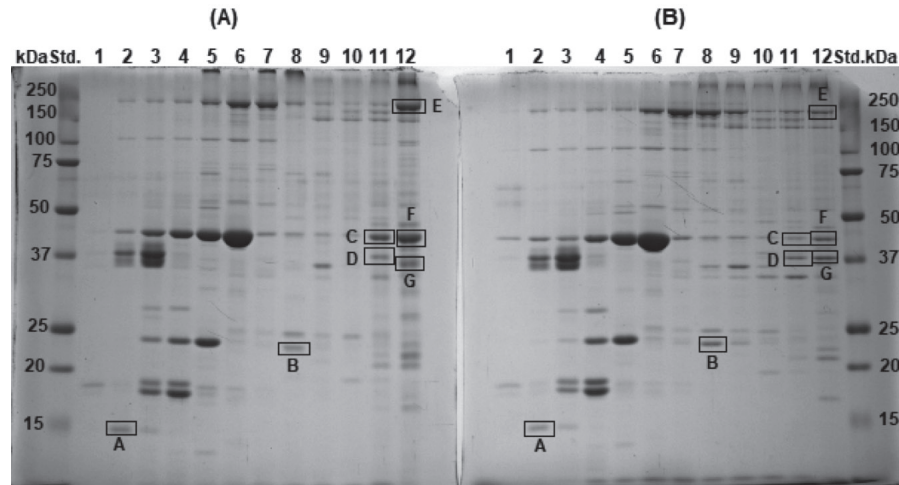
**2. irudia.** Behiaren *Longissimus thoracis et lumborum* muskuluan samurtasunaren biomarkatzaileak identifikatzeko garatutako estrategiaren irudikapen eskematikoa.



**3. irudia.** Intereseko banden indentifikazioa burutzeko jarraitu beharreko pausuen adierazpen eskematikoa.

### 3.2. Emaitzak eta eztabaida

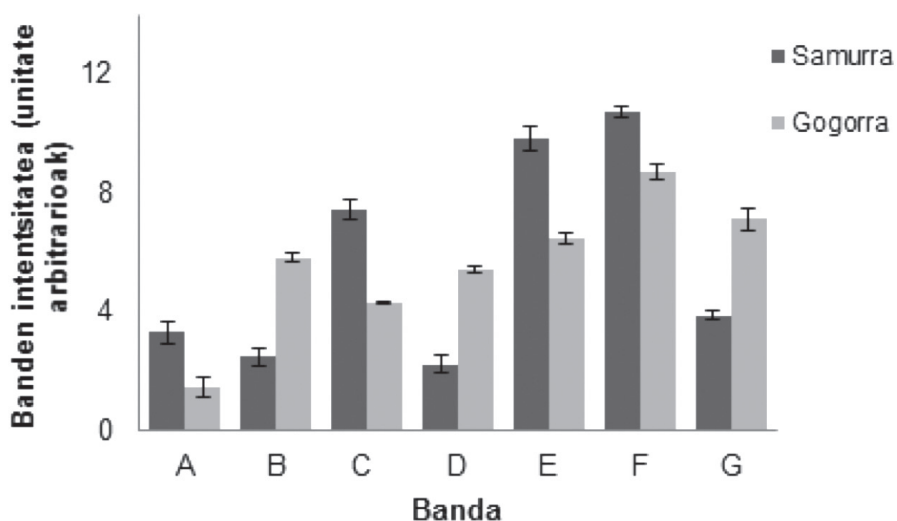
Aurkeztutako metodologiari jarraituz lagin samur eta gogorren profil oso errepikakorrek lortu direnez, posiblea izan da desberdintasun adierazgarriak identifikatzea. Lagin samurren eta gogorren arteko desberdintasun nabariena A eta G bitarteko proteina bandetan antzeman dira (**4. Irudia**).



**4. irudia.** Isoelektrofokatzeko likidoaren bidez banatutako lagin samur (A) eta gogorren (B) miozuntz frakzioaren SDS-PAGE gel adierazgarriak. Std: Estandarra.

Proteina hauen identifikazioa eta haien espresioak duen joeraren errepresentazioa **1. taulan** eta **5. irudian** jaso dira, hurrenez hurren. Bi haragi motetan modu adierazgarrian espresio desberdina duten proteina hauek funtzio desberdinak betetzen dituzte. Alde batetik, zelulen egiturarekin erlazio zuzena duten proteinak identifikatu dira (ACTA, MYOZ1, MYH2 eta MYH1) bai eta uzkuradura-sistemaren erregulazioan parte hartzen dutenak ere (TNNT eta TNNC). Horretaz gain, oxidazio estresarekin erlazionatutako HSPB1 eta energiaren metabolismoan erabakigarria den KCRM entzima solugarria ere identifikatu dira. Nahiz eta teoriarik ez izan, hiltzearen ostean gertatzen den pH-aren jaitsierak eta tenperatura altuek entzima solugarriak miozuntzetan prezipitatzea eragin dezaketela frogatu da [23]. Banda bakarrean bi proteinen koeluzioa behatu den arren, proteinen banakako analisia burutu ahal izan da. C-F eta D-G bandetan proteina pare berdina identifikatu den arren, analizatutako lagin guztietan markatzaile indibidual moduan funtzionatu dute eta, beraz, laurak biomarkatzaile potentzial moduan hartu dira kontuan.





**5. irudia.** Haragi samurrean (kolore iluna) eta gogorrean (kolore argia) neurtutako banden intentsitatearen batz bestekoa eta desbideratze estandarra.

**1. taula.** Haragi samurren eta gogorrean artean modu adierazgarrian desberdinak izan diren banden zerrenda. Proteinen sarrera izena eta sarbide zenbakia UniProt KB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) datu-basetik eskuratu dira.

Banda	Identifikazioa	Sarrera-izena	Swiss Prot sarbide zenbakia	Sekuentziaren estaldura portzentaia	p-balioa
A	Troponin C	TNNC1_BOVIN	P63315	15	0,01
B	Heat shock protein beta-1	HSPB1_BOVIN	Q3T149	28	0,02
C	Actin Creatine kinase M-type	ACTA_BOVIN	Q9XSC6	28	<0,01
		KCRM_BOVIN	P68138	12	
D	Troponin T Myozenin-1	TNNT3_BOVIN	Q8MKI3	17	0,02
		MYOZ1_BOVIN	Q8SQ24	15	
E	Myosin-2 Myosin-1	MYH2_BOVIN	Q9BE41	13	<0,01
		MYH1_BOVIN	Q9BE39	16	
F	Actin Creatine kinase M-type	ACTA_BOVIN	Q9XSC6	26	0,01
		KCRM_BOVIN	P68138	18	
G	Troponin T Myozenin-1	TNNT3_BOVIN	Q8MKI3	13	0,01
		MYOZ1_BOVIN	Q8SQ24	17	

Lortutako emaitzak ikertutako behi arraza eta gihar zehatzaren testuinguruan aztertu behar dira, samurtasunaren garapenean faktore askotarikoek eragiten baitezakete [24]. Kasu honetan aztertutako muskulua (LTL) animalien solomoa dela kontuan hartuta, gihar samurtzat hartzen da.

Banaututako proteina ezberdinak aztertzen badira, troponinaren kasuan, TNNT eta TNNC azpiunitateetan behatu da espresio desberdintasuna. Aurreko ikerketa askok txerri eta behi-haragiaren samurtasunean troponinaren paper garrantzitsua azaldu dute [25]. Charolais eta Blond d'Aquitaine haragitarako behi arrazetan, adibidez, TNNT-aren espresioa haragiaren gogortasunaren biomarkatzaile dela jakinarazi da eta gure emaitzetan ere gauza bera baieztatu da Maine-Anjou arrazarentzat (**5. Irudia**). TNNC-aren kasuan, aldiz, ontze-prozesuan espresio aldaketak gertatu ohi dira [26, 27]; ontze-prozesuaren hasieran, hau da, haragi gogorrean, TNNC-aren espresio altuagoa behatu da eta denborak aurrera egin ahala, ordea, TNNC-aren espresio altuagoa behatu da haragi samurrean. Ezberdintasun hauek literatura zientifikoan animalia hil osteko 5. egunean antzeman badira ere, gure emaitzen arabera, Maine Anjou behi arrazan desberdintasunak animalia hil ondorengo 24 orduren ostean identifikatu dira.

Shock termikoarekin erlazionatutako proteinek (HSPB1) animalietan dituzten funtzioak sakon aztertu badira ere, hauek giharretan *post mortem* daukaten eginkizuna ez da guztiz argitu. Ikerketa gehienek diotenaren arabera, proteina hauen espresioa altua denean haragi gogorra lortzen da, eta gure emaitzetan ere baieztapen hau berretsi da. Proteina hauek heriotza zelularra atzeratzen omen dute estresak aktibatuta, horrela apoptosiaren aurka eginez [28].

MYOZ1-a ez da orain arte samurtasunaren biomarkatzailetzat deskribatu eta, beraz, honen identifikazioa bereziki interesgarria da. Txerri haragian egindako ikerketen arabera, ontze-prozesuan degradazioa jasaten duela jakin da, baina behi-haragiaren samurtasunari lotuta okela gogorrean fosforilazio aldaketa bat jasaten duela bakarrik eman da aditzera [29]. Aldaketa honek miozuntzeketako proteinen kohesioa handitu eta, beraz, proteolisia eragozten du, haragi gogorragoa lortuz [30]. Gure emaitzetan ere MYOZ1-ren espresio handiagoa behatu da lagin gogorretan.

Identifikatutako miosinaren bi isoformen (MYH2 eta MYH1) espresio desberdintasunak ezin dira alde batera utzi, miozuntzen osagai nagusi baitira. Nahiz eta ikerketa askok jakinarazi duten miosinaren isoformek ez dutela hil ostean giharretan aldaketarik jasaten, lan berriagoek zalantzan jarri dute baieztapen hau [31]. Aurreko lanetan, Angus behi arrazan korrelazio positiboa aurkitu da MYH1-ren eta samurtasunaren artean, eta Blond D'Aquitaine eta Charolais behi arrazetan, aldiz, negatiboa, desberdintasun hauek muskuluren propietateei zaizkie [32]. Gure emaitzen arabera eta Maine Anjou arrazan, proteina hau haragi samurrekin erlazionatuta dago.

Angus eta Maine Anjou behi arrazetan aurkitu den MYH1-ren eta samurtasunaren arteko erlazio positiboa ikertutako muskuluaren propietate oxidatiboen antzekotasunaren bidez azaldu daiteke.

### 3.3. Ondorioak eta etorkizuneko lana

Ikerlan honetan giharretako miozuntzetako proteina frakzioa modu eraginkor batean ikertzeko metodologia garatu da. Metodologia honek, usadiozko beste metodo batzuekin alderatuz, eskulan gutxiago eskatzen du, isoelektrofokatzera era guztiz automatikoan kudeatzeko baita. Gainera, frakzioak egoera likidoan eskuratzeak lagina kutsatzeko arriskua txikiagotzen du. Honetaz gain, 2-DE teknikaren bidez lortutako geletan ohikoak diren erreproduzigarritasunak hobetzen dira. Hala ere, ikerketa sakonagoa eta metodoaren hobekuntza beharrezkoak dira. Etorkizunean profila guztiz ezaugarritzea eta gelaren pausua ezabatzea lirateke helburuak, frakzioak zuzenean masa espektrometriaren bidez analizatu ahal izateko.

Ikertutako behi arraza eta muskuluan identifikatutako 7 bandak era adierazgarrian izan dira desberdinak haragi gogorraren eta samurraren artean. Ontze-prozesuan gertatzen diren aldaketa biokimikoak ulertzeko eta kontsumitzaileak ontzat hartuko duen haragia ekoiztu ahal izateko, beharrezkoa da ildo honetan ikertzen jarraitzea. Horrela, esan daiteke, isoelektrofokatzera likidoa etorkizun oparoko teknika dela argitu gabeko galderei erantzuna emateko.

## 4. ESKER ONAK

Eskerrak Eusko Jaurlaritzako Ekonomiaren Garapena eta Lehiakortasuna Sailari L.R. Beldarrain-en teknologo eta doktorego bekengatik. Proiektu hau Espainiar Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioak finantzatu du (AGL2012-32146).

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] SHACKELFORD, S.D., WHEELER, T.L., MEADE, M.K., REAGAN, J.O., BYRNES, B.L., KOOHMARAIE, M. 2001. «Consumers impressions of tender selected beef». *Journal of animal science*, **79**, 2605-2614.
- [2] MONSON, F., SAÑUDO, C., SIERRA, I. 2005. «Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality traits and consumer acceptability in intensive reared beef». *Meat science*, **7**, 471-479.
- [3] PURSLOW, P. 2005. «Intramuscular connective tissue and its role in meat quality». *Meat Science*, **70**, 435-447.

- [4] FERGUSON, D.M., WARNER, R.D. 2008. «Have we underestimated the impact of pre-slaughter on meat quality in ruminants?». *Meat science*, **80**, 12-19.
- [5] VIEIRA, C., DIAZ, M.T., MARTINEZ, B., GARCÍA-CACHÁN, M.D. 2009. Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbial and sensory quality of rustic crossbreed beef at different stages of ageing. *Meat Science*, **83**, 398-404.
- [6] OUALI, A., GAGAOUA, M., BOUDIDA, Y., BECILA, S., BOUDJELLAL, A., HERRERA-MENDEZ, C.H., SENTANDREU, M.A. 2013. «Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved». *Meat science*, **76**, 147-159.
- [7] KOOHMARAIE, M., GEESINK, G.H. 2006. «Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system». *Meat science*, **74**, 34-43.
- [8] HERRERA-MENDEZ, C.H., BECILA, S., BOUDJELLAL, A., OUALI, A. 2006. «Meat ageing: Reconsideration of the current concept». *Trends in food science and technology*, **17**, 394-405.
- [9] FRONTERA, W.R., OCHALA, J. 2015. «Skeletal muscle: a brief review of structure and function». *Calcified tissue international*, **96**, 183-195.
- [10] OUALI, A., HERRERA-MENDEZ, C.H., COULIS, G., BECILA, S., BOUDJELLAL, A., AUBRY, L., SENTANDREU, M.A. 2006. «Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms». *Meat science*, **74**, 44-58.
- [11] OUALI, A., GAGAOUA, M., BOUDIDA, Y., BECILA, S., BOUDJELLAL, A., HERRERA-MENDEZ, C.H., SENTANDREU, M.A. 2013. «Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved». *Meat science*, **95**, 854-870.
- [12] LANA, A., ZOLLA, L. 2016. «Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective». *Journal of proteomics*, **147**, 85-97.
- [13] BENDIXEN, E. 2005. «The use of proteomics in meat science». *Meat science*, **71**, 138-149.
- [14] PAREDI, G., SENTANDREU, M.A., MOZZARELLI, A., FADDA, S., HOLLUNG, K., MARTINHO DE ALMEIDA, A. 2012. «Muscle and meat: New horizons and applications for proteomics on a farm to fork perspective». *Journal of proteomics*, **88**, 58-82.
- [15] PANCHAUD, A., AFFOLTER, M., MOREILLON, P., KUSSMANN, M. 2008. «Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: Status quo and outlook». *Journal of proteomics*, **71**, 19-33.
- [16] GORG, A., WEISS, W., DUNN, M.J. 2004. «Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics». *Proteomics*, **4**, 3668-36685.
- [17] CAMERINI, S., MAURI, P. 2015. «The role of protein and peptide separation before mass spectrometry analysis in clinical proteomics». *Journal of chromatography A*, **1381**, 1-12.

- [18] ZAPATA, I., WICK, M. 2012. «Electrophoresis based proteomic meat animal research». *Food technology and biotechnology*, **50**, 261-269.
- [19] UNLU, M., MORGAN, M.E., MINDEN, J.S. 1997. «Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts». *Electrophoresis*, **18**, 2071-2077.
- [20] GORG, A., LÜCK, C., WEISS, W. 2002. «Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels». *Proteomics*, **2**, 1652-1657.
- [21] MOREDA-PIÑEIRO, A., GARCIA, N., BERMEJO-BARRERA, P. 2014. «A review on preparative and semi preparative OFFGEL electrophoresis for multidimensional protein/peptide assesment». *Analitica chimica acta*, **863**, 1-17.
- [22] CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., SANTUCCI, L., GHIGGERI, G.M., CARNEMOLLA, B., ORECCIA, P., ZARDI, L., RIGHETTI, P.G. 2004. «Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis». *Electrophoresis*, **25**, 1327-1333.
- [23] LAVILLE, E., SAYD, T., MORZEL, M., BLINET, S., CHAMBON, C., LEPETIT, J., RENAND, G., HOCQUETTE, J.F. 2009. «Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization». *Journal of Agricultural and food chemistry*, **57**, 10755-10764.
- [24] CHRIKI, S., RENAND, G., PICARD, B., MICOL, D.M., JOURNAUX, L., HOCQUETTE, J.F. 2013. «Meta- analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics». *Livestock Science*, **155**, 424-434.
- [25] SZLATA, M., POSPIECH, E., GREAGER, M.L., LYCZINSKI, A., GRZES, B., MIKOLAJCZAK, B. 2005. «Titin and troponin T changes in relation to tenderness of meat from pigs of various meatiness». *Polish journal of food and nutrition sciences*, **14**, 139-144.
- [26] CHAZE, T., HOCQUETTE, J.F., MEUNIER, B., RENARD, G., JURIE, C., CHAMBON, C., JOURNAUX, L., ROUSSET, S., DENOYELLE, C., LEPETIT, J., PICARD, B. 2013. *Proteomics in food*. Springer, New York.
- [27] LAVILLE, E., SAYD, T., MORZEL, M., BLINET, S., CHAMBON, C., LEPETIT, J., RENAND, G., HOCQUETTE, J.F. 2009. «Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization». *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**, 10755-10764.
- [28] OUALI, A., GAGAOUA, M., BOUDIDA, Y., BECILA, S., BOUDJELLAL, A., HERRERA-MENDEZ, C.H., SENTANDREU, M.A. 2013. «Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved». *Meat science*, **95**, 854-870.
- [29] MORZEL, M., CHAMBON, C., HAMELIN, M., SANTE-LHOUELIER, V., SAYD, T., MONING, G. 2004. «Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures». *Meat science*, **67**, 689-696.

- [30] D'ALESSANDRO, A., RINALDUCCI, S., MORROCCO, C., ZOLLA, V., NAPOLITANO, F., ZOLLA, L. 2012. «Love me tender: An omics window on the bovine meat tenderness network». *Journal of proteomics*, **75**, 4360-4368.
- [31] HUFF LONERGAN, E., ZHANG, W., LONERGAN, S.N. 2010. «Biochemistry of *post mortem* muscle- Lessons on mechanisms of meat tenderization». *Meat science*, **86**, 184-195.
- [32] PICARD, B., GAGAOUA, M., KOMMOUN, M., TERLOW, C., HOCQUETTE, J.F., MICOL, D. 2013. «Biomarkers of beef tenderness in young bulls of three breeds». 59th international congress of meat science and technology 2013, conference paper.