

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**



**TESIS DOCTORAL**

**Mecanismo de acción y efecto de la suplementación  
nutricional con selenio en la calidad de la carne**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Luis Calvo Adiego**

DIRECTORES

**Clemente José López Bote**  
**Fidel Toldrá Vilardell**  
**Ana Isabel Rey Muñoz**

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento Producción Animal**

**MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN  
NUTRICIONAL CON SELENIO EN LA CALIDAD DE LA CARNE**

Tesis Doctoral presentada por  
Luis Calvo Adiego



PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA

Bajo la dirección de los doctores: D. CLEMENTE JOSÉ LÓPEZ  
BOTE, D. FIDEL TOLDRÁ VILARDELL Y  
DÑA. ANA ISABEL REY MUÑOZ

FDO. LUIS CALVO ADIEGO  
MADRID, 2017



D. CLEMENTE JOSÉ LÓPEZ BOTE, CATEDRÁTICO DE NUTICIÓN Y ALIMENTACIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, D. FIDEL TOLDRÁ VILARDELL, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS IATA-CSIC Y DÑA. ANA ISABEL REY MUÑOZ, PROFESORA TITULAR DE NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: **“Mecanismo de acción y efecto de la suplementación nutricional con selenio en la calidad de la carne”**, de la que es autor el licenciado en Veterinaria D. Luis Calvo Adiego, ha sido realizada en los Departamentos de Producción Animal de la Universidad Complutense de Madrid y en el de Ciencia de los Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos IATA-CSIC, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para obtener el título de Doctor en Veterinaria.

VºBº: Los Directores:

Fdo: D. Clemente J. López Bote

Fdo: D. Fidel Toldrá Vilardell

---

---

Fdo: Dña. Ana Isabel Rey Muñoz

---

Madrid a 28 de marzo de 2017.



Los trabajos experimentales y analíticos de la presente Tesis doctoral se ha realizado gracias a la participación en el proyecto CDTI Ref. IDI-20111017, desarrollado **por** la empresa Industrias Cárnicas Lorient Piqueras S.A. (Tarancón, Cuenca) y el grupo de investigación de Nutrición Animal y Calidad (Nutrical) **de la Universidad Complutense de Madrid**, que forma parte del consorcio MEDGAN (ABI2913) de la Comunidad de Madrid



A MI FAMILIA



## AGRADECIMIENTOS

Dentro de esta tesis quiero aprovechar para agradecer a toda la gente que me ha ayudado a desarrollarme a nivel personal y profesional. En ambos planos el profesor Clemente López me ha guiado con cariño integrando el ciclo completo de la granja a la mesa, la nutrición con el animal, la carne con la fisiología y la vida laboral con la familia. He tenido también la suerte de contar con la asistencia a nivel molecular y teórico del profesor Fidel Toldrá que ha llevado el desarrollo experimental del proyecto a sus bases. Al MEDGAN, y en concreto al grupo de la UCM le debo también la incorporación de la profesora Ana Rey que ha ayudado a pulir y rellenar mis lagunas iniciales y completar mi formación como científico. Dentro de este equipo he podido mantener también una estrecha colaboración con el Dr. José Segura, al que tengo que agradecer ser lo más parecido a un compañero de despacho y asistencia técnica y profesional a lo largo de la tesis. La cercanía al grupo también me permitió tener discusiones con la profesora Isabel Cambero y Cristina Óvilo. Esta tesis así como yo, nos hemos visto enriquecidos por estas circunstancias. También quiero agradecer mi especial relación con la carne, la biología y la fisiología al profesor Pedro Roncalés, extraordinario docente cuyo empeño nos permitió razonar dándonos las bases del músculo y su transformación.

La realización de la misma dentro del ámbito empresarial tengo que agradecerla a la familia Lorient-Piqueras. A Emilio Lorient y José López por confiar en mí los primeros pasos del desarrollo investigador de la empresa. También a Clemente Lorient por mantener su apuesta por la investigación y a Montserrat García por entender la tesis como un desarrollo académico paralelo. El desarrollo de la tesis ha revertido y continuará dando frutos en una mejora continua de nuestros productos que mantiene a Industrias Cárnicas Lorient Piqueras como referente nacional en I+D dentro del panorama nacional.

Dentro de la empresa he contado con la colaboración del departamento de compras que me ha ayudado a la integración de las necesidades de la empresa y ciclo productivo con el I+D en la generación de valor. Mil gracias a Jesús Fernández, Julián Redondo y Ángel Luis Mesas, vuestra visión crítica nos ha permitido el balance necesario investigación – retorno. En la empresa y en Tarancón, he tenido la suerte de contar con Ana Isabel Rodríguez, amiga y crítica que sabe sacar lo mejor de las personas. Ana, ánimo, eres la próxima doctora. También quiero agradecer la labor comercial de Alejandra Galipienso, que colaboró en la definición de los ensayos y facilitó parte de la información disponible en Alltech.

A nivel científico, he tenido la suerte de nacer en familia de doctores, que me han definido como persona y en parte como científico. Es gracias a ellos que he tenido el placer de trabajar antes de esta tesis con personas que han tenido una alta influencia en mí como los profesores Enrique Balcells, Juan José Badiola, Rosa Oria y Lone Gram, del Instituto Pirenaico de Ecología, Centro Nacional de Referencia de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, Universidad de Zaragoza y Centro Danés de Investigación Pesquera. También he disfrutado de la tutela del Dr. Stephen Wessels del Centro Danés de Toxicología.

A todos ellos les debo una visión del trabajo de investigador como herramienta en la sociedad, trabajo laboratorial y buenas dosis de humildad y entrega.

Ya entrados en mi familia, tengo la suerte de recorrer este camino con María, madre y compañera en la aventura que son nuestras hijas Violeta y Natalia.

También agradecer a mis padres y hermanos, siempre colaborando y enseñando. Ganas tengo de volver a poder estar con vosotros tocando.



## Índice de Figuras

Figura 1. Contribución de la carne de cerdo a los requerimientos de proteínas de distintas edades (14).	5
Figura 2. Contribución de la carne de cerdo a los requerimientos de minerales y vitaminas de la población adulta (14).	6
Figura 3. Consumo estimado en la UE en 2023 y comparación con el promedio del período 2010-12 (%).	9
Figura 4. Las consecuencias del cese de la circulación en el tejido muscular (49).	11
Figura 5. Tipos de calidad de carne en cerdo (57).	12
Figura 6. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo.	14
Figura 7. Estructura del músculo y la localización de los compartimentos con agua: compuestos intramiofibrilares y extramiofibrilares. Composición de agua intermiofibrilar, intrafascicular y extrafascicular (86).	16
Figura 8. Estructura esquemática de una sección de sarcómero. Adaptado de (49, 90).	17
Figura 9. Dogma central de la biología molecular, transferencia de información y productos de estudio por fase (88).	19
Figura 10. Efecto de la acumulación de grasa intramuscular en la estructura del tejido conjuntivo intramuscular (97).	20
Figura 11. El crecimiento y diferenciación del músculo estriado (100).	20
Figura 12. Factores que afectan la proporción de síntesis y degradación proteica y principales resultados in vivo y <i>post-mortem</i> (102).	21
Figura 13. Representación esquemática de los cambios en el IMCT durante la maduración (97).	23
Figura 14. Estructura tridimensional del dominio II de la proteasa $\mu$ -calpaína con $\text{Ca}^{2+}$ (bolas azules oscuras). El $\text{Ca}^{2+}$ se une en la parte superior del centro catalítico que consiste en Cys 115, His 282, y Asn 296 (139).	25
Figura 15. Proteólisis temprana <i>post-mortem</i> en <i>longissimus dorsi</i> (LD) y psoas mayor (PM) y pérdidas por exudado (149).	26
Figura 16. Modulación por proteasas “borradoras” y moduladoras. La proteólisis limitada de las Calpaínas modula la actividad, especificidad, estructura y vida media (fuente: <a href="http://www.calpain.org">www.calpain.org</a> ).	27
Figura 17. Inhibición de la calpaína a distintas concentraciones de calpastatina (160).	27
Figura 18. Una alta actividad calpastatina limita la proteólisis <i>post-mortem</i> (133).	27
Figura 19. Estructura esquemática de la calpastatina. <a href="http://www.calpain.org">www.calpain.org</a> .	28
Figura 20. Diagrama esquemático de las vías de activación de la apoptosis intrínseca, extrínseca y mediada por retículo endoplásmico. (123).	30
Figura 21. Representación de un proteasoma, vista lateral y vertical. Esta proteína con forma de cilindro presenta sus centros activos dentro del cilindro (azul). Las entradas al mismo (en rojo) regulan la entrada a la zona de “corte” donde las proteínas son troceadas en oligopéptidos de 3-30 aminoácidos (194).	31
Figura 22. Representación esquemática de las reacciones de oxidación proteica.	32
Figura 23. Producción de sustancias reactivas del oxígeno (ROS) y radicales sin oxígeno (NOR) y su influencia en las propiedades químicas, físicas y funcionales de las proteínas de la carne (217).	33
Figura 24. Efecto del pH la actividad de las lipasas (línea discontinua) y estearasas (línea continua) en el músculo (A) y adipocitos (B) (255).	37
Figura 25. Efecto de la temperatura en la hidrólisis el músculo (A, B) y tejido adipocitario (C, D). lipasa ácida - -•-, lipasa neutra --o-- estearasa ácida —•— y estearasa neutra —o—. Actividades expresadas sobre control a 37°C (255).	37
Figura 26. Principales fases de la oxidación lipídica (263, 264).	38

Figura 27. Representación esquemática de los sistemas pro y antioxidantes (278).	39
Figura 28. Esquema de inactivación de radicales libres por captadores de radicales libres (FRS).	39
Figura 29. Estructuras químicas de la vitamina E: tocoferol y tocotrienol (282).	40
Figura 30. Principales enzimas antioxidantes en músculo.	41
Figura 31. Mecanismo de reorganización de los fluídos del músculo y su relación con los cambios observados en la población $P_{22}$ de la RMN (321, 323).	44
Figura 32. Esquema del acortamiento por cambios en el pH de la carne del músculo con pH 7 a la carne con pH 5.5. Debido al incremento de carga en los grupos amino ( $NH_2 \rightarrow NH_3^+$ ) las proteínas de la carne se aproximan al punto isoeléctrico a pH 5.2-5.3 y por tanto minimizan el espacio intermiofibrilar (324).	45
Figura 33. Cambios en la CRA de la carne tras el sacrificio y durante la maduración. A.- célula muscular simplificada en estado anterior al rigor y con las miofibrillas conectadas entre ellas y a la membrana celular por el citoesqueleto. B.- Acortamiento <i>post-mortem</i> de miofibrilla por reducción de toda la célula muscular que genera una salida de agua del espacio intracelular al espacio extracelular. C.- La proteólisis del citoesqueleto rompe la unión de la proteína con la membrana y permite mantener el agua desplazada del espacio intermiofibrilar al extramiofibrilar, pero dentro de las estructuras membranosas celulares. D.- Relación entre el flujo de agua, tiempo <i>post-mortem</i> y cantidad de proteínas citoesqueléticas proteolizadas (329).	46
Figura 34. Figura de el músculo de un conejo a 1 h <i>post-mortem</i> . Pueden apreciar canales en la proximidad del tejido conjuntivo (323).	46
Figura 35. Micrografías en el SEM de secciones longitudinales y transversales del músculo semimembranoso, mostrando los canales intactos (mag x 1000) a través de los cuales el exudado se pierde (figura a) y la Figura del músculo madurado (mag x 40) b. Las flechas blancas apuntan a los canales y la estructura destruída (334).	48
Figura 36. Representación de la hipótesis “efecto esponja” para la mejora de la CRA con la maduración. Las proteínas estructurales entre las miofibrillas se rompen progresivamente con la maduración (1-4), y la viscosidad del exudado continua aumentando con el tiempo resultando una mayor retención o fuerza necesaria para la expulsión del agua de la carne por gravedad (334).	48
Figura 37. Metabolismo del selenio en mamíferos (77).	51
Figura 38. Interacción de la Vitamina E con el Selenio (18).	53
Figura 39. Relación de la concentración de selenio en lomo (en base húmeda) con el selenio en dieta del estudio concentración selenio en piensos (402).	58
Figura 40. Mecanismo propuesto de generación de radicales superóxido por el selenito (406, 407).	60
Figura 41. Variación observada en la merma a las 48h y la concentración de selenio orgánico o inorgánico añadido a la dieta (382).	65
Figura 42. Cambio en la proteólisis de la troponina T entre dieta control y dieta suplementada con vitamina E (428).	67
<b>Figura 43.</b> Efecto comparado del aporte de selenio orgánico en la concentración de $\alpha$ -tocoferol en el músculo en los distintos ensayos de esta Tesis doctoral.	120
<b>Figura 44.</b> Efecto del aporte de selenio orgánico en la concentración de algunos ácidos grasos mayoritarios en la fracción de los lípidos neutros de la grasa intramuscular (experimento 2º).	121
<b>Figura 45.</b> Efecto del aporte de selenio orgánico en la concentración de ácidos grasos libres en la grasa intramuscular (experimento 2º).	122
Figura 46. Mecanismos de acción y efectos de la resistencia a la insulina (389, 475-477).	123
<b>Figura 47.</b> Efecto del aporte de dos dosis (L, baja; H alta) de selenio mineral (selenito sódico, SS) o orgánico en base levadura (SY) y de vitamina E en la pérdida de exudado de la carne en fresco, tras descongelación o tras 20 horas de liofilización (experimento 3º).	127
<b>Figura 48.</b> $pH_{45}$ en distintas referencias de cerdos suplementados con SeY (383, 394, 412, 414).	128

**Figura 49.** Curva de caída de pH tras el sacrificio en los animales del ensayo 3º y representación gráfica de los grupos experimentales que permite observar un pH más elevado en los grupos que recibieron selenio en forma orgánica respecto a las formas minerales (457).....128

**Figura 50.** Diferentes hipótesis planteadas a lo largo de los años para explicar los factores de variación en la capacidad de retención del agua de la carne.....129



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Valor nutricional del cabecero, centro del lomo y cabecero cocinado. Porcentaje de IDC para mujeres adolescentes y entre 30 y 50 años calculados sobre los valores de cabecero cocinado (29-31).....	7
Tabla 2. Consumo y gasto en carne de cerdo y derivados en los hogares españoles en 2013 (10). .....	8
<b>Tabla 3.</b> Características de las catepsinas con actividad endopeptidasa en el músculo esquelético. Adaptado de (172). .....	29
<b>Tabla 4.</b> Revisión bibliográfica efectos del selenio y su fuente en los caracteres productivos del cerdo. .	55
<b>Tabla 5.</b> Efecto de distintas fuentes de selenio en la concentración tisular al final del cebo, suplementación 40 días peso final 105 kg (394).....	57
<b>Tabla 6.</b> Referencias de consumo de selenio por país resaltando áreas de bajo consumo (18). .....	58
<b>Tabla 7.</b> Principales diferencias entre el selenio orgánico y el selenito. Adaptado de (18). .....	59
<b>Tabla 8.</b> Principales estudios del efecto de la fuente y suplementación del selenio en la capacidad de retención de agua. ....	63
<b>Tabla 9.</b> Efecto de la suplementación con vit. E ( $\alpha$ -tocoferol) en el porcentaje de pérdidas por goteo de la carne de cerdo (1). .....	66
<b>Tabla 10.</b> Resumen de condiciones testadas en los ensayos de la tesis. ....	119
<b>Tabla 11.</b> Correlación de variables con la pérdida por exudado .....	125



## Contenido

1. Resumen.....	1
2. Summary .....	3
3. Revisión bibliográfica .....	5
3.1. La carne en la dieta .....	5
3.2. Claves del cerdo y sus productos en el área Mediterránea .....	8
3.3. La conversión del músculo en carne: factores que afectan su calidad .....	9
3.3.1. Sacrificio y conversión del músculo en carne .....	9
3.3.2. Variación en la capacidad de retención de agua y exudación .....	12
3.4. Metabolismo muscular.....	13
3.4.1. Proteínas .....	15
3.4.2. Lípidos .....	34
3.5. El agua en la carne.....	42
3.5.1. Distribución del agua, factores e importancia .....	42
3.5.2. Distribución del agua <i>in vivo</i> . .....	43
3.5.3. Distribución del agua <i>post-mortem</i> .....	43
3.5.4. Métodos para la determinación de la CRA .....	48
3.6. El selenio .....	50
3.6.1. Química y metabolismo del selenio .....	50
3.6.2. El selenio en la nutrición porcina .....	53
3.6.3. Concentración de selenio en tejidos animales.....	57
3.6.4. El selenio en nutrición humana: importancia de la carne.....	57
3.7. Manipulación de la CRA a través de la nutrición .....	60
3.7.1. Manipulación de macronutrientes.....	60
3.7.2. Manipulación de micronutrientes.....	60
4. Planteamiento y Objetivos .....	69
5. Trabajos experimentales .....	71
5.1. Trabajo Experimental 1 .....	71
5.2. Trabajo Experimental 2 .....	83
5.3. Trabajo Experimental 3 .....	105
6. Discusión General.....	119
6.1. Características de la canal .....	119
6.2. Concentración de selenio y otros minerales en tejido muscular del cerdo .....	119
6.3. Concentración $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) en la carne .....	119
6.4. Composición de ácidos grasos y procesos lipolíticos <i>post-mortem</i> .....	121
6.5. Estatus oxidativo .....	123

6.6. Color .....	124
6.7. Capacidad de retención de agua.....	125
6.8. Proteólisis.....	129
7. Conclusiones.....	133
8. Referencias.....	135

## Índice de abreviaturas

a*	Color rojo
PUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
MUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
SFA	Ácidos grasos saturados
AGS	Ácido graso sintasa
Akt	Proteín quinasa b
Ala	Alanina
ANS	Anserina
ASN	Asparraguina
ATGL	Lipasa adipocitaria de triglicéridos
ATP	Adenosin trifosfato
b*	Color amarillo-verdoso
C16:0	Ácido palmítico
C16:1 n-7	Ácido palmitoleico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1 n-7	Ácido vaccénico
C18:1 n-9	Ácido oleico
C18:2 n-6	Ácido linoleico
C18:3n-3	Ácido alfa-linolénico
CAR	Carnosina
CAT	Catalasa
CATI	Carnitina acil transferasa I
CLA	Ácido linolénico conjugado
CODEX	Código alimentario
CP	Fosfocreatina
CPK	Creatinina fosfoquinasa
CRA	Capacidad de retención de agua
Cys	Cisteina
DFD	Carnes secas oscuras y firmes
Du	Duroc
EFSA	Agencia europea de seguridad alimentaria
ERM	Miofilamentos fácilmente desprendibles
FAD	Flavin adenina dinucleótido
FADH2	Flavín adenín dinucleótido forma reducida
FoxO1	Forkhead box protein O1
FRS	Molécula secuestradora de radicales libres
fTn-T	Isoforma rápida troponina T
GI-GSH-PX	Glutación peroxidasa gastrointestinal
GIM	Grasa intramuscular
GLY	Glicina
GPX	Glutación peroxidasa
GPX1	Glutación peroxidasa citosólica
GPX2	Fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSH-Px	Glutation peroxidasa
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GSSH	Glutation oxidado
His	Histidina

HSL	Lipasa sensible a hormonas
IDR	Cantidades diarias recomendadas
IMCT	Tejido conjuntivo asociado intramuscular
IRS	Proteínas receptoras de la insulina
L*	Luminosidad
LD	Landrace
LOOH	Peróxidos
LPL	Lipoproteinlipasa
LW	Large White
Lys	Lisina
MALDI-TOF MS	Desorción/ionización láser asistida por matriz masas
MDA	Malonaldehído
Met	Metionina
MFI	Índice de fragmentación miofibrilar
MLC2	Cadena ligera de la miosina 2
MP	Protein quinasa
MRF4	Factor de regulación miogénica 4
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
Myf-5	Factor de miogénesis 5
MyoD	Proteína de diferenciación miogénica
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
NADPH+H+	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida
NO	Óxido nitroso
NOR	Radicales sin oxígeno
NOS	Óxido nitroso sintasa
PCC	Peso canal caliente
PDK1	Kinasa dependiente de fosfoinositidos-1
PGs	Proteoglicanos
PHE	Fenilalanina
PH-GSH-Px	Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinasa
PI4.5-P2	Fosfatidil inositol 4-5 bifosfato
PIB	Producto interior bruto
PKA	Adenil ciclasa A
PRO	Prolina
Proteína SRC	Proteína tirosin quinasa
PSE	Carnes pálidas blandas y exudativas
PTD-3,4,5-P3	Fosfatidil inositol trifosfato
PTP1B	La proteína fosfatasa de tirosina
PVf	Peso vivo final
PVo	Peso vivo inicial
RFN	Carnes rojas firmes y normales
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Sustancias reactivas de oxígeno
RSE	Carnes rojas blandas y exudativas
RSNOs	Nitrosotioles
SeMet	Selenometionina
SeO	Selenio orgánico
SeP	Selenoproteína P
Ser	Serina
SeY	Selenio orgánico en base levadura

SeY-H	Selenio orgánico en base levadura dosis alta
SeY-L	Selenio orgánico en base levadura dosis baja
SOD	Superóxido dismutasa
SREBP-1c	Factor de transcripción de esteroides
SS	Selenito sódico
SS-H	Selenito sódico dosis alta
SS-L	Selenito sódico dosis baja
sTn-T	Isoforma lenta troponina T
TAU	Taurina
TD	Tocino dorsal
Thr	Treonina
TLPU	Porcentaje magro total
Tn-I	Troponina I
Tn-T	Troponina T
TO•	Radical tocoferoxil
TPx	Tiorredoxina peroxidasa
TR	Tiorredoxina reductasa
tRNA	ARN de transferencia
TRP	Triptófano
TRX	Tiorredoxina
UGA	Uracilo Guanina Adenina
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
WBSF	Fuerza al corte en texturómetro con célula de corte Warner Bratzler
WHC	Capacidad de retención de agua (water holding capacity)



## 1. Resumen

Esta tesis se centra principalmente en el estudio de la carne de cerdo. Uno de los parámetros principales de calidad que la definen, y el que actualmente genera mayor número de reclamaciones en la venta en fresco es su capacidad de retención de agua y los exudados que genera. Pese a contener un alto contenido en humedad (alrededor del 75%) la carne tiene una apariencia sólida debido en gran medida a una alta capacidad para retener líquido en sus estructuras. No obstante, la apariencia externa brillante y jugosa se debe al agua superficial, por lo que es esencial que el agua no se encuentre íntegramente retenida en su interior, lo que proporcionaría una apariencia oscura y seca. Por tanto existe un delicado equilibrio en el que cualquier desviación en uno u otro sentido provocan consecuencias indeseables.

La capacidad de retención de agua (CRA) puede definirse como la habilidad de la carne de retener el agua tras el corte y/o la aplicación de fuerza (1), mientras que la pérdida de agua o exudado es la cantidad de fluido expelida de un trozo de carne sin la acción de otra fuerza que la gravedad (2). Se estima que más del 50% de la carne producida presenta merma excesiva (superior al 3%) (3, 4).

Actualmente en España se crían y sacrifican más de 40 millones de cerdos/año, lo que supone unos 275 millones de kg de cinta que con un precio de mercado en torno a 6 €/kg, puede estimarse una merma económica sólo en esta pieza de 25 millones de €. En términos nutricionales, dado el contenido proteico del exudado (aproximadamente 112 mg/ml) (5) ésta merma supone el desperdicio de 500.000 kg de proteínas sarcoplásmicas.

El objetivo concreto de esta tesis doctoral es el estudio del uso de antioxidantes y más específicamente selenio orgánico como medio para optimizar la retención de agua en la carne, minimizando pérdidas y manteniendo los atributos de apariencia y calidad. Se considera que esta optimización debe permitir tanto la obtención de una apariencia atractiva en la que se minimicen pérdidas excesivas de importancia económica como la mejora de la calidad y las propiedades tecnológicas de la carne.

Se han desarrollado tres experimentos en los que se ha ensayado el efecto del aporte de 0.2 ó 0.4 mg Se/kg de pienso de una forma mineral (selenito sódico) u orgánico durante el periodo final de cebo (9-10 semanas y 4 semanas antes del sacrificio). Se ha observado que la forma orgánica mejora el estatus oxidativo de la carne, generando cambios en el color y una mayor concentración de este mineral en la carne. Asimismo se observa un efecto sobre la concentración de ácidos grasos, con un aumento de los monoinsaturados frente a los saturados, lo que puede ser debido a una mayor actividad de la enzima  $\Delta 9$ -desaturasa. El resultado más destacado se centra en el efecto que tiene el selenio orgánico sobre la actividad proteolítica *post-mortem* y su relación con la capacidad de retención de agua de la carne. Se propone que puede tener un mecanismo de acción similar al de la vitamina E, protegiendo a las calpaínas del deterioro oxidativo durante los primeros momentos tras el sacrificio.



## 2. Summary

This thesis focuses on pig meat. Among the quality characteristics that define it, the one generating more issues while sold as fresh meat or processed products is its water holding capacity and concomitant drip loss. Despite its high moisture content (estimated circa 75%) meat has a solid appearance, among others due to the high water holding capacity of its structure. Nevertheless, its juicy shiny aspect is due to the superficial water so it is essential that the water is not fully restrained inside the meat as it would render it dry and dark. Therefore, there is a delicate balance where any dissadjustment in any direction might render undesired consequences.

The Water Holding Capacity (WHC) can be defined as the ability of meat to retain water after cutting and/or the application of some force (1) while the drip loss is the fluid which can be expelled from a piece of meat without mechanical force other than gravity (2). It is estimated that over 50% of the pig meat produced has unacceptable high drip (over 3%) (3, 4). Nowadays Spain produces and slaughters about 40 million pigs per year. This provides about 275 million boneless loin which cost about 6 €/kg, estimating a loss of 25 million € a year as weight loss, limiting the drip to the loin. Giving that drip contains approx 112 mg of protein per ml (5). This also means the waste of 500.000 kg of valuable sarcoplasmic proteins.

The purpose of the thesis is to evaluate the use of antioxidants and specifically organic selenium as a mean to optimize the WHC of the meat reducing drip loss, while maintaining its organoleptic attributes. This should enable us to obtain an attractive appearance minimizing excessive losses while improving the technical properties of meat.

Three experiments have been carried out to study the effect of supplementing pig diets with either 0.2 or 0.4 mg Se/kg in a mineral (sodium selenite) or organic form in late fattening (either 9-10 or 4 weeks prior to slaughter). It has been observed that the organic form improves the oxidative status of meat, including the color, and increases the concentration of this mineral in muscle tissue. Moreover, an effect on fatty acid composition was also observed, with a higher concentration of monounsaturated and a concomitant decrease in the concentration of saturated fatty acids. This may be due to a regulatory effect of the enzyme  $\Delta 9$ -desaturase. Probably the most relevant result is that the organic form of selenium increases proteolytic activity *post-mortem*, which is probably responsible of the higher water holding capacity of pork. It is proposed that a possible mechanism may be the protective effect of oxidative deterioration of calpains, which play a critical role in initial steps of proteolysis soon after harvesting.



### 3. Revisión bibliográfica

#### 3.1. La carne en la dieta

La dieta es el principal factor no genético que afecta a la salud (6). Entre los ingredientes nutricionales de mayor interés para el ser humano destaca la carne. En España por ejemplo, el 23% el gasto familiar en alimentación se destina a carne y productos cárnicos (7). El alto valor nutricional de la carne, ha permitido a la especie humana aumentar la masa encefálica y el desarrollo de la inteligencia pese al elevado gasto metabólico que conllevaba (8). La carne además ha definido nuestra anatomía actual, a través del desarrollo del bipedalismo y la posición erguida propiciando el uso de instrumentos de caza con las manos (9, 10). Su consumo también ha definido la estructura de nuestra boca (con molares pequeños y dientes frontales afilados) y el tracto gastro intestinal intermedio entre herbívoros (ciego y colon bien desarrollados) y carnívoros (estómago ácido) (11). Se estima que durante aproximadamente los dos millones de años anteriores al surgimiento del *Homo sapiens* el consumo de alimentos de origen animal (especialmente carne) era el mayoritario en la dieta. Esta adaptación ha ido tan lejos que la adopción de una dieta vegetariana debe vigilar la inclusión de nutrientes específicos para evitar el desarrollo de carencias.

El CODEX define la carne como la parte comestible de los músculos de los bóvidos, óvidos, súidos, cápridos, équidos y camélidos sanos, sacrificados en condiciones higiénicas. Por extensión, se aplica también a la de los animales de corral, caza de pelo y pluma y mamíferos marinos. Incluirá los músculos del esqueleto y los de la lengua, diafragma y esófago, con o sin grasa, porciones de hueso, piel, tendones, aponeurosis, nervios y vasos sanguíneos que normalmente acompañan al tejido muscular y que no se separan de éste en el proceso de preparación (12).

El concepto de carne va más allá del músculo, ya que incluye una serie de cambios experimentados desde el momento del sacrificio. La carne está compuesta principalmente de tres componentes mayoritarios, agua, proteínas y grasa, que pueden considerarse cercanos al 99%. El 1% restante está constituido mayoritariamente por minerales, pero también por vitaminas.

Desde un punto de vista nutricional la carne es una de las principales fuentes de proteína de alta calidad con un aporte importante y equilibrado de todos los aminoácidos esenciales (13). Como puede verse en la Figura 1, el consumo de 100 g de lomo proporciona más del 60% de las necesidades proteicas de una niña de 5 años.

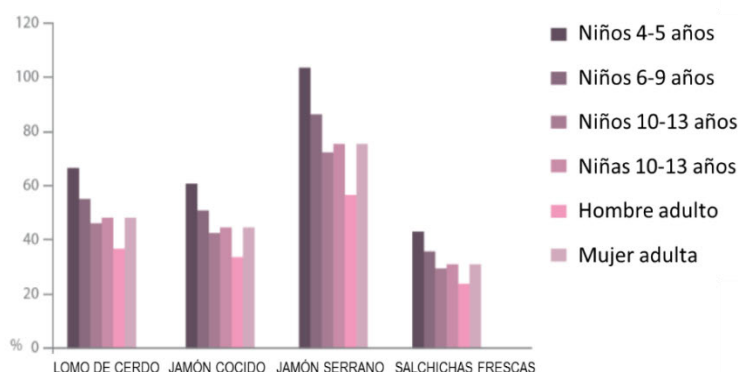
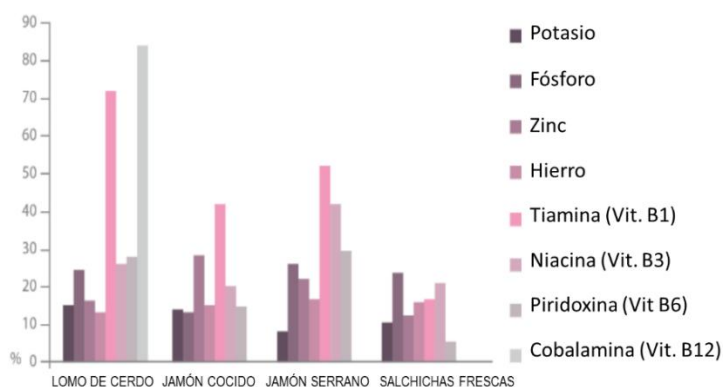


Figura 1. Contribución de la carne de cerdo a los requerimientos de proteínas de distintas edades (14).

La carne es también una excelente fuente de minerales como el hierro, zinc, selenio y fósforo (Figura 2). La deficiencia en hierro (anemia ferropénica) es una de las deficiencias nutricionales más comunes en la especie humana (15) y este se encuentra en la carne principalmente en estado hemo (38-60%) con alta biodisponibilidad (16), lo que puede suponer un 18% de las necesidades nutricionales diarias (17). Los contenidos en zinc, fósforo y potasio son también elevados, pudiendo alcanzar los 100 g de lomo del ejemplo el 30, 20 y 13 % de las respectivas cantidades diarias recomendadas (IDR).



**Figura 2.** Contribución de la carne de cerdo a los requerimientos de minerales y vitaminas de la población adulta (14).

La carne también es una de las principales fuentes de Selenio de la dieta. La riqueza de la misma depende en gran medida de la alimentación recibida por el animal y varía desde 40 - 50  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de carne hasta 1.42  $\mu\text{g}/\text{g}$  (3 veces superior) en carne de cerdo suplementado con selenio orgánico (18).

La carne tiene un alto valor nutricional como fuente de ciertas vitaminas entre las que destacan: la  $B_{12}$ ,  $B_6$ , tiamina, riboflavina y niacina, con aportes superiores al 20% de la IDR para todos ellos. La deficiencia en vitamina  $B_{12}$  es frecuente en la población vegetariana (13). Su carencia también puede deberse a mala absorción generada por atrofas digestivas, síndromes derivados de cirugía como el intestino corto o avanzada edad (19).

El alto consumo de carne actual también ha sido marcado como uno de los principales factores de riesgo para numerosas patologías como distintas formas de cáncer, enfermedades cardiovasculares y metabólicas (13, 20). Esto se ha relacionado principalmente con el contenido graso y la alta proporción de ácidos grasos saturados, contenido en hierro (21) y la formación de nitrosaminas y compuestos potencialmente cancerígenos durante el procesado.

El contenido graso de la carne es muy variable, dependiendo de la especie, genética, sexo, corte, tipo de fibra, peso de sacrificio, alimentación, edad o ejercicio (22, 23).

La Tabla 1 muestra las diferencias entre el cabecero de lomo tras eliminar la grasa, la parte central del lomo y el efecto del cocinado.

El contenido en grasa de la carne de cerdo presenta fuertes variaciones (Tabla 1), desde niveles inferiores al 2 % a superiores al 10-30 % (13, 24). El perfil de ácidos grasos del cerdo refleja tanto su nutrición como su bagaje genético. Los ácidos grasos provienen de dos fuentes principales, el aporte exógeno y la síntesis endógena a partir de componentes no grasos, existiendo además una fuerte regulación metabólica en el tipo de ácidos graso formado y en su ubicación en glicéridos (22, 23). La grasa de cerdo está principalmente compuesta de ácidos grasos monoinsaturados (principalmente oleico), seguido de ácidos grasos saturados (esteárico, palmítico) y poliinsaturados (principalmente linoleico).

El consumo actual de carne en los países desarrollados es elevado (sobre 80 kg por persona y año – 220 g/día) manteniéndose estable durante los últimos años. Los países en vía de desarrollo presentan un consumo inferior (superior a 30 kg persona y año – 82 g/día) con un

crecimiento paulatino durante las últimas décadas principalmente por un incremento en el consumo de carne de aves (25).

En la Unión Europea, el consumo de carne está en uno de los puntos más bajos de los últimos años, con valores medios de 64.7 kg/persona y año (177 g/día), siendo únicamente de 52.65 en España (26). Es importante destacar que estos datos son anteriores al informe de la agencia internacional para la investigación en cáncer de la OMS en el que se asoció directamente el consumo de carne y productos cárnicos con un incremento en el riesgo de determinados cánceres (27). Parece existir un umbral de saturación en países con alto PIB. Este nivel presenta fuertes variaciones regionales, siendo cercano a los 120 kg en EEUU frente a los 60 kg de países como Suecia (28).

**Tabla 1.** Valor nutricional del cabecero, centro del lomo y cabecero cocinado. Porcentaje de IDC para mujeres adolescentes y entre 30 y 50 años calculados sobre los valores de cabecero cocinado (29-31).

Nutriente	Unidades	Cabecero lomo (100 g)	Centro del lomo (100 g)	Cabecero cocinado (100 g)	Porcentaje ingesta recomendada para mujer adolescente	Porcentaje ingesta recomendada para mujer 30-50 años
Agua	g	73.28	71.98	65.6	3.0%	3.1%
Energía	kcal	132	152	173	6.8%	7.0%
Proteína	g	22.39	21.8	27.23	60.5%	59.2%
Grasa	g	4.06	6.48	6.28		
<b>Minerales</b>						
Calcio	mg	5	5	6	0.5%	0.6%
Hierro	mg	0.54	0.77	0.64	4.3%	3.6%
Magnesio	mg	26	22	26	10.8%	8.1%
Fósforo	mg	225	207	227	18.2%	22.7%
Potasio	mg	374	421	357	13.7%	12.8%
Sodio	mg	49	45	47	11.8%	10.2%
Zinc	mg	1.8	1.69	2.16	30.9%	27.0%
<b>Vitaminas</b>						
Tiamina	mg	0.443	0.856	0.561	62.3%	21.0%
Riboflavina	mg	0.187	0.268	0.237	26.3%	21.5%
Niacina	mg	5.75	5.04	7.28	60.6%	52.0%
Vit. B <sub>6</sub>	mg	0.755	0.47	0.713	71.3%	54.8%
Vit. B <sub>12</sub>	µg	0.51	0.53	0.55	22.9%	22.9%
Vit. E	mg	0.13	0.18	0.1	1.3%	1.4%
Vit. D (D <sub>2</sub> +D <sub>3</sub> )	µg	0.4	0.6	0.4	8.0%	8.0%
Vit. D	IU	16	25	18		
<b>Lípidos</b>						
SFA	g	1	2	2		
MUFA	g	2	3	2		
PUFA	g	0.409	0.7	0.631		
Colesterol	mg	63	55	79		

Como balance global de los prejuicios y beneficios de la carne, parece claro que el consumo de la carne, como la mayoría de los productos tradicionales, debe incluirse en una dieta equilibrada, especialmente en períodos de especial sensibilidad en los que es considerada esencial para la consecución de un crecimiento y desarrollo óptimo (32).

### 3.2. Claves del cerdo y sus productos en el área Mediterránea

La producción y consumo de cerdo ha sido siempre parte de la cultura mediterránea. Los primeros usos datados del cerdo provienen de los registros tempranos de la cultura egipcia, en la que se usaba para agricultura, alimentación y en ceremonias, existiendo indicios de su empleo también como producto salado y/o seco. Otras culturas como la griega también presentan un consumo importante del cerdo en el que se reconoce su calidad nutricional siendo ya mencionado en la Ilíada y la Odisea. También en la península ibérica hay evidencias antiguas de la cultura celta, con amplia documentación de monolitos. El primer dato sobre la producción de cerdo en la península ibérica data de Estrabon (geógrafo griego) en el siglo I a. C. Estos consumos tempranos del cerdo fueron evolucionando y eclosionaron durante el Imperio Romano. En este período tenemos menciones a zonas geográficas específicas con especial reputación y el comercio de productos como jamones salados/secos. Ya en esta época se diferenciaban dos tipos de cerdos (blanco y negro) y diferencias en la calidad del producto final basadas en su alimentación (bellotas y castañas), así como los sabores que pueden ser obtenidos de él, refiriendo a esta carne un precio superior al de otras especies. Esta comercialización queda patente en referencias escritas por los clásicos como Marcial, Plinio, Columela y Horacio, así como con la existencia de monedas con la forma y representación de jamones salados. El principal centro de distribución estaba localizado en Nîmes, desde donde se recibían y distribuían piezas para todo el imperio (33).

Los cerdos y la carne de cerdo también presentan su importancia en otros episodios históricos como los viajes de Colón en los que se incluyó para la realización de nuevos asentamientos y la alimentación durante los viajes (33).

En este período de tiempo los procesos y la cultura gastronómica de estos productos han evolucionado, pese a que procesos como la salazón pueden ser similares a los empleados en tiempo de los romanos. Es patente que los productos del cerdo se han desarrollado tomando elementos de las distintas culturas del área mediterránea convirtiéndose claramente en parte de nuestra identidad cultural y patrimonio.

**Tabla 2.** Consumo y gasto en carne de cerdo y derivados en los hogares españoles en 2013 (10).

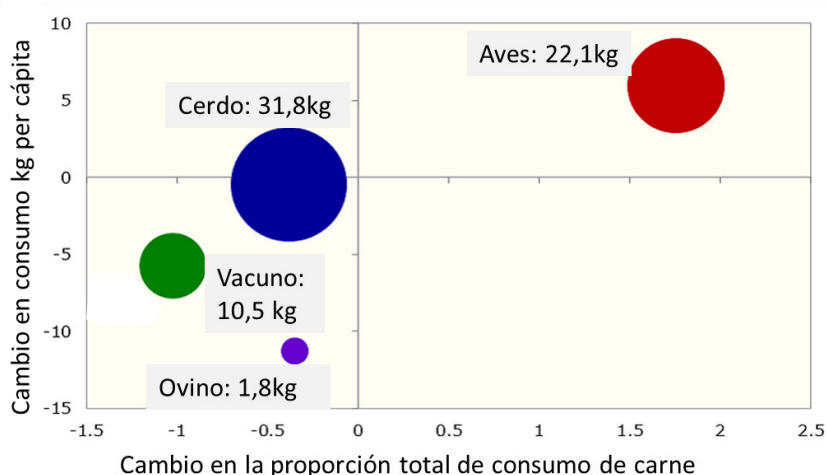
Producto	Volumen (miles kg)	Valor (miles €)	Precio medio (€/ kg)	Consumo per cápita (kg)	Gasto per cápita (€)
Total carne	2.389.383	15.179.940	6.35	52.71	334.87
Carne cerdo	484.157	2.799.163	5.78	10.68	61.75
Salchichas frescas	28.431	186.592	6.56	0.63	4.12
Jamón curado y paleta	103.288	1.399.014	13.54	2.28	30.86
Lomo embuchado (normal e ibérico)	10.794	184.404	17.08	0.24	4.07
Chorizos	53.011	43.581	0.82	1.17	0.96
Salchichón salami	21.972	190.133	8.65	0.48	4.19
Fuet/longanizas	27.859	251.843	9.04	0.61	5.56
Salchichas	62.684	218.831	3.49	1.38	4.83
Jamón cocido	68.881	505.677	7.34	1.52	11.16

El consumo anual de carne de cerdo fresca en España es altamente variable según las comunidades, con un promedio en torno a los 10.57 kg/habitante año, superando los 14 en Castilla León y bajando en torno a 6 kg/habitante y año en Canarias (26). Este consumo ha

experimentado un descenso en el período 2006-2015, que puede ser debido a la reducción de la población nacional, así como cambios en las costumbres alimentarias (34).

El consumo de productos derivados del cerdo (Tabla 2) también es muy importante, destacando el jamón serrano y paleta con un consumo superior a los 2,28 kg habitante y año, seguido del jamón cocido 1.52 kg, 1.2 kg salchichas y embutidos curados (2 kg año). El sumatorio de estos productos supone 8.31 kg que considerando una merma promedio estimada del 30 % suponen cerca de 12 kg extra de carne fresca siendo cercano al 43% de la carne consumida. El consumo nacional de transformados se ha incrementado de manera significativa en el período 2006-2015. Este incremento del 11.9 % ha permitido a los transformados ser ya la principal forma de consumo de carne de cerdo a nivel nacional (34).

Dado el aumento de la población mundial y el mayor consumo de carne que implica una transformación extra de los productos agrarios y una mayor ineficiencia energética y proteica al producirse el paso del sector agrícola al ganadero, se estima que el precio del cerdo va a mantener un crecimiento durante los próximos años (Figura 3). Esto probablemente va a ocasionar un desplazamiento a producciones más eficientes y consumos más responsables con una mayor presencia en la dieta de las aves y sus derivados. Así en las estimaciones de la UE, se espera que la carne de cerdo vaya a seguir representando el consumo principal de carne en la UE en el próximo decenio, manteniendo su consumo pero decayendo respecto a la carne de ave que va a seguir experimentando un crecimiento (35).



**Figura 3.** Consumo estimado en la UE en 2023 y comparación con el promedio del período 2010-12 (%).

### 3.3. La conversión del músculo en carne: factores que afectan su calidad

#### 3.3.1. Sacrificio y conversión del músculo en carne

Finalizado el proceso de producción y una vez que el animal ha sido transportado, reposado, aturdido y desangrado, el paro de la circulación origina varias consecuencias como el cese del aporte de oxígeno, vitaminas y antioxidantes y la disminución del control por los sistemas nerviosos (sensible al bajo nivel de oxígeno) y hormonal (que no presenta transporte de señales). Esto es, los tejidos son “abandonados” sin aporte de oxígeno o nutrientes y sin mayor actividad que los gastos fijos de energía (actividad no contráctil ATPasa de la miosina y de la actomiosina) (Figura 4). Debido a la ausencia de oxígeno, el ciclo de Krebs es inviable dejando el aporte energético a los depósitos existentes de fosfocreatina (CP) y glucógeno. La fosfocreatina es empleada rápidamente por la creatina fosfoquinasa (CPK), dejando como única fuente de energía el glucógeno, que genera ácido láctico a través de la glucólisis. Este

ácido láctico se comienza a acumular, superando la capacidad tampón del tejido y finalmente inhibiendo las enzimas glucolíticas (36). La curva de bajada del pH con el tiempo puede modificarse por el tipo y cantidad de depósitos de glucógeno (37), la temperatura (38), tipo de fibra, niveles y formas de CPK y cambios en la capacidad tampón de la fibra como resultado de la apoptosis (36). Este último efecto se produce al reemplazarse compuestos acídicos (fosfatidilserina) por básicos (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) en una alteración de membrana que puede iniciarse con la apoptosis (36). Este último efecto se observa en una gran cantidad de músculos como zonas de estabilidad en la curva de bajada del pH.

El glucógeno presenta dos formas, el macroglucógeno que presenta una ratio elevado de hidratos de carbono/proteína es una molécula relativamente grande  $10^4$  kDa cuyo contenido aumenta en músculos con frecuentes contracciones (39) o a través de manipulación nutricional (40). Y el proglucógeno, que es insoluble en ácido y se degrada en los ejercicios anaeróbicos (41) siendo también el primer depósito en degradarse *post-mortem* (40). La regulación del glucógeno no está plenamente comprendida (42) pero la reciente identificación de glucogenina y el renovado interés en las formas de glucógeno puede suponer un mayor entendimiento de estos procesos (43).

La CPK se encuentra principalmente en las miofibrillas, especialmente en la línea M (44). Esta enzima es responsable de la conversión de la CP en creatina y ATP. La actividad de esta enzima tiene un efecto en la velocidad de contracción del músculo post mortem, el período tras el sacrificio hasta la instauración de la contracción y la velocidad de degradación de la CP. Los niveles de CPK son mayores en músculos con alto exudado (baja CRA), esto acorta el tiempo hasta la instauración del rigor y acelera la producción de ácido láctico con su correspondiente bajada de pH (45).

En general podemos esperar encontrar un pH estable a las 20-24 horas (en carne de cerdo) tras el sacrificio. Esta suele presentar un pH en el rango de 5.4-6.0 siendo óptimo en el rango de 5.5-5.8 (46), pero existiendo grandes variaciones en la curva de bajada del pH, el nivel final y la velocidad de descenso (47).

Cuando los niveles de ATP bajan, la célula comienza a no poder mantener su homeostasis. Hay una despolarización de la membrana y los iones como el calcio, sodio y potasio se liberan al sarcoplasma contribuyendo a aumentar la actividad de enzimas dependientes del calcio como la ATP-asa y las calpaínas entre otras. Una vez alcanzado el nivel crítico de ATP se forma la actomiosina desarrollándose el rigor mortis.

La desnaturalización de las proteínas es resultado de la bajada de pH, los cambios en la fuerza iónica y la temperatura. Conforme baja el pH, se aproxima al punto isoeléctrico de las proteínas de la carne (pH 5.4-5.5), dejándolas sin carga neta, alterando su estructura y reduciendo su capacidad de retener el agua (48).

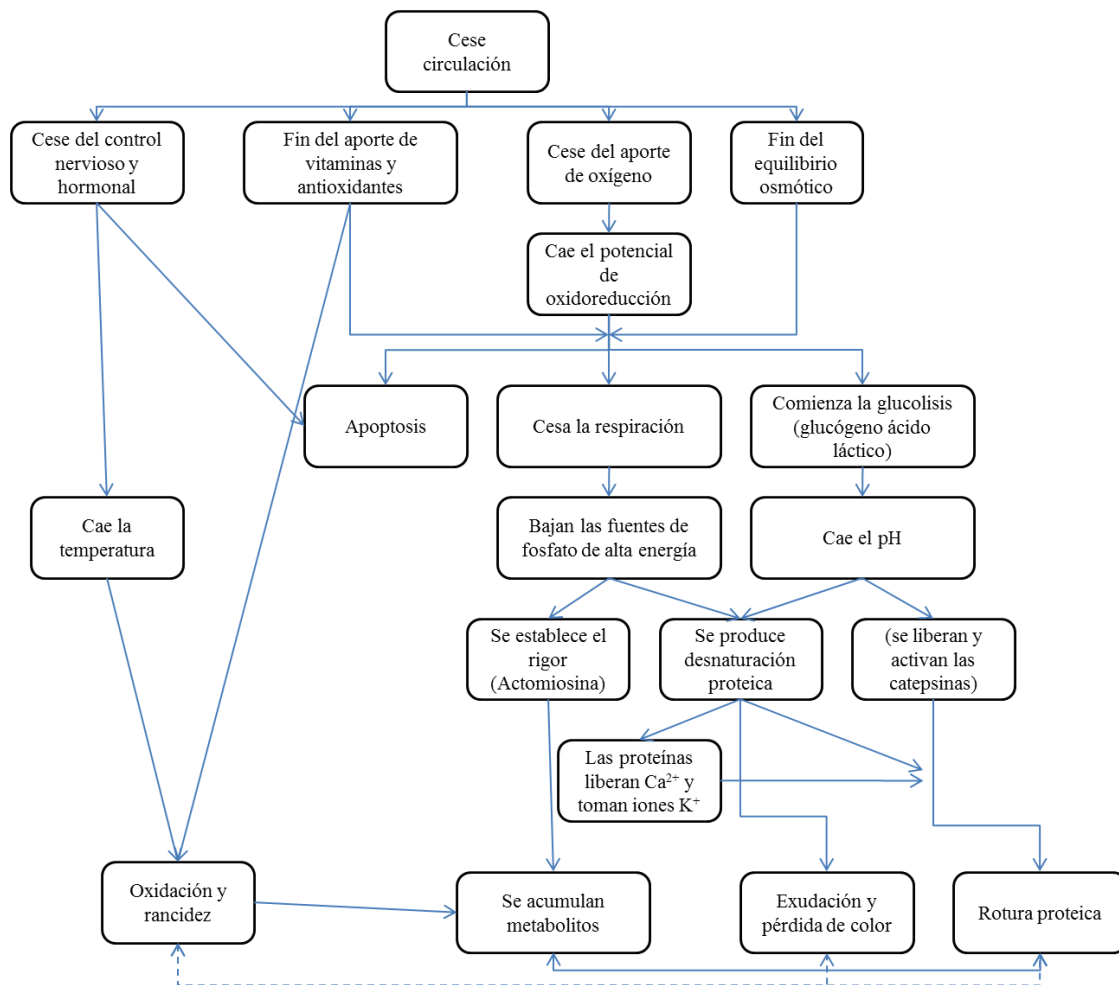


Figura 4. Las consecuencias del cese de la circulación en el tejido muscular (49).

La temperatura es un factor determinante en el proceso, ya que un valor superior permite a las reacciones tener lugar con una velocidad mayor, dando lugar a un incremento en la glucogenólisis, una reducción más rápida del ATP y un descenso brusco del pH que conllevan una mayor desnaturalización de las proteínas y acortamiento de los sarcómeros (2, 43, 50). En el momento del sacrificio la temperatura de la carne es próxima a 37°C. La inactivación del sistema circulatorio impide la liberación de calor por esta vía, lo que hace que en el interior de las masas musculares la temperatura tras el sacrificio aumente en varios grados. La llegada del frío debe ser necesariamente desde el exterior por inducción lo cual puede verse marcadamente ralentizado por el panículo adiposo subcutáneo que actúa como termoaislante. La coincidencia de un pH bajo y el hecho de que la carne esté todavía a una temperatura elevada es un factor determinante de la desnaturalización proteica. Una de las consecuencias directas de esta desnaturalización de las proteínas es una pérdida de solubilidad y por tanto de su capacidad de retener moléculas de agua por atracción electrostática. La desnaturalización es especialmente marcada en el caso de las proteínas sarcoplásmicas. Entre ellas se encuentra la mioglobina, responsable en buena medida del color de la carne. Un descenso brusco del pH con temperaturas elevadas provoca la desnaturalización de este hemopigmento produciendo carnes muy pálidas. Tras el rigor, la temperatura de la carne se mantiene como uno de los principales factores que controlan la calidad microbiológica, tecnológica y organoléptica de la carne (2, 50).

La muerte celular puede tener lugar de diferentes maneras. La necrosis está considerada como la muerte celular desordenada, en la que las células se hinchan hasta el momento de la lisis liberando entonces el contenido celular al medio cercano (51). La apoptosis es considerada casi opuesta, ya que se trata de una forma de muerte celular rápida y ordenada en la que la

célula comienza perdiendo el contacto con las células de su entorno, reduciendo el tamaño como consecuencia de la condensación del núcleo y citoplasma. Las mitocondrias liberan el citocromo C y existen cambios en la permeabilidad de la membrana y la capacidad tampón como los mencionados anteriormente (52, 53).

Otras dos consecuencias del sacrificio es la pérdida de la capacidad de mantener las condiciones reductoras (54) y la proteólisis que comienza rápidamente tras el sacrificio. En estos puntos se profundiza en secciones específicas de la introducción de esta tesis.

### 3.3.2. Variación en la capacidad de retención de agua y exudación

Estos acrónimos se emplean para identificar las cuatro posibles calidades de carne fresca que encontramos (Figura 5). Estas son carnes pálidas blandas y exudativas (pale soft and exudative PSE), rojas blandas exudativas (red soft exudative RSE), rojas firmes y no exudativas (RFN) y oscuras firmes y secas (DFD). Estos nombres provienen de la comparación de lo que consideramos carne normal (RFN) frente a las otras. La comparación visual sencilla puede verse en la Figura 5.

La definición de cada grupo y los límites entre grupos varían en función de la población examinada y el autor (2, 55). Están generalmente basados en la curva de bajada del pH y el pH último, pero también pueden basarse en la luminosidad ( $L^*$ ), conductividad y combinaciones de ellas. Las variaciones en la curva del pH influyen características de la carne como el color, vida útil, CRA y capacidades tecnológicas de las mismas (56).

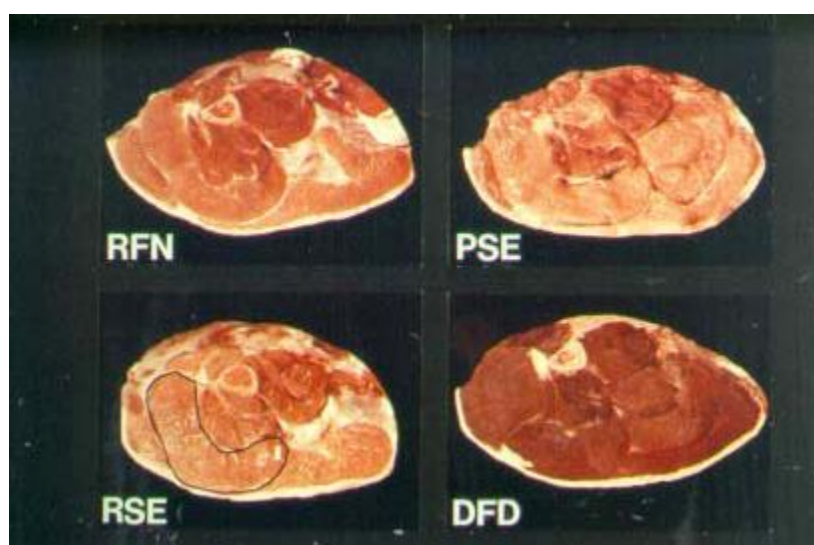


Figura 5. Tipos de calidad de carne en cerdo (57).

La carne PSE se define normalmente como aquella que alcanza un pH inferior a 6 antes de los 45 minutos post-sacrificio. Esta bajada combinada con las temperaturas elevadas del músculo dan lugar a una desnaturalización de las proteínas y a lesiones en las membranas (58). La desnaturalización de la miosina y las proteínas sarcoplásmicas ocasiona una reducción severa de la cantidad de agua ligada que implica una bajada de la CRA (59). Los miofilamentos acortados expelen el sarcoplasma fuera al espacio extracelular. La mayor reflexión de la luz se origina por la diferencia entre los índices de refracción del sarcoplasma y las miofibrillas. Esta diferencia origina una mayor reflexión que genera una apariencia más pálida. Este pH ácido también promueve la oxidación de la mioglobina durante el almacenamiento de la carne generando metamioglobina, de aspecto parduzco (55). Este defecto presenta una fuerte prevalencia en determinadas genéticas con presencia del gen Halotano + en homocigosis dado el elevado rendimiento magro obtenido. En genéticas libres de este gen mayor y color

adecuado se ha seguido encontrando un alto exudado cuando la caída del pH coincide con temperaturas todavía elevadas. Esto ha llevado al acuñado del término RSE.

Las carnes RSE o ácidas se producen por un descenso mayor del pH (incluso hasta 5.3) que no genera desnaturalización pero reduce la CRA en la medida que las proteínas se aproximan a su punto isoeléctrico (60).

La carne DFD es la que presenta un pH final elevado, superior a 6-6.2 según la referencia consultada. Este pH elevado provoca una escasa desnaturalización proteica manteniendo una repulsión electrostática elevada en las miofibrillas que aumenta el espacio entre las mismas. Al aumentar éste, se reduce la diferencia en la difracción lo que origina un color oscuro (55).

La prevalencia de estos defectos está relacionada con diversos factores como la genética, nutrición, manejo, estación del año, estrés y sistema de aturdimiento (61, 62). Entre ellas, en cerdos seleccionados para obtener una carne de elevada calidad (eliminando el principal componente genético) los factores *ante-mortem* resultan especialmente relevantes para reducir la presencia de estos defectos (63-65). En general la mayor parte de los autores aceptan que los depósitos de glucógeno y el potencial glucolítico son claves (66), pese a que publicaciones recientes les otorgan un papel más indirecto (60).

Un estrés prolongado da lugar al agotamiento de los depósitos de glucógeno, que reduce la cantidad de ácido láctico que se puede formar dando lugar a un pH más elevado e incrementando el riesgo de carnes DFD (67, 68). En cambio, condiciones de estrés agudo cercanas al sacrificio generan una acumulación rápida de ácido láctico. Estos razonamientos pueden aplicarse a otros factores tales como la época del año. Así cuando el tiempo es frío los animales emplean energía en mantener la temperatura y se reducen los depósitos de glucógeno incrementando la proporción de carnes DFD. En cambio con temperaturas elevadas, al no disponer los cerdos de un eficiente procedimiento para liberar calor mediante el sudor, se incrementa la proporción de carnes PSE (69, 70). Otros factores como el sexo también afectan al estrés *ante-mortem* al generar comportamientos como la monta o cambios en jerarquía que implican estrés y cambios en la concentración de glucógeno (69). El sistema de aturdimiento genera grandes diferencias. La electroanestesia aumenta la glicolisis debida a la actividad muscular y el elevado nivel de catecolaminas en sangre (71).

Los músculos están formados por distintos tipos de fibras. Estos tipos pueden clasificarse según su capacidad contráctil y metabólica en pequeñas lentas y oxidativas (tipo I), rápidas glicolíticas y grandes (IIb) e intermedias (IIa) (72). Las proporciones de estas fibras varían en función de la genética, músculo, estado de desarrollo, ejercicio y patologías (diabetes), estando vinculadas también a los defectos descritos (73). Así las fibras oxidativas con una capacidad glicolítica menor (74) son menos proclives a producir carnes PSE, sin embargo con una intensidad de ejercicio leve pueden reducir el glucógeno dando lugar a carnes DFD (66).

La curva de bajada de la temperatura es importante ya que genera un obstáculo al desarrollo de carnes PSE bajando la cinética de las reacciones y favoreciendo el desarrollo normal de la carne (49).

### 3.4. Metabolismo muscular

Dentro del ámbito de esta tesis revisamos los mecanismos de control del metabolismo energético y proteico *ante-mortem*, su relación con el empleo de antioxidantes y sus efectos *post-mortem*. El metabolismo está fuertemente influido por las necesidades fisiológicas en cada fase del desarrollo (crecimiento en animales de producción cárnica) y la nutrición.

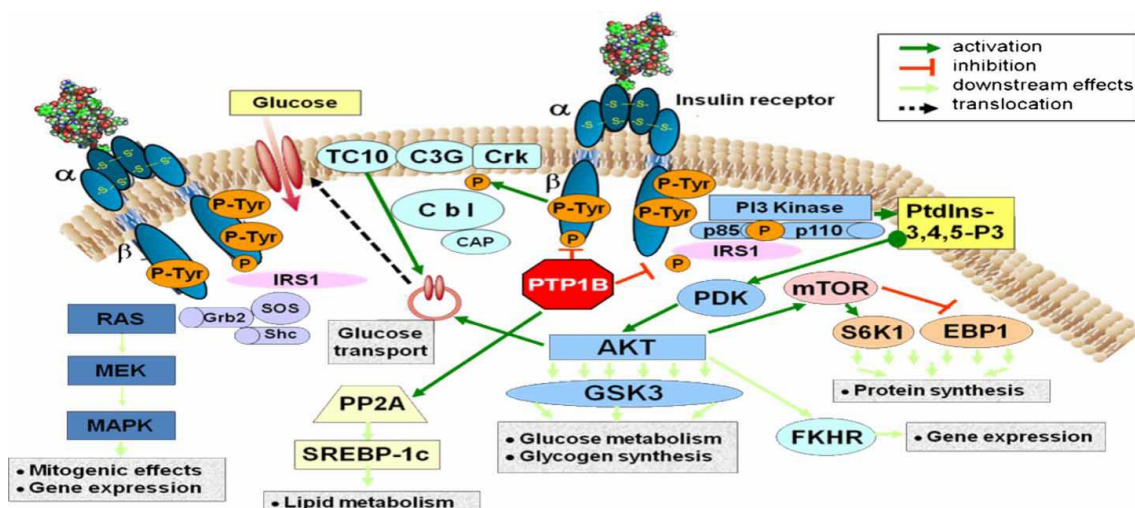
Las hormonas principales que controlan el metabolismo energético en los animales son la insulina y el glucagón, existiendo entre ambas un equilibrio que permite al organismo mantener unos niveles de glucosa en sangre estrechos (75). La insulina se libera de manera postprandial cuando la glucosa en sangre alcanza un nivel elevado (76). Esta liberación genera una cascada de reacciones a nivel fisiológico que conlleva una absorción incrementada por

parte de los adipocitos, las células musculares e hígado de la glucosa sanguínea. Esto se complementa con un incremento de la lipogénesis y el almacenaje de glucógeno, reduciéndose también el consumo de proteínas por parte de las células musculares (75).

El mecanismo de acción de la insulina así como la necesidad del balance antioxidante queda reflejada en la revisión realizada por Mueller y colaboradores en 2009 (77). El receptor de la insulina en las células musculares está compuesto por dos subunidades extracelulares ( $\alpha$ ) y dos unidades transmembrana ( $\beta$ ) unidos por puentes disulfuro (Figura 6). La unión de la insulina a la unidad  $\alpha$  implica un cambio conformacional que genera la autofosforización de residuos tirosina de la subunidad  $\beta$  (78). Esta activación conlleva la fosforilación de residuos de las proteínas receptores de la insulina (IRS), algunas de las cuales son homólogas al dominio 2 de la proteína Src de la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). La subunidad catalítica de ésta (p110) fosforila el fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PI4.5-P<sub>2</sub>) a fosfatidil inositol trifosfato (PTD-3,4,5-P<sub>3</sub>) que recluta a la proteína quinasa b (AKT) a la membrana plasmática donde se fosforila por la quinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK1). El Akt activado vuelve al citoplasma donde fosforila e inactiva a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) que aumenta el depósito de glucosa en forma de glucógeno (79). Así la insulina controla la activación de distintas enzimas mediante la fosforilación/defosforilación. La insulina también activa la adquisición de glucosa por la célula mediante la translocación del transportador de glucosa GLUT4 de vesículas intracelulares a la membrana plasmática. Otros efectos de la activación de la Akt es la interacción con el receptor de la rapamicina mTOR que activa la síntesis proteica (80).

La insulina promueve la incorporación de ácidos grasos y la síntesis de lípidos inhibiendo además la lipólisis (77). La síntesis de lípidos requiere un aumento en el factor de transcripción de esteroides SREBP-1c desconociéndose los factores que generan estos cambios (77).

El estrés oxidativo asegura una función óptima de la insulina en tejidos sensibles a la misma. Así, la unión de la insulina con su receptor supone la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que contribuye a la inhibición del PTP1B. La proteína fosfatasa de tirosina que es parte del mecanismo de terminación de la señal de la insulina defosforilando el receptor  $\beta$  y los IRS1. Una sobreexposición a glucosa genera estrés oxidativo por la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generando resistencia en la insulina. Queda patente por tanto la necesidad de un balance entre sustancias antioxidantes y oxidantes para la actividad normal de la célula.



**Figura 6.** Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo.

*El IR activo y autofosforilado, activa a IRS la cual contiene varios lugares de fosforilación en residuos de Tyr (Y) que al ser fosforilados por el IR, se convierten en lugares de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH<sub>2</sub> como PI3K. La PI3K consta de una*

subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P2, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P3, que sirve como sitio de unión para quinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en la Ser473 que es seguida por una fosforilación en la Thr308, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9 (77, 81).

### 3.4.1. Proteínas

Los músculos realizan gran cantidad de funciones mecánicas como la locomoción, el equilibrio, la respiración e incluso la reproducción. Otras funciones menos directas del sistema muscular son la termorregulación y la ayuda a la circulación linfática y sanguínea. La contracción muscular es un proceso fisiológico por el cual el músculo se acorta y transmite la tensión o simplemente mantiene su tono. La adaptación a esta multifunción requiere una estructura proteica con características muy especiales (82).

#### 3.4.1.1. Estructura de las proteínas

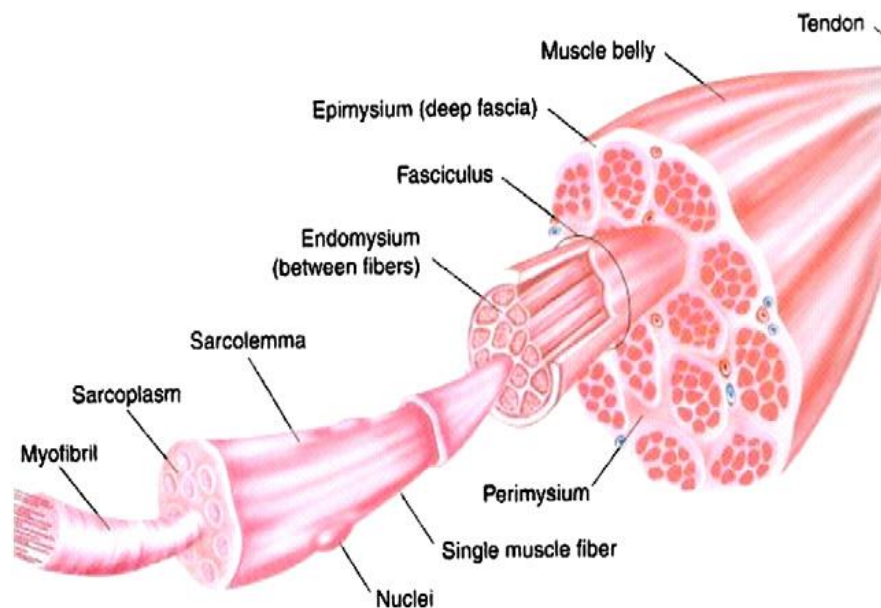
Las proteínas que están en el músculo se clasifican en base a su solubilidad en: sarcoplásmicas (solubles en agua) miofibrilares (soluble en soluciones salinas) y estructurales (solubles en ácidos o soluciones salinas que forman parte del tejido conectivo) (83). Esta clasificación por solubilidad también responde a criterios de funcionalidad.

##### 3.4.1.1.1 Tejido conectivo asociado

El tejido conjuntivo intramuscular (IMCT) debe garantizar la correcta transmisión de las fuerzas realizadas por el músculo minimizando el gasto energético. El IMCT es un tejido altamente organizado que evoluciona con la edad del animal. Se desarrolla a la vez que las fibras musculares y debe adaptarse a la hipertrofia muscular así como a la acumulación de grasa intramuscular (84). Este tejido varía en contenido y estructura según músculos, especies, genética y edad (49).

Existen diferentes capas de tejido conjuntivo (Figura 7), la más externa que envuelve al músculo es el epimisio y está compuesto por gruesas láminas de fibras de colágeno. Por dentro, separando el músculo en fascículos encontramos el perimisio que contiene los grandes vasos sanguíneos y está compuesto por láminas de colágeno con un patrón ondulado (84). Estos fascículos están formados por varias fibras musculares que se encuentran a su vez rodeadas por su propio tejido conjuntivo, el endomisio, que forma una capa íntimamente relacionada con el músculo compuesta por redes de colágeno (84). La membrana basal, compuesta en un 40% por colágeno y algunos polisacáridos complejos, une el tejido conjuntivo con la membrana muscular (49). Estas tres capas se juntan en las uniones de los músculos formando los tendones, agregados masivos de tejido conjuntivo que unen el músculo al esqueleto y transmiten la fuerza (49). Más del 90% del colágeno intramuscular está localizado en el perimisio (85), junto con la mayoría de los adipocitos intramusculares. Es patente que la arquitectura general del IMCT es un importante factor en la determinación de la dureza de la carne que puede verse modificado por la acumulación de adipocitos en el perimisio que desorganizan la estructura del IMCT y por tanto aumentan la ternura (84).

El tejido conectivo está compuesto principalmente por colágeno, seguido de elastina, proteoglicanos y glicoproteínas. Estas dos últimas proteínas glicosiladas presentan una fuerte carga negativa que permite una fuerte repulsión y estructura extendida capaz de retener agua.



**Figura 7.** Estructura del músculo y la localización de los compartimentos con agua: compuestos intramiofibrilares y extramiofibrilares. Composición de agua intermiofibrilar, intrafascicular y extrafascicular (86).

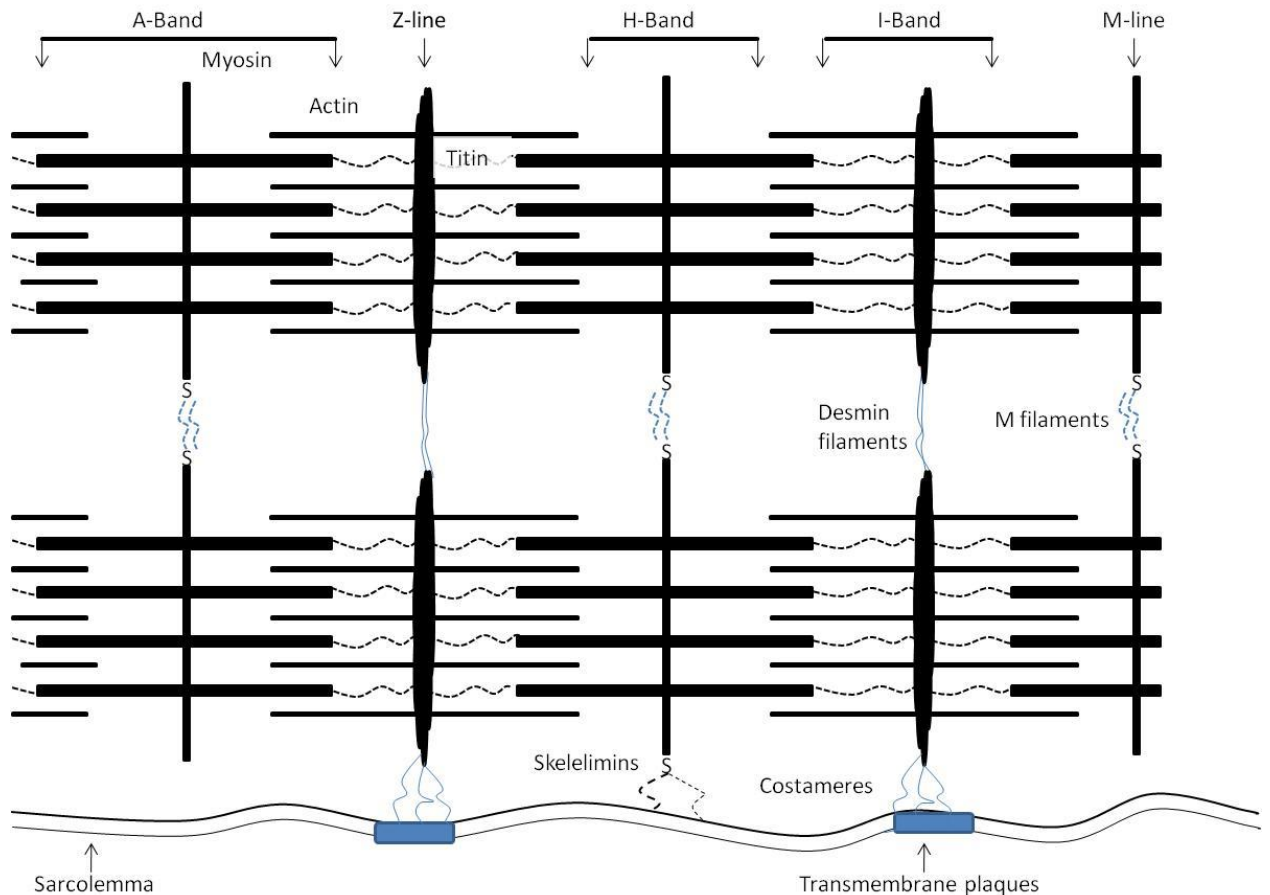
#### 3.4.1.1.2. La fibra muscular

Las fibras musculares son células largas multinucleadas que se originan en etapas incipientes de la vida por la fusión de varias células. Su longitud puede alcanzar los 34 cm, con un diámetro variable de 10-100  $\mu\text{m}$  (87) en función del tipo de fibra así como de muchos otros factores como la genética, epigenética, dieta, ejercicio etc.

El endomisio rodea al sarcolema, que es la membrana de la célula muscular. Dentro del sarcolema se encuentran las miofibrillas rodeadas de la fase líquida o sarcoplasma (Figura 8). Las organelas de la célula están adaptadas a las funciones del músculo y tipo de fibra. Estas incluyen una alta proporción de mitocondrias para la producción de energía (especialmente en las fibras rojas o tipo I), vacuolas de grasa que se estima suponen el 20 % de la GIM, con una mayor proporción en fibras tipo I (88), lisosomas con enzimas catabólicas, peroxisomas con acil oxidasas grasas y catalasa y el retículo sarcoplásmico.

El músculo está unido al epimisio de una manera continua por dos grupos de proteínas, las distrofinas y las integrinas. Los complejos de adhesión de la integrina en la superficie contienen gran cantidad de proteínas señal como la talina, actina, vinculina y varios tipos de quinasas (89).

La visión longitudinal del músculo con un microscopio de luz muestra una estructura en la que las fibras se cruzan en paralelo por estriaciones (músculo estriado). Al incrementar los aumentos se hace visible una estructura repetida. Existen tres bandas según la estriación; un área oscura conocida como banda A, dentro de ésta, una zona central ligeramente más clara que corresponde con la banda H y una zona más clara entre bandas A que es la banda I, con una gruesa división intermedia que es el disco Z. El sarcómero se define como el área entre dos líneas Z.



**Figura 8.** Estructura esquemática de una sección de sarcómero. Adaptado de (49, 90).

La banda A corresponde a la zona de los filamentos gruesos, compuestos principalmente por moléculas de miosina y la línea M. La miosina es una molécula alargada de 1500 Å con forma de palo de golf. Esta molécula forma el filamento grueso al integrarse con más moléculas de miosina (hasta 200) con las partes alargadas de las moléculas superpuestas y alcanza en conjunto una longitud de hasta 1.5 µm. La molécula de miosina está compuesta por dos unidades aparentemente idénticas, cada una formada por una cola (meromiosina ligera) un collar (meromiosina pesada S2) y una cabeza (meromiosina pesada S1). La agregación de las moléculas para la formación del filamento pesado se realiza de una manera organizada, repitiendo la dirección de las cabezas de miosina hacia los 6 filamentos delgados que la rodean de una manera constante.

La línea M se encuentra en la parte central de los filamentos de miosina. Está compuesta por filamentos M que son moléculas de miosina y proteína M que anclan perpendicularmente la miosina a los 6 filamentos finos a la vez que cimienta uniendo los filamentos gruesos. Los filamentos M están unidos entre sí a través de puentes M que mantienen los filamentos gruesos centrados.

La banda I está compuesta principalmente por los filamentos delgados y el disco Z; estos están anclados a él comenzando desde su estructura. Los filamentos finos consisten en dos cadenas de actina. La actina es una proteína esférica compuesta por dos subunidades. A lo largo de la cadena también encontramos tropomiosina, una proteína compleja con tres subunidades (49) que se mantiene a ambos lados de los polímeros de actina junto con otras moléculas de alta importancia fisiológica, las troponinas.

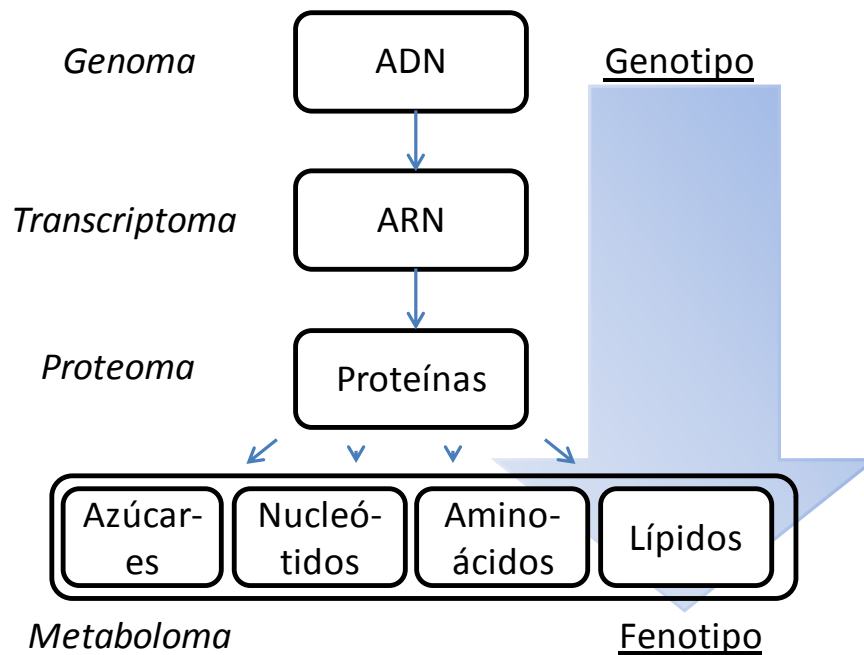
Hay proteínas importantes que ayudan a mantener la estructura, facilitar su construcción o regular la función del músculo.

Las miofibrillas están ancladas lateralmente al sarcolema y otras miofibrillas en la banda I a través de filamentos transversales intermedios que incluyen proteínas como la desmina, filamina, talina y vinculina (Figura 8). La desmina está localizada en la periferia del disco Z conectando los discos de miofibrillas adyacentes (91) y conectando los discos Z con otras estructuras como el sarcolema manteniendo de esta manera la estructura. Esta proteína es muy proclive a la proteólisis durante las primeras 24 h tras el sacrificio. Cuando se incluye la degradación de la misma en modelos de regresión para predecir las pérdidas por goteo (incluyendo la temperatura de refrigeración, el color y la velocidad del descenso del pH post mortem) es la variable que aporta más robustez a la ecuación, explicando el 24 % de la variación (92).

Por otra parte, los filamentos gap (hueco) que se visualizan cuando se sobreestira la fibra muscular, están formados por dos proteínas principales, la titina y la nebulina (Figura 8). La titina es una de las proteínas mayores conocidas, con un peso superior a 3000 kDa. Juega un papel importante en la organización del sarcómero y mantiene su estructura en la contracción, posiblemente manteniendo cierto grado de tensión que permite la correcta localización de los filamentos gruesos en el centro del sarcómero. Esta proteína se extiende desde la línea M (la parte terminal C) desarrollándose helicoidalmente alrededor del filamento grueso y terminando en el disco Z adyacente (la parte terminal N). Su longitud es equivalente a medio sarcómero (2-2.5  $\mu\text{m}$ ), actúa como patrón para la generación de miofibrillas y presenta sitios de unión específicos para ligandos sobre ella, entre otros las calpaínas cerca de la banda I y la línea M, cambiando el punto de unión según su estado de contracción (82). La nebulina por su parte es también una proteína grande (cerca de 800 kDa) localizada cerca del disco Z que contribuye a la unión de la titina con ella.

#### *3.4.1.2. Síntesis y degradación de proteínas*

El dogma central de la biología molecular (Figura 9) se centra en el flujo de información del ADN hasta las proteínas (93), influyendo múltiples factores de regulación hormonales, genéticos, nutricionales (nutrigenética) y epigenéticos. Dentro de este esquema de síntesis, las proteínas miofibrilares presentan algunas adaptaciones específicas. Dado el tamaño de algunas de estas (titina, nebulina, miosina), los ribosomas para la formación de las proteínas forman grupos de 50-60 partículas (polisomas) (94), mientras que proteínas menores se generan a partir de menores polisomas o ribosomas.



**Figura 9.** Dogma central de la biología molecular, transferencia de información y productos de estudio por fase (88).

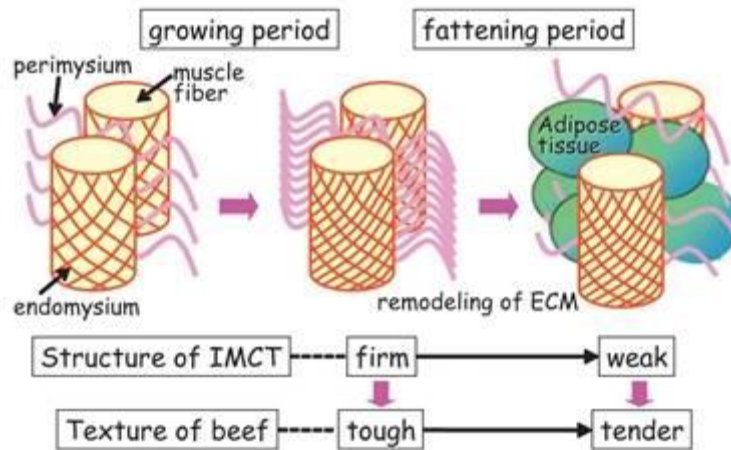
La síntesis proteica en las células estriadas musculares sigue la activación del receptor de la rapamicina mTOR. Esto se obtiene mediante estimulación nutricional o ejercicio (95), que conlleva la fosforilación del Akt, también activada por la insulina y que suprime el complejo supresor de tumores generando una activación tras varias reacciones de la traducción proteica (95).

#### 3.4.1.2.1. Tejido conjuntivo asociado

El tejido conjuntivo asociado intermuscular (IMCT) proviene de células mesenquimales, fibroblastos, fibrocitos y adipocitos. Los fibroblastos producen la matriz extracelular compuesta principalmente por colágeno y otras macromoléculas que conforman la estructura de la matriz (el estroma).

La estabilidad del tejido conjuntivo aumenta con el crecimiento animal, siendo la mayoría de los entrecruzamientos sensibles al ácido y el calor. Estos enlaces entre moléculas de colágeno se transforman en enlaces más estables con la edad. La arquitectura tridimensional del tejido conjuntivo intramuscular es importante en la determinación de la estructura de la carne al estar íntimamente relacionada con la dureza del tejido (96).

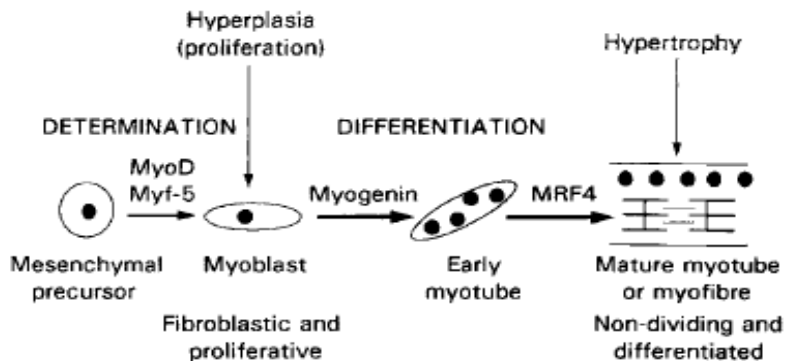
Los adipocitos, que se estima contienen un 80 % de la grasa intramuscular (88), también generan cambios en la estructura de la carne (Figura 10). Así al crecer interactúan con el endomisio interfiriendo con su estructura y separando las láminas de perimisio (96).



**Figura 10.** Efecto de la acumulación de grasa intramuscular en la estructura del tejido conjuntivo intramuscular (97).

### 3.4.1.2.2. Proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares

Las células del músculo provienen de los somitas mesodérmicos que se diferencian generando células fusiformes que en un estado posterior se unen formando las miofibrillas (98) (Figura 11). En la embriogénesis existe un orden de formación que comienza con la titina que funciona como patrón para el resto de moléculas. El proceso sigue secuencialmente con la miosina, actina, la nebulina y finalmente el resto de proteínas reguladoras de la contracción (99). Tras la realización de la estructura, finalmente se generan las adhesiones intracelulares (integrinas) y extracelulares (49).



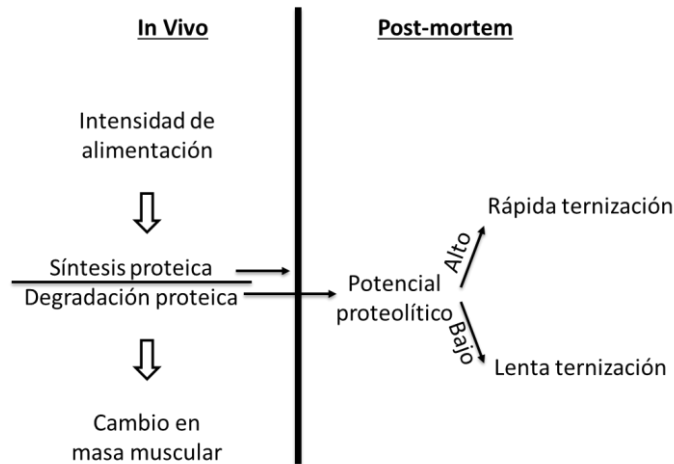
**Figura 11.** El crecimiento y diferenciación del músculo estriado (100).

La masa muscular queda definida por la hiperplasia (aumento en el número de células) y la hipertrofia (aumento en tamaño de las células). Aunque ambas determinan el producto final, la hiperplasia se produce principalmente de manera prenatal, dejando la mayor parte del crecimiento posterior al incremento del tamaño celular (100). Dado esto, uno de los principales determinantes del tamaño muscular es el balance entre la síntesis proteica y la degradación. Recientemente se ha descubierto que el mismo Akt/mTOR también inhibe la degradación proteica (101) implicando la interrelación en el control de la síntesis y degradación proteica. Este mecanismo se encuentra también regulado por la insulina.

Mediante el control de los diferentes factores de producción animal tales como aporte de nutrientes, o el control de factores de regulación, se pueden generar tres posibles escenarios que dan lugar a hipertrofia muscular por incremento de la masa proteica (Figura 12):

- Aumento de la síntesis proteica y disminución de la degradación.

- Aumento simultáneo de la síntesis y la degradación proteica (con un mayor incremento de la síntesis y por tanto un balance donde predomina el anabolismo).
- Disminución de la síntesis y de la degradación proteica con una menor reducción en la síntesis y por tanto con un balance anabólico.



**Figura 12.** Factores que afectan la proporción de síntesis y degradación proteica y principales resultados in vivo y *post-mortem* (102).

Existe un número considerable de estudios que ponen de manifiesto la importancia de la nutrición en la síntesis y degradación proteica. En términos generales, la optimización del aporte de aminoácidos y su equilibrio en función de las necesidades específicas para cada fase del crecimiento permiten optimizar los procesos de síntesis (103), aproximándose al máximo valor teórico del animal para carga genética, edad o sexo (104). Para ello es preciso un aporte simultáneo y también equilibrado de energía de modo que sólo existe una relación entre aminoácidos (concepto de proteína ideal) y una relación energía /proteína que optimiza el proceso de síntesis proteica (104).

Se ha podido demostrar experimentalmente que un aumento en el aporte de nutrientes incrementa la síntesis proteica con una respuesta lineal en un principio hasta alcanzar una zona de respuesta decreciente que culmina en una fase de meseta que se ajusta a un modelo exponencial característico. Es interesante señalar que los incrementos en el aumento de nutrientes producen un aumento de la síntesis, pero también un incremento de los procesos proteolíticos, con un balance general anabólico. Según su proximidad a la zona de máxima respuesta, en determinadas circunstancias una restricción alimentaria puede permitir reducir la síntesis y la degradación y producir un balance final incluso más anabólico. Ello es debido a que los cambios regulativos que implican la transición entre un plano u otro de alimentación precisa un tiempo de adaptación de las enzimas responsables de la síntesis y diferenciación proteica.

Todo ello puede permitir modificar profundamente el potencial proteolítico del animal, con importantes consecuencias sobre el crecimiento y eficiencia alimentaria (base del denominado crecimiento compensatorio) y también sobre las propiedades tecnológicas de la carne (al modificar el potencial proteolítico *post-mortem*) y particularmente en la capacidad de retención de agua.

Por otra parte es bien conocido que los promotores del crecimiento pueden generar un cambio en este equilibrio. Así tenemos los  $\beta$ -adrenérgicos como el salbutamol y el clenbuterol (105) que presentan un efecto negativo en la CRA. Mientras la somatropina presenta el efecto contrario con una mayor capacidad de retención de agua (106).

La síntesis proteica implica la formación de complejas proteínas que deben alinearse en la estructura e integrarse de manera específica según el tipo de fibra (49).

Las proteínas sarcoplásmicas están formadas por una gran variedad de proteínas que permiten al músculo realizar las funciones fisiológicas de células normales como proteínas específicas del músculo, incluyendo la maquinaria para la formación y degradación de las proteínas sarcoplásmicas. Las principales proteínas por cantidad en el sarcoplasma son la mioglobina, la albúmina, la enolasa, la creatin quinasa y la glicerol fosfato deshidrogenasa (107).

La inflamación de los tejidos después del daño celular conlleva una intensa eliminación de las estructuras afectadas seguida de la restauración en la zona. En este caso de rotura traumática, las enzimas implicadas son producidas principalmente por macrófagos y otras células de la línea blanca (108), siendo este proceso diferente del implicado en la renovación constante o recambio proteico.

La mayor parte de las proteínas musculares se encuentran en los miofilamentos formando una compleja estructura que requiere un sistema específico para su regeneración. Este complejo sistema de mantenimiento no es plenamente comprendido, pero existen algunas hipótesis sobre el mismo (83). Goll y colaboradores (1992) propusieron un modelo en el que la fibra mantenía su funcionalidad, pero que permite únicamente la regeneración de las capas externas (109). En este modelo el primer paso es la descomposición de las miofibrillas en miofilamentos estos se denominan filamentos fácilmente liberados (Easily Released Myofilaments ERM) (110), habiéndose demostrado ya que los tratamientos que incrementan la renovación de miofibrillas incrementan la fracción ERM (111), al igual que los tratamientos que aumentan la actividad de la calpaína (112).

Únicamente las calpaínas son capaces de hacer las roturas específicas en los miofilamentos por un mecanismo pendiente de elucidar. En un paso posterior las enzimas lisosomiales, peptidasas unidas a membrana y/o el complejo proteasoma continúan con la degradación de las proteínas en aminoácidos (113).

Esta hipótesis mantiene sin resolver la explicación del mecanismo de la renovación de los filamentos centrales que no presentarían renovación y pasarían a ser “inmortales”.

### **3.4.1.3. Catabolismo Post-mortem**

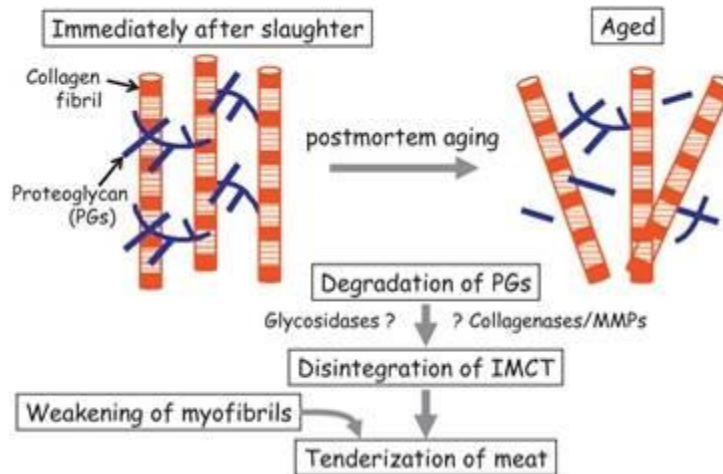
#### **3.4.1.3.1. Tejido conjuntivo asociado**

Los modelos tradicionales de textura y capacidad de retención de agua han asumido que el IMCT se mantenía estable durante la carnización y la maduración *post-mortem* centrándose principalmente en las miofibrillas (84) al no presentarse durante la misma un aumento de la hidroxiprolina soluble. No obstante, algunos estudios recientes muestran que la dureza del perimio disminuye durante la maduración (97) (Figura 13), aunque este factor no se ha comprobado en la carne cocinada.

Este mecanismo no es conocido, pero algunas enzimas como las lisosomiales y las metaloproteasas han mostrado actividad *in vitro* (114).

El tipo y cantidad de proteoglicanos asociados son importantes ya que determinan la susceptibilidad del colágeno a la digestión enzimática (115). Los proteoglicanos (PGs) de la membrana basal y el perimio son degradados durante la maduración e incluso se ha propuesto que la ruptura del péptido y carbohidrato contribuyen a la ternura y a la CRA (116).

Al igual que se ha señalado con otras proteínas cárnicas, se puede especular que un tejido conectivo menos organizado permitirá una mayor retención de agua al quedar más expuestos fragmentos con carga y desorganizas las estructuras de tensión durante el período *post-mortem* (49).



**Figura 13.** Representación esquemática de los cambios en el IMCT durante la maduración (97).

### 3.4.1.3.2. Proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas

La ruptura proteica tras el sacrificio puede evidenciarse estructuralmente ya que las uniones de las mismas al sarcolema o entre ellas quedan interrumpidas en el disco Z y línea M (91). Esto implica la rotura de proteínas citoesqueléticas como los costámeros (desmina, distrofina, vinculina).

Los eventos proteolíticos que ocurren durante la maduración involucran a diferentes proteasas como las calpaínas, las catepsinas, las caspasas y el proteosoma. Esta acción es seguida por la de las peptidasas (dipeptidil peptidasas, tripeptidil peptidasas, carboxipeptidasas) que generan péptidos pequeños. Finalmente se generan aminoácidos libres por la acción de las aminopeptidasas y di tri peptidasas del músculo (117)

Actualmente existen muchos estudios que han encontrado mediante el estudio del proteosoma (electroforesis en 2D, MALDI-TOF MS) otras proteínas que experimentan la ruptura durante la maduración en la carne de cerdo, especialmente en el *longissimus dorsi* (LD). Existen muchos péptidos identificados, así en la revisión realizada por Bendixen en 2005 (107) destacan dentro de las que mayor variación tienen en el metabolismo *post-mortem* proteínas estructurales como la actina, la miosina, la troponina T y proteínas de interés metabólico como la piruvato quinasa, la miokinasa y la glucógeno fosforilasa.

Como se ha señalado, los músculos esqueléticos varían en la proporción de tipos de fibras y la composición, entre otras de la cantidad de grasa y mitocondrias. Esta variación se corresponde también con variaciones en las isoformas de las proteínas (118). Estas a su vez, muestran diferentes comportamientos sobre el metabolismo, glicólisis y desarrollo del rigor mortis que por sí mismas alteran el desarrollo de la proteólisis (49). La concentración de  $Ca^{2+}$  en músculo blanco aumenta más que en músculo rojo y el pH cae más rápido (49) presentando una concentración mayor de glucógeno residual tras la glicolisis. Estos factores (mayor calcio y pH) favorecen la proteólisis (119).

Las diferencias en las proteínas y su susceptibilidad a ser degradadas en los productos finales generados durante la proteólisis implica diferencias (120), siendo un buen ejemplo de ello la Troponina T (Tn-T). La Tn-T presenta dos diferentes formas: la lenta (sTn-T) y la rápida (fTn-T), estando ambas presentes en las fibras tipo IIb, pero expresando únicamente sTnT en las tipo I. La degradación de la Tn-T evoluciona más rápidamente en las fibras tipo IIb que en las tipo I (120).

Los músculos de alto potencial glicolítico presentan un mayor grado de desnaturalización proteica (121), sin estar claro si esto facilita o reduce la proteólisis.

No se han encontrado diferencias entre la actividad de las catepsinas entre los distintos tipos de fibras musculares (122).

#### 3.4.1.3.3. Proteólisis

Dadas las características del músculo durante el período de resolución del rigor mortis, para que este se produzca, las proteasas deben ser endógenas, con acceso a las miofibrillas, ser capaces de reproducir los cambios proteolíticos observados en las miofibrillas *post-mortem* (113) y todo esto sin poder consumir ATP (88). Existen cuatro sistemas proteolíticos posibles que cumplen estas condiciones: las calpaínas, catepsinas, el proteasoma y las caspasas. Probablemente el más importante es el sistema que involucra a las calpaínas pero la contribución de los otros todavía debe ser elucidada (123).

La proteólisis varía según la especie, así en un estudio comparativo con LD las velocidades de proteólisis estimada como terneza incrementaron diariamente 0.17, 0.21, 0.25, y 0.33% respectivamente en ternera, cordero, conejo y cerdo (124).

El aumento en péptidos se produce por la acción de proteasas como las calpaínas y catepsinas, mientras que el aumento de los aminoácidos resulta de la acción de aminopeptidasas, enzimas con un pH óptimo cercano al pH neutro (125, 126).

La relación entre el pH y la proteólisis es compleja (127). En un estudio desarrollado con cordero, la proteólisis mínima se encontró a pH 6 mientras que la fragmentación miofibrilar tuvo lugar a pH 6.4. Las enzimas tienen un pH óptimo y cuanto más lejos están de éste, menor es su actividad. No obstante muchos factores pueden influir ya que algunas enzimas necesitan liberarse de los lisosomas (catepsinas) mientras otras son activadas con una bajada de pH rápida como las calpaínas (128).

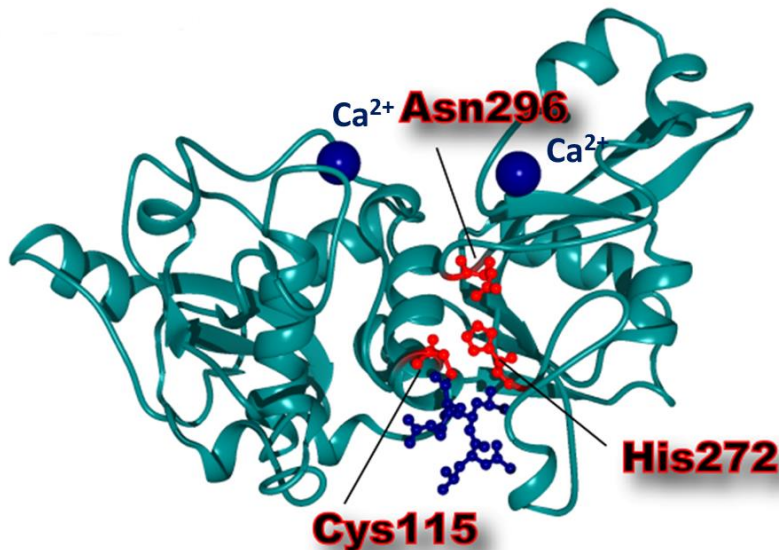
La temperatura óptima es de 37°C (129) y disminuye en la medida que nos alejamos de la misma. El contenido de péptidos y aminoácidos libres durante el proceso de maduración varía entre los diferentes tipos de carne atendiendo a su calidad RFN, PSE; DFD y RSE (130). Toldrá y colaboradores en el 2000 (131) detectaron una mayor actividad proteolítica en carnes DFD a las 2 y 24 h post mortem. La rotura de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares conduce a un aumento de la fracción soluble (49) en la que no llega a existir un incremento de péptidos al presentar la carne DFD también un aumento de la actividad aminopeptidasa (131), produciendo un incremento de los aminoácidos libres, especialmente lisina (Lys), alanina (Ala) y metionina (Met) probablemente debido principalmente a la activación de las aminopeptidasas neutras (130). En general, la proteólisis conduce a un incremento de la viscosidad y el contenido proteico del fluido sarcoplasmático que refuerza la hipótesis de la esponja que se menciona más adelante.

#### *El sistema calpaína*

El sistema calpaína está formado por varias isoformas de cistein proteinasas dependientes del calcio (calpaínas) y su inhibidor específico, la calpastatina (132). Hay tres formas de calpaína en el músculo, la m-calpaína, la  $\mu$ -calpaína y la p68 aunque únicamente las dos primeras se considera que presentan un papel relevante *post-mortem*. Todas ellas presentan su actividad óptima en el pH cercano a la neutralidad (82, 133, 134).

La m-calpaína, la  $\mu$ -calpaína degradan la desmina, sinemina, talina, vinculina así como la titina y nebulina (135, 136) sin hidrolizar cantidades significativas de actina y miosina. Estas enzimas abundantes están localizadas principalmente cerca de la línea Z (109) y difieren en la concentración de calcio requerida para la actividad media máxima, siendo entre 5 y 65  $\mu\text{M Ca}_2^+$  para la  $\mu$ -calpaína y entre 300 y 1000  $\mu\text{M Ca}_2^+$  para la m-calpaína (109). La concentración máxima que se espera encontrar en la carne es entre 210 y 230  $\mu\text{M}$ , no suficiente para una alta

actividad de la m-calpaína y dejando a la  $\mu$ -calpaína como la más activa de ambas (137). Otros requerimientos para la actividad máxima tampoco se encuentran *post-mortem* al existir condiciones de bajo pH (entre 5.4 y 5.8), un aumento de la fuerza iónica y pérdida de las condiciones reductoras que suponen una menor actividad (135, 138). Las alteraciones en la fuerza iónica y pH pueden suponer cambios conformacionales en las enzimas que conlleven una mayor hidrofobicidad (aumentando su especificidad hacia las miofibrillas) y generando la agregación de la enzima o cambios en la conformación de los sustratos haciéndolos menos susceptibles (138). Esto implica que las condiciones in vivo son las más favorables para la expresión máxima de actividad.



**Figura 14.** Estructura tridimensional del dominio II de la proteasa  $\mu$ -calpaína con  $\text{Ca}^{2+}$  (bolas azules oscuras). El  $\text{Ca}^{2+}$  se une en la parte superior del centro catalítico que consiste en Cys 115, His 282, y Asn 296 (139).

Ambas calpaínas son heterodímeros (Figura 14) compuestas por dos subunidades (80 kDa and 28kDa), siendo cada subunidad codificada por genes diferentes (140). La fracción de 28kDa es igual en ambas calpaínas y la parte terminal C de esta proteína parece la estructura ligante de calcio mano E-F pero con función desconocida. La subunidad de 80kDa presenta 4 dominios:

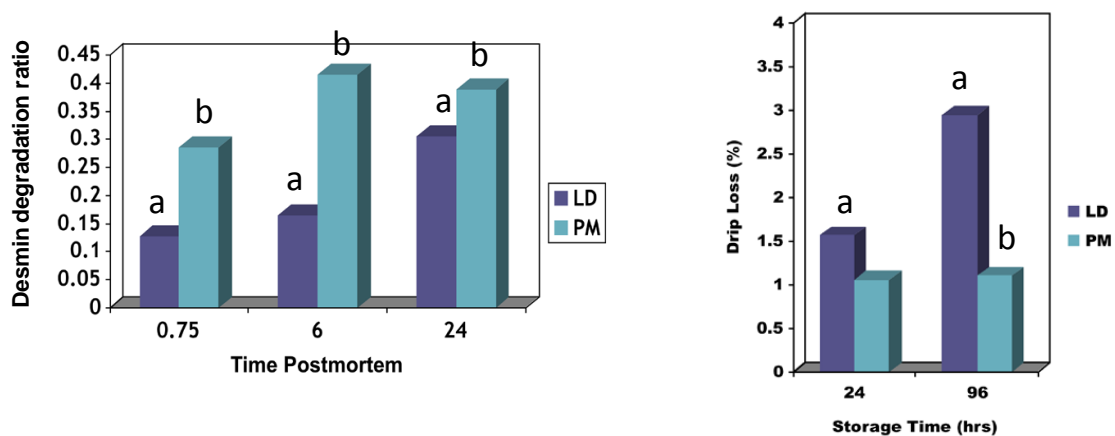
- El dominio I tiene la terminación N y no presenta homología con genes conocidos.
- El dominio II es el catalítico conteniendo los residuos cisteína e histidina en la misma posición que todas las cistein proteasas.
- El dominio III tampoco presenta homologías con péptidos conocidos pero presenta secuencias que son similares a la mano ligante de calcio E-F (132).
- El dominio IV tiene secuencias que predicen secuencias mano ligante de calcio E-F.

Los fragmentos del dominio II pese a ser catalítico no presentan actividad por si mismos (141). Esto nos obliga a revisar las necesidades específicas de la enzima en el estado conformación necesario para expresar su actividad (142).

Durante la activación de la m-calpaína y la  $\mu$ -calpaína se unen entre 11 y 20 átomos de calcio y 5 y 8 respectivamente (132). Este calcio comienza a unirse a los dominios E-F resultando cambios en la conformación y la autólisis de la subunidad pequeña (143). Esta lisis reduce los tamaños de las subunidades de la m-calpaína a 78 kDa y 18kDa, mientras que en la  $\mu$  calpaína se reducen a 76kDa y 18 kDa. Una pequeña autólisis (como la expuesta) reduce entre el 80 y el 90% las necesidades de calcio para alcanzar la actividad máxima media, mientras una lisis mayor supone la pérdida completa de actividad (144). Otras condiciones que llevan a diferentes necesidades de calcio es la unión de fosfolípidos a proteínas activadoras (145-147).

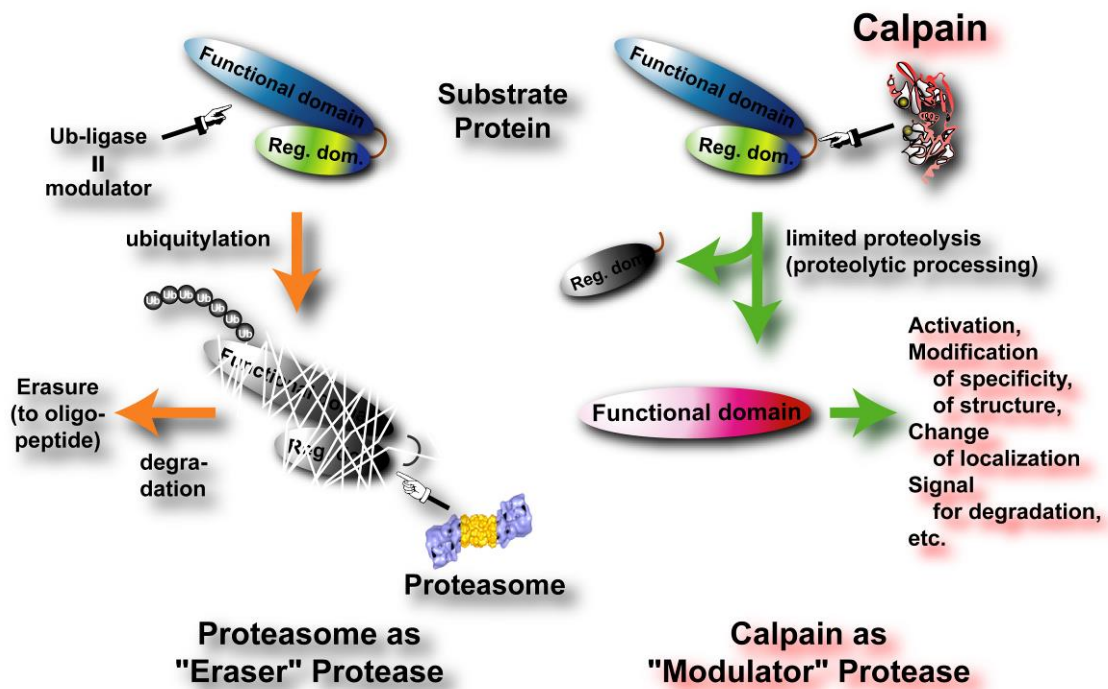
Los residuos de Cisteína (Cys105), Asparraguina (Asp262) y la Histidina (His286) forman la tríada proteolítica. Ésta necesita presentar una distancia de 3.7Å para estar activa, consiguiendo la misma a través de los cambios conformacionales expuestos anteriormente. Así el residuo His se une al hidrógeno del grupo tiol del Cys aumentando su carga negativa. El residuo Cys es nucleofílico y ataca los enlaces peptídicos (148).

La rotura de las proteínas citoesqueléticas comienza muy pronto tras el sacrificio, con la desmina degradándose incluso a los 45' tras sacrificio. Ello permite a algunos músculos mantener más agua y permite al potencial exudado mantenerse en la célula (Figura 15). Esto genera diferencias en la CRA de los músculos (149). Esta rotura está muy relacionada con la activación de la calpaína (54), estando correlacionada la rotura de la desmina con la proporción de calpaína autolisada (76kDa) con una  $r = 0.349$  en el primer día que incrementa con el tiempo. Así también hay relación entre el nivel de Desmina intacta con la proporción de calpaína no autolisada (80kDa). La realización de un modelo incluyendo la temperatura a 4h y 24hr y el porcentaje de la subunidad grande de la  $\mu$ -calpaína autolisada (76 kDa) explica el 52.5 % de la variación en la destrucción de la desmina (92). Un descenso moderado pero de suficiente magnitud en el pH post mortem (definido como pH 5.7 a las 3 horas) favorece la autólisis y proteólisis (128). Los músculos que presentan este descenso también presentan mayor CRA y aumento de la proteólisis (150). La velocidad de descenso debe ser necesariamente moderada, para evitar el resultado de carnes PSE ya que en este caso no se produce la proteólisis de un modo adecuado sino una rápida desnaturalización de las proteínas (151). Es conveniente recordar que las calpaínas son sensibles a pH ácido. Otros autores han destacado la importancia de la temperatura actividad de la calpaína y la necesidad de realizar más estudios para el esclarecimiento pleno de estas interacciones (152).



**Figura 15.** Proteólisis temprana *post-mortem* en *longissimus dorsi* (LD) y *psoas mayor* (PM) y pérdidas por exudado (149).

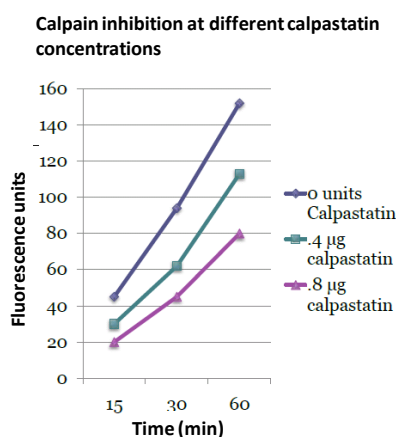
La proteólisis generada por la calpaína es limitada y se considera que se trata de una proteasa moduladora que gobierna distintas funciones como la transducción proteica y la morfogénesis celular. Los mecanismos de esta actividad no están completamente elucidados. Parece que la calpaína puede reconocer la forma 3D de los sustratos, siendo las protein quinasas, fosfatasa, fosfolipasas, proteínas citoesqueléticas, de membrana, citoquinas y calmodulinas sus sustratos sugeridos *in vivo* (153-155). La proteólisis también presenta función moduladora al hidrolizar puntos interdominio dejando funcionales las proteínas resultantes (156, 157). Esta diferencia es importante respecto de otras proteasas como las catepsinas y el proteasoma que degradan completamente los sustratos en péptidos pequeños o incluso aminoácidos (Figura 16).



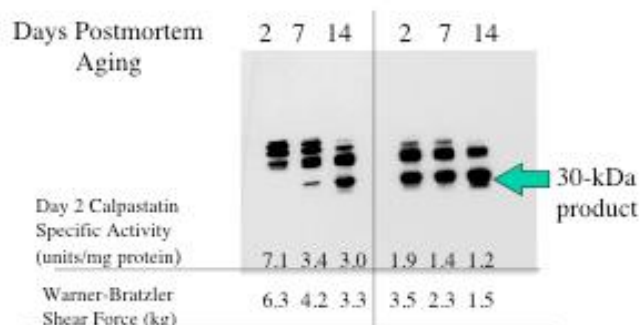
**Figura 16.** Modulación por proteasas "borradoras" y moduladoras. La proteólisis limitada de las Calpaínas modula la actividad, especificidad, estructura y vida media (fuente: [www.calpain.org](http://www.calpain.org)).

Como resumen, teniendo en cuenta la mayoría de los artículos recientes revisados, la activación de la calpaína desempeña un papel esencial en el músculo *post-mortem* y es por tanto prioritario conocer los factores de regulación y conseguir condiciones favorables que permiten su activación durante los momentos iniciales, para así conseguir una óptima hidrólisis de la desmina.

La calpastatina está en todos los tejidos que contienen calpaína. También requiere calcio, pero la concentración necesaria para alcanzar su actividad media máxima es menor que la de la calpaína no autolisada (158). La calpastatina tiene la capacidad de unir varias moléculas de calpaína (Figura 17 y Figura 18), pero de manera reversible ya que concentraciones menores de  $\text{Ca}^{2+}$  liberan la calpaína (159).



**Figura 17.** Inhibición de la calpaína a distintas concentraciones de calpastatina (160).



**Figura 18.** Una alta actividad calpastatina limita la proteólisis *post-mortem* (133).

La calpastatina presenta 4 estructuras repetidas con secuencias homólogas a intervalos de 140 aminoácidos (dominios I, II, III y IV) y un dominio terminal N alcalino (dominio L) (161). Existen 3 regiones (A, B y C) dentro de los dominios I-IV responsables de la actividad de unión e

inhibición de la calpaína (Figura 19). El modelo propuesto es el “modelo de interacción tripartito” que incluye los factores del medio que afectan a esta unión (162).

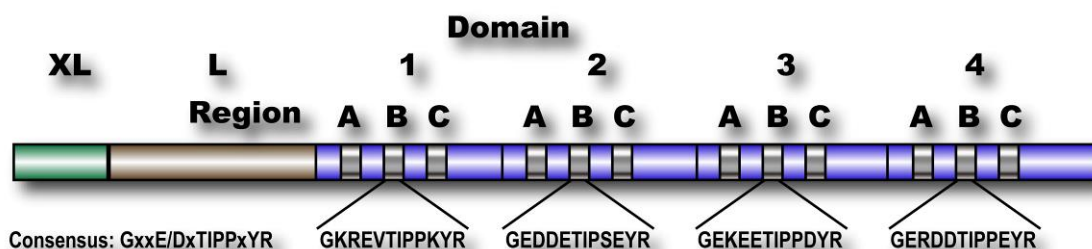


Figura 19. Estructura esquemática de la calpastatina. [www.calpain.org](http://www.calpain.org)

Esta estructura también trabaja como una red de pesca abierta “pescando” calpaínas activas. La activación de la calpaína abre un bolsillo hidrofóbico al que la calpastatina se une, propiciando un reordenamiento de la estructura. La región A se une al dominio IV de la calpaína, la región C se une al dominio VI y atrapa de manera más cercana el centro activo. Esto genera una rotación y un cambio en la conformación de la calpaína que esconde el residuo cisteína del centro activo (163).

La calpastatina está codificada por un único gen CAST y existen componentes genéticos que pueden afectar a la actividad de esta enzima. Dos mutaciones con cambio de aminoácido han sido identificadas (R249K y S638R) generando 4 haplotipos que abarcan la mayor parte de los encontrados en los cerdos comerciales de los EEUU (164). EL haplotipo 249K, 638R presenta una mayor tendencia a la terniza probablemente debido a un menor control de la calpaína que permite una mayor proteólisis (165). Otros factores que afectan a la actividad calpastatina es su grado de fosforilación (166, 167) especie, línea y género (168, 169).

La calpastatina se degrada in-vivo y *post-mortem* por las propias calpaínas (170). El grado de degradación e inactivación está relacionado con la magnitud de la proteólisis, ya que existe un vínculo entre la actividad calpastatina y la proteólisis de la troponina T (133, 171). A pesar de la intensa actividad investigadora de los últimos años en los mecanismos que controlan el sistema calpaína, todavía se sigue conociendo poco sobre él (82).

### Catepsinas

Las catepsinas son cisteína, aspártico o serín proteasas que se encuentran en los lisosomas. Son más activas a pHs bajos o moderadamente ácidos (ver Tabla 3). Su actividad está controlada por la proporción de su precursor (procatepsina) y sus inhibidores conocidos como cistatinas (172). Las catepsinas degradan de manera completa las proteínas en los lisosomas, pero también pueden contribuir en la apoptosis a través de la activación de las caspasas (173) y en la regeneración tisular tras una lesión (49). La actividad *post-mortem* de las catepsinas en el periodo de tiempo en el que el producto es considerado fresco (sin entrar en curaciones de lomos y jamones) es baja, ya que la membrana de los lisosomas mantiene un efecto barrera que limita su salida, a no ser que se liberen a través de la estimulación eléctrica de canales.

Las catepsinas pueden romper numerosos sustratos. Se ha demostrado que la H no puede romper proteínas miofibrilares en estado nativo, la D lo realiza únicamente a pHs menores a 5 (174). Las catepsinas B, D y L rompen a elevada velocidad la proonina T e I, sin embargo actúan con lentitud sobre la miosina, la actina, la tropomiosina y la  $\alpha$ -actinina, la nebulina y la titina. Este es el motivo por el que en condiciones normales se considera que su actividad en la carne fresca es de limitada importancia. Efectivamente, diversos estudios experimentales han demostrado una escasa degradación de actina y miosina en la carne refrigerada (175, 176).

Por otra parte, las catepsinas sí que presentan un papel muy importante en productos curados en los que la desaparición de la miosina puede ser casi completa (177).

**Tabla 3.** Características de las catepsinas con actividad endopeptidasa en el músculo esquelético. Adaptado de (172).

Catepsina	Clasificación y tipo	Tamaño (kDa)	Rango pH óptimo	pI	Observaciones
B	Familia Cisteina C1	30 (25+5)	5.5-6.5	4.5-5.5	Actividad adicional como peptidil dipeptidasa
L	Familia Cisteina C1	28 (24+4)	5.5-6.5	5.0-6.3	Fuerte actividad contra proteínas
H	Familia Cisteina C1	28 (23+5)	6.5-6.8	6.0-7.1	Fuerte actividad aminopeptidasa
S	Familia Cisteina C1	24	6.0-6.5	6.3-7.0	
K	Familia Cisteina C1	29	6.0-6.5	-	Alta actividad colagenolítica
F	Familia Cisteina C1	-	5.2-6.8	-	Alta expresión en músculo
D	Familia Aspartyl A1 (familia pepsina)	45 (30+15)	3.0-5.0	6.8	Una de las catepsinas más abundantes en lisosomas
E	Familia Aspartyl A1	42	3.0-3.5	4.1	Forma dímeros de 84kDa estables en presencia de ATP. Se encuentra también en los músculos, pero sólo en los macrófagos

### *Caspasas*

Las caspasas son una familia de cistein aspartato proteasas que han sido implicadas en los procesos *post-mortem* y en la maduración recientemente (172).

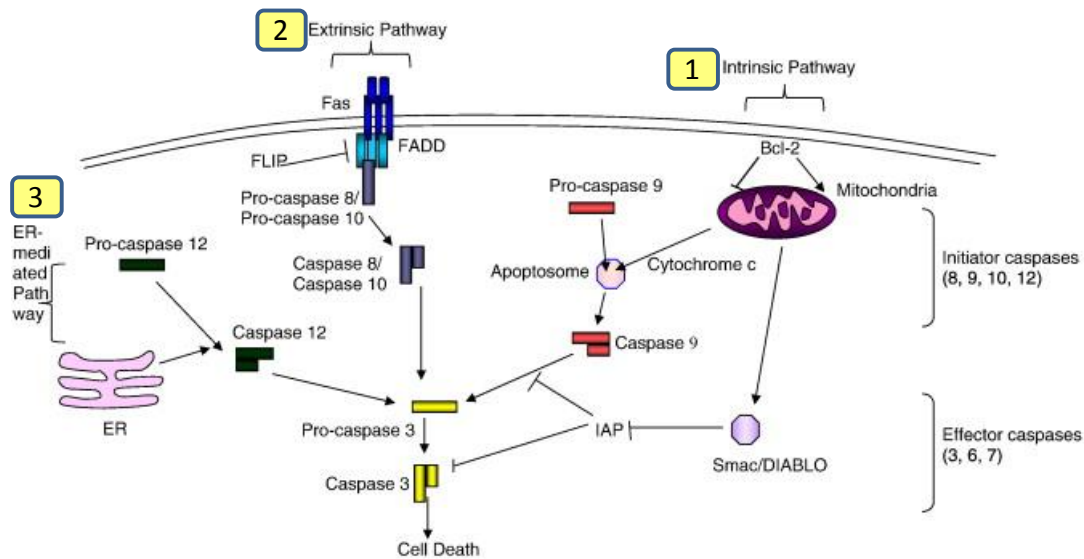
Esta familia de proteasas es responsable de la apoptosis (muerte celular programada). La hipótesis que las implica en los procesos de maduración de la carne, proponen que las condiciones celulares de hipoxia e isquemia, provocan que la célula entre en muerte celular programada. El mecanismo de la apoptosis se detalla más adelante.

Las caspasas son proteasas específicas que necesitan un residuo de ácido aspártico como aminoácido terminal en el extremo C del punto de corte (178). A pesar de esta especificidad, al menos 1000 substratos celulares son objetivo, incluyendo la actina, miosina, desmina, (179),  $\alpha$ -actinina y troponina-T (180).

Actualmente existen 14 caspasas que se expresan en diferentes tejidos y tipos celulares (181) con dos subfamilias principales, las que están implicadas en la respuesta inflamatoria (1, 4, 5, 11, y 13) y las que están implicadas en la apoptosis (3, 6, 7, 8, 9 10 y 12), que a su vez pueden subdividirse en caspasas iniciadoras (8, 9, 10 y 12) y caspasas ejecutoras dependiendo de su papel principal en los procesos de apoptosis (182). Algunas de estas caspasas son específicas de tipo celular o de especie.

Todas las caspasas se sintetizan en el citosol como zimógenos inactivos. Las caspasas iniciadoras son monoméricas en esta forma y las ejecutoras diméricas (183). Las caspasas

iniciadoras cortan las caspasas ejecutoras y por este mecanismo (Figura 20) las últimas alcanzan su actividad máxima (183).



**Figura 20.** Diagrama esquemático de las vías de activación de la apoptosis intrínseca, extrínseca y mediada por retículo endoplásmico. (123).

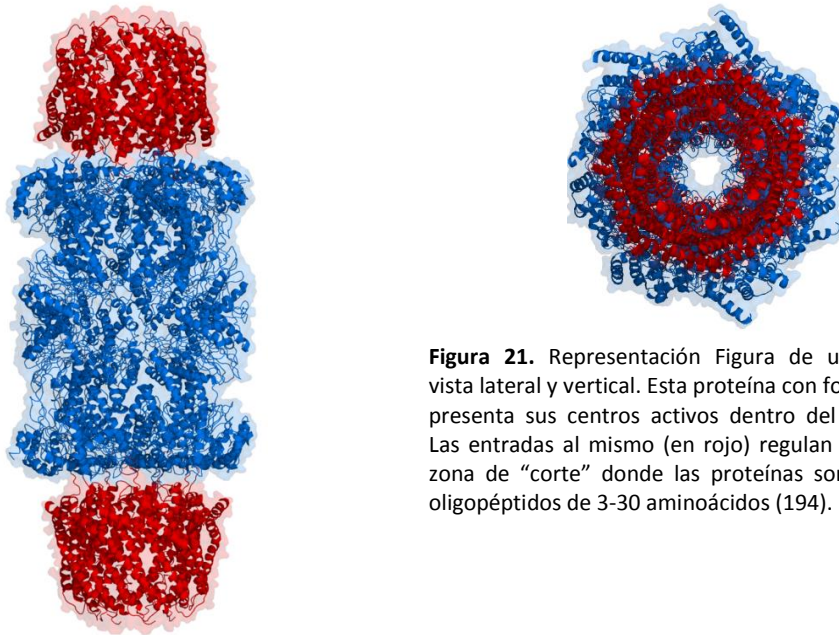
Existen otras interacciones entre las caspasas y las calpaínas, ya que éstas pueden romper las caspasas 3, 7, 8 y 9 (184), así como las caspasas 3 y 7 pueden romper la calpastatina (185). Esta degradación se cree que daña la membrana plasmática resultando en un aumento de los niveles de calcio citoplasmático que genera un aumento de la activación de la calpaína (186). Estas interacciones también pueden verse en animales vivos a los que se ha eliminado el ADN de la  $\mu$  calpaína con niveles elevados de la caspasa 3 y 7 como manera de compensar y mantener un desarrollo del músculo esquelético normal (187).

Estudios recientes han mostrado cómo las proteínas de estrés térmico (heat shock proteínas) que reducen la apoptosis, también reducen la terneza de la carne (188), existiendo también interacciones entre la bajada de pH y la apoptosis, al generar la bajada de pH una estimulación de la misma (189).

Así pues, queda claro que es necesaria más investigación para elucidar los mecanismos e interacciones entre los sistemas proteolíticos. Actualmente se conoce poco del papel de las caspasas en la calidad de la carne pese al esfuerzo investigador realizado durante más de 10 años. De cualquier manera, dada su reducida vida en el músculo *post-mortem* es difícil presuponer un papel relevante del sistema caspasa por sí mismo en la calidad final de la carne a no ser que participe en procesos iniciales clave que condicionen todos los procesos posteriores, pero esto hasta el momento no ha sido demostrado.

### Proteosoma

El complejo proteolítico multicatalítico, también conocido como proteasoma, es una proteasasa de tipo treonina (190). Presenta un papel muy importante en la degradación del músculo vivo completando la rotura miofibrilar y jugando por tanto un papel esencial en la renovación proteica (187). El mecanismo de acción, permite la lisis de proteínas previamente marcadas y comienza con la unión de la ubiquitina (una pequeña proteína) a un residuo lisina en el extremo amino de la proteína objetivo. La repetición del proceso termina generando una cadena de poliubiquitina que se une al proteasoma. Tras la liberación de la ubiquitina, la proteína se degrada en el interior (191-193).



**Figura 21.** Representación de un proteasoma, vista lateral y vertical. Esta proteína con forma de cilindro presenta sus centros activos dentro del cilindro (azul). Las entradas al mismo (en rojo) regulan la entrada a la zona de "corte" donde las proteínas son troceadas en oligopéptidos de 3-30 aminoácidos (194).

El principal proteasoma en los mamíferos es el 26s proteasoma, que consiste en un gran complejo de peso molecular de 2.000kDa con tres subunidades diferentes (una subunidad 20s y dos 19s) (Figura 21). La subunidad 20 puede hidrolizar proteínas miofibrilares (195) y presenta una alta afinidad hacia péptidos oxidados. Rompe las proteínas ubiquitinadas en péptidos de 3 a 30 aminoácidos (196). Las subunidades 19s son partículas regulatorias que consisten en 19 proteínas individuales. La subunidad 20s es cilíndrica con un pequeño hueco catalítico en su centro. Las subunidades 19s presentan una alta afinidad por proteínas ubiquitinadas y extiende las estructuras terciarias de las proteínas mediante el consumo de energía consiguiendo que la cadena polipeptídica pueda acceder al centro proteolítico de la subunidad 20s.

El proteasoma también puede estar activo en condiciones parecidas a las de la carne. Sin ATP las subunidades se disocian eliminando el requerimiento de la ubiquitinación (197), pero manteniendo los requerimientos de conformación. Más aún, la subunidad 20s es estable hasta 7 días *post-mortem* (198). Se ha observado que si se incubaba con miofibrillas purificadas rompe la actina, la miosina y la desmina, y también aunque en menor proporción la troponina T, la  $\alpha$ -actinina y la tropomiosina (91). A pesar de estos hechos, no se considera activo *post-mortem* ya que los productos de degradación que se obtendrían no se corresponden con los encontrados en la maduración y no parece tener un efecto en la calidad de la carne (199, 200). Aun así, ya que su actividad persiste *post-mortem*, es posible que participe en un segundo lugar realizando una rotura mayor en proteínas previamente desnaturalizadas (198).

Existen también interacciones con otras proteasas y el medio. Los sustratos ya rotos por la calpaína son frecuentemente sustratos del proteasoma (201) pudiendo también interactuar con las caspasas ya que se ha observado un aumento de la ubiquitinación durante la apoptosis (202, 203). El entorno oxidativo puede también influir en su actividad, ya que parece probable que la GSH-Px pueda regular el nivel basal de actividad de la subunidad 20s (204), o el hecho de que proteínas con puentes disulfuro no pueden ser desplegadas inhibiendo su degradación por el sistema (205).

Los inhibidores del proteasoma son variados y entre sus propiedades está la actividad antitumoral al interrumpir la degradación de proteínas pro-crecimiento celular (206). La lactacistina (el inhibidor más común), incubada con carne de ternera a 24°C durante 5 horas redujo la degradación de la actina, nebulina y la cadena ligera de la miosina (207); no obstante es importante entender que estas condiciones fijas distan bastante de las prácticas comerciales.

### 3.4.1.3.4. Oxidación proteica

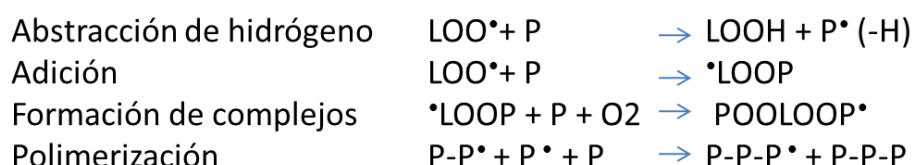
Las reacciones de oxidación-reducción implican la pérdida o ganancia de electrones, que pasan de una molécula a otra. La oxidación es el paso de algunos electrones de una molécula a otra especie química que se reduce. El nombre de oxidación se debe a que en la mayoría de los casos, es el oxígeno el que capta electrones.

Las reacciones de óxido-reducción son de gran importancia en la célula viva, permitiendo por ejemplo obtener la energía química almacenada en moléculas orgánicas mediante una oxidación enzimática controlada. Para ello existe un complicado mecanismo de transporte de oxígeno hasta la mitocondria con la participación de hemopigmentos. En determinadas ocasiones puede producirse también una oxidación química, con generación de radicales libres, en un proceso que mediante un mecanismo en cadena puede autoacelerarse, llegando a ocasionar, si no se controla, daño celular.

En el músculo, la oxidación se inicia principalmente en el músculo a través de las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) con distintos orígenes como los radicales superóxido, hidroxil, ferril, perferril, metamioglobina activada por peróxido de hidrógeno y el oxígeno singlete (208, 209). El músculo esquelético contiene altas concentraciones de metales de transición que facilitan la formación de radicales libres (FR) por las reacciones tipo Haber-Weiss y Fenton.

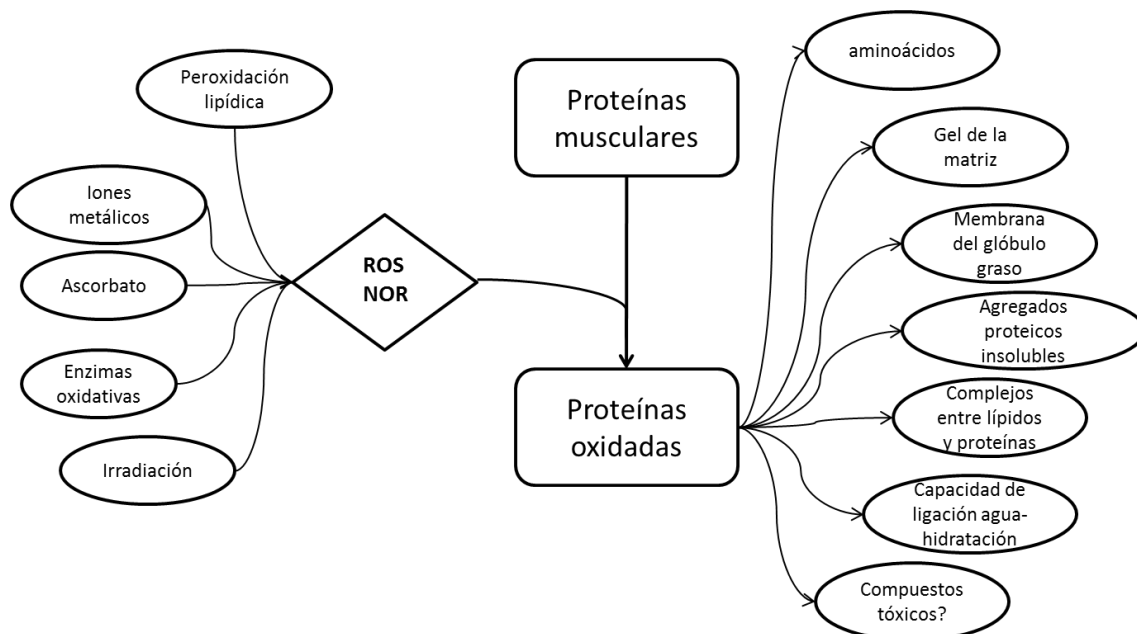
Las proteínas y sus aminoácidos son susceptibles de oxidación de un modo variable según su estructura terciaria (los aminoácidos expuestos) y los aminoácidos que la forman. Todos los aminoácidos pueden ser oxidados, pero los que contienen grupo sulfuro como la cisteína y metionina son los más propensos. Otros aminoácidos fácilmente oxidables son los básicos y aromáticos (lisina, arginina, histidina y triptófano). Las proteínas también pueden formar complejos con metales de transición y estos reaccionan fácilmente con los hidroperóxidos formando iones hidroxilo que oxidan los aminoácidos cercanos. Dadas las características de las células con una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas, la cercanía a las mismas también supone un factor prooxidante (210).

Todos los procesos oxidativos se encuentran profundamente interrelacionados, ya que la formación de radicales libres (de origen proteico o lipídico) produce una reacción en cadena que se expande y desarrolla de modo exponencial (Figura 22). Los productos de la oxidación lipídica pueden interactuar fácilmente con las proteínas (Figura 23) resultando en oxidación (211, 212). No obstante es importante resaltar que pese a que la oxidación lipídica y proteica están generalmente relacionadas pueden tener lugar de manera independiente (213).



**Figura 22.** Representación esquemática de las reacciones de oxidación proteica.

La miosina contiene 40 grupos tiol libres, haciendo de ella una de las proteínas más susceptibles a oxidación dentro del músculo (214). Se ha observado que la miosina oxidada se expande y forma polímeros insolubles (215) e incluso en pescado puede forzar la desaparición de la banda A (216).



**Figura 23.** Producción de sustancias reactivas del oxígeno (ROS) y radicales sin oxígeno (NOR) y su influencia en las propiedades químicas, físicas y funcionales de las proteínas de la carne (217).

La oxidación en las proteínas origina una pérdida conjunta de la calidad de la carne produciendo un deterioro de la textura, el sabor, y generándose una decoloración y formación de compuestos tóxicos (218). Estos cambios en la calidad se deben a la destrucción de aminoácidos, la polimerización de proteínas, la formación de carbonilos y en algunos casos a cambios en la estructura terciaria (217).

La formación de carbonilos (aldehídos y cetonas) se considera generalmente como una medida de la oxidación proteica (219). La formación de estos carbonilos puede darse a través de 4 caminos:

- Oxidación directa
- Fragmentación de la cadena peptídica
- Reacción con azúcares reductores
- Asociación con grupos carbonílicos no proteicos

Uno de los efectos principales expuestos implica que la cadena de aminoácidos después del ataque de radicales libres puede producir entrecruzamientos con puntos reactivos de otras proteínas. Los puentes entre proteínas pueden generarse a través de los siguientes mecanismos (210, 220-223):

- Oxidación de los grupos sulfidrilo de la cisteína formando puentes disulfuro.
- Formación de complejos entre dos residuos de tirosina oxidados
- Interacción del grupo aldehído de una proteína con el  $\text{NH}_2$  de un residuo de lisina
- Entrecruzamiento de dos grupos  $\text{NH}_2$
- Reacciones de condensación de radicales en las proteínas

Estos entrecruzamientos contribuyen a la polimerización y la agregación y pueden llegar a provocar la insolubilización de proteínas en productos cárnicos (224).

Otro de los posibles efectos es la modificación de los residuos de aminoácidos que dan lugar a una alteración de las propiedades fisicoquímicas, modificando la capacidad de hidratación. Las proteínas en su estado nativo minimizan la energía libre del sistema como resultado de un balance entre las fuerzas intra e intermoleculares. Tras la oxidación este estado se ve alterado afectando a la estructura terciaria y secundaria y modificando por tanto la exposición de residuos hidrofóbicos. Estos cambios implican un descenso en la solubilidad de las proteínas que puede ser empleado como medida del deterioro proteico. También generan un aumento de la susceptibilidad de las proteínas a la proteólisis. Así, en la medida que las proteínas

pierden su estructura globular son más susceptibles al ataque de las proteasas (225, 226), tal y como se ha puesto de manifiesto al obtener un incremento de los fragmentos de bajo peso molecular tras el tratamiento enzimático de muestras oxidadas.

La calpaína, con sus residuos cisteína cercanos al centro activo es especialmente susceptible a sufrir procesos oxidativos, lo que genera una pérdida de la actividad proteolítica (149). Esta propiedad hace que la proteólisis y por ende la retención de agua estén profundamente relacionados con el estatus oxidativo de la carne.

### *S-Nitrosilación*

El óxido nitroso (NO) es uno de los principales mensajeros secundarios a nivel celular. Se produce mediante la reacción de arginina y el oxígeno dando como resultado citrulina y NO mediante la intervención de la óxido nitroso sintasa (NOS). Existen 3 tipos principales de NOS, neutral, endotelial e inducible, expresándose los 3 en el músculo esquelético y siendo la neutral la predominante (227). El óxido nitroso difunde fácilmente a través de los tejidos, pero dada su alta reactividad presenta una corta vida. Esta alta reactividad le permite modificar biomoléculas, así como combinarse con el superóxido formando peroxinitrito con una elevada capacidad oxidante. Ésta se expresa predominantemente sobre residuos cisteína, metionina o triptófano (228). El peroxinitrito oxida el retículo sarcoplasmático y en concreto la bomba de calcio (229) afectando la retención del mismo. Otra de las principales reacciones del NO es la S-nitrosilación de proteínas que convierte los grupos tiol de la cisteína en nitrosotioles (RSNOs), siendo este un mecanismo de regulación dinámica post-traducciona similar a la fosforilación (230).

Gran número de proteínas presentan grupos tiol, entre ellas, la mioglobina (ya destacada) y la calpaína. Se ha demostrado una interacción entre el pH y la nitrosilación en la actividad de las  $\mu$  y m-calpaína (231, 232). Liu y colaboradores han encontrado más de 100 proteínas afectadas, existiendo variación entre músculos en intensidad de nitrosilación y número de proteínas afectadas (233). Existen diferencias dependiendo del tipo de fibra, existiendo más nitrosilación en músculos predominantes tipo II (*longissimus dorsi*) comparados con fibras tipo I (psoas mayor) (234).

Los resultados hasta ahora alcanzados no son consistentes y presentan una gran variación entre músculos. Existen resultados en los que una nitrosilación reducida mejora la proteólisis en cordero y otros en los que un aumento en la nitrosilación reduce la capacidad de retención de agua en pollo (235, 236). Estudios recientes de Cottrell y colaboradores (2015) con inhibidores de la nitrosilación anteriores al sacrificio reducen la proteólisis en algunos músculos sin afectar otros (237).

## **3.4.2. Lípidos**

### **3.4.2.1. Estructura de los lípidos musculares**

Los lípidos son moléculas orgánicas principalmente hidrofóbicas que incluyen una amplia familia de sustancias. Estas moléculas presentan diferentes propiedades según su polaridad y función (238, 239), pudiendo considerarse en base a esto como estructurales o de reserva (240). La clasificación química actual más aceptada los divide, atendiendo a su estructura química en policétidos, acilgliceroles, esfingolípidos, prenoles y sacarolípidos (241).

En la introducción de esta tesis doctoral nos centramos exclusivamente en los ácidos grasos, acil gliceroles y glicerofosfolípidos.

Los ácidos grasos son ácidos alifáticos monocarboxílicos. Su estructura general es  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ , pudiendo existir distintos grados de insaturaciones o dobles enlaces que permiten su

clasificación en saturados (SFA), con un único doble enlace o monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) con más de uno.

Los ácidos grasos se identifican mediante el número de átomos de carbono y el de dobles enlaces, añadiendo la posición de los mismos. Así existen dos posibles denominaciones desde el grupo carboxilo, que es la denominación delta o química y contando desde el grupo metilo terminal siendo su denominación omega o bioquímica. Esta última clasificación nos permite explicar mejor los ácidos grasos esenciales, que son aquellos que los animales no pueden sintetizar, lo que les convierte en esenciales. Estos son los ácidos grasos de la serie omega 3 y omega 6.

Los acilgliceroles son los mono-di y tri acilgliceroles. Están representados principalmente por los triglicéridos que son ésteres de glicerina con 3 ácidos grasos en los carbonos 1, 2 o 3. Son insolubles y necesitan ser hidrolizados tanto en la digestión por la lipasa pancreática como intracelularmente por la lipasa sensible a hormonas para poder ser empleados.

Los glicerofosfolípidos con dos ácidos grasos esterificados en los grupos 1 y 2, presentando el tercer carbono un enlace éster con el ácido fosfórico. Esta estructura les confiere propiedades anfipáticas y la capacidad de formar micelas y bicapas que los convierte en el componente estructural principal de las membranas celulares.

Los dobles enlaces desestabilizan los electrones en la molécula permitiendo la substracción de un protón de la misma y facilitando la propagación de la oxidación. Esto se revisa en la sección de oxidación.

#### *3.4.2.2. Síntesis y degradación in vivo.*

Los adipocitos son las principales células de acumulación de la energía sobrante en el organismo. Dada esta función de reserva, los adipocitos se localizan preferentemente cerca de los vasos sanguíneos donde absorben la energía excedente tras la liberación de insulina (242).

La lipogénesis se realiza preferentemente en el citosol celular y comienza con Acetil-CoA que deriva de la descarboxilación oxidativa del piruvato. Este procede de la oxidación mitocondrial de la glucosa, de la ruptura de ácidos grasos o del catabolismo de aminoácidos. El Acetil-CoA sale de la mitocondria al citosol unido a una molécula de oxalacetato generando citrato. Fuera de la mitocondria vuelve a Acetil-CoA y oxalacetato gracias a la acción de la enzima citrato liasa.

Este forma Malonil-CoA a través de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa mediante la incorporación de un grupo carboxilo en una reacción con consumo de ATP. Posteriormente la cadena se elonga mediante enlaces sucesivos de malonil-CoA de 3 carbonos al Acetil-CoA catalizado por el complejo enzimático ácido graso sintetasa (AGS) que junta ambas moléculas en una reacción de condensación con pérdida de un carbono pasando posteriormente por dos reducciones con consumo de NADPH+H<sup>+</sup> y una deshidratación (243). A través de esta reacción el complejo AGS sigue incrementando de dos en dos el número de átomos de carbono del ácido graso de manera continua hasta alcanzar los 16 átomos (palmitato), pudiendo elongarse a posteriori a C18:0 o más (244).

La desaturación se produce principalmente en el palmitato y estearato por una reacción oxidativa catalizada por la enzima Acil-CoA desaturasa que introduce dobles enlaces en la posición delta 9 (245). Esto convierte a la dieta en la única fuente posible de omega tres y omega seis.

Los ácidos grasos formados se destinan a la formación de los fosfolípidos o triglicéridos en función de las necesidades del organismo. Ambas rutas comienzan por la esterificación de ácidos grasos con glicerol.

El hígado constituye un depósito intermedio para los ácidos grasos de la dieta, liberando los triglicéridos en forma de VLDL que en el músculo o adipocito activa la lipoproteína lipasa a

través de la apoCII provocando la liberación de los ácidos grasos y su posterior absorción celular.

La energía de las células presenta distintas vías de generación como la glicólisis (anaerobia a través de hidratos de carbono), el ciclo de Krebs (aerobia) y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos, ya liberados del triglicérido o fosfolípido se unen al CoA a través del uso de ATP formando acil CoA en la membrana mitocondrial por la acil CoA sintasa. Los grupos acil CoA se unen a la carnitina por la carnitina acil transferasa I (CATI) que se trasloca a la parte interna de la mitocondria. En el interior a través de la enzima carnitina acil transferasa II se transfiere el grupo acilo a otro Co-A formando de nuevo acil-CoA. Estas moléculas son degradadas por la flavin adenina dinucleótido (FAD), hidratadas, oxidadas por NAD<sup>+</sup> y rotas por el COA dando como resultado NADH y FADH<sub>2</sub> que se oxidarán en la cadena respiratoria. El acetil CoA se oxida en el ciclo de Krebs.

La oxidación depende de los requerimientos del organismo. Así está regulado el acceso de los ácidos grasos a la mitocondria mediante la inhibición por el Malonil-CoA de la Carnitina Acil Transferasa I (246, 247). Acciones que reducen la concentración de Malonil CoA, como el ejercicio, aumentan el consumo de ácidos grasos por la mitocondria (248), existiendo también factores como la composición en ácidos grasos (249) o la dieta, generando en ratas un mayor consumo de ácidos grasos en dietas ricas en grasa (250).

En los adipocitos, los triglicéridos almacenados son liberados como ácidos grasos por la enzima lipasa sensible a hormonas. Esta es activada por gran cantidad de hormonas como la epinefrina y norepinefrina, siendo inhibida por la insulina (251). Así la insulina reduce el catabolismo de lípidos.

Otra lipasa recientemente descubierta es la lipasa de triglicéridos (ATGL), que hidroliza el primer éster de los triglicéridos. Esta enzima está presente en músculo y adipocitos del cerdo y su expresión se ve incrementada durante la maduración del tejido adiposo así como en la adipogénesis. La estimulación con insulina produce una disminución de la expresión genética de la ATGL y restricciones en consumo aumentan su presencia (252). Su labor es sinérgica con la lipasa sensible a hormonas, ya que ésta presenta una mayor sensibilidad por los diacilgliceroles presentando también una regulación similar (253).

### 3.4.2.3. Catabolismo *post-mortem*

La peroxidación lipídica ha sido ya desarrollada en la oxidación dejando así la lipólisis como último factor a desarrollar del catabolismo *post-mortem*.

#### 3.4.2.3.1. Liberación de ácidos grasos

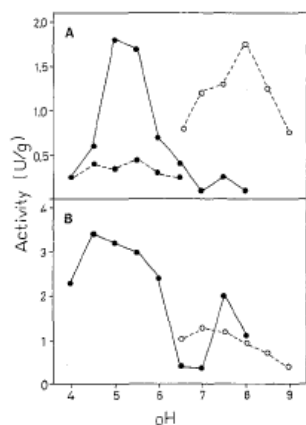
La lipólisis es el proceso de rotura de los lípidos en sus componentes principales, glicerol y ácidos grasos libres. El control así como las enzimas implicadas en la lipólisis no están completamente elucidadas, de forma que siguen encontrando nuevas lipasas, cofactores e interacciones proteína lípido y hormonas que derivan en el control de la misma (253).

La lipólisis se evidencia en la carne fresca mediante un aumento en la concentración de ácidos grasos libres con el tiempo. Este incremento se produce también en condiciones comerciales. Podemos aislar lipasas en músculo ácidas, básicas y neutras aislando únicamente en adipocitos neutras y básicas. La actividad de estas enzimas depende de factores como el pH, temperatura (Figura 24 y Figura 25) y la presencia de inhibidores.

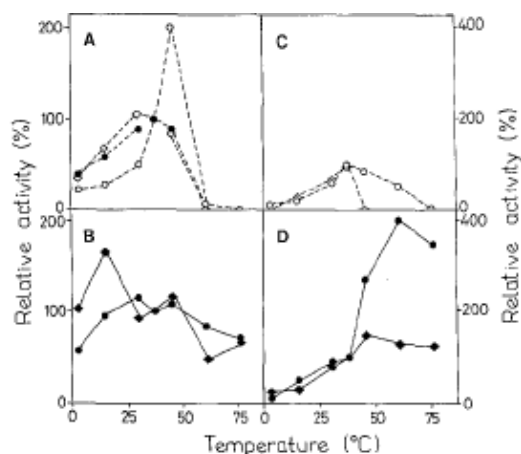
Las principales enzimas en músculo a pH básico-neutro son la lipoproteín lipasa, la lipasa neutra y la LSH. En el rango de pH típico de la carne 5.4-6.1 la principal actividad lipasa se debe a las lipasas ácidas lisosomiales, con una elevada actividad en un amplio rango de pH (254),

presentando también una importante actividad durante los primeros días de la carnización las lipasas neutras (255).

Existen diferencias en la actividad lipasa entre genéticas, principalmente entre lipasas ácidas y básicas, extendiéndose estas diferencias a las fosfolipasas principalmente ácidas. Así, cruces con Landrace belga presentan menor actividad que cruces con Duroc y Large White inglés (256, 257). Así mismo, la actividad lipasa se ve positivamente influida por el ejercicio, presentando mayor cantidad aquellos animales que realizan mayor actividad (258).



**Figura 24.** Efecto del pH en la actividad de las lipasas (línea discontinua) y estearasas (línea continua) en el músculo (A) y adipocitos (B) (255).



**Figura 25.** Efecto de la temperatura en la hidrólisis en el músculo (A, B) y tejido adipocitario (C, D). Lipasa ácida - -●- -, lipasa neutra - -○- -, estearasa ácida —●— y estearasa neutra —○—. Actividades expresadas sobre control a 37°C (255).

Esta área sigue presentando avances significativos, así en 2008 Deilius y colaboradores demuestran la lipasa adipocitaria de triacilglicéridos (ATGL) presente en los adipocitos y en los adiposomas del músculo. Se encuentra asociado a las gotas de lípidos e hidroliza triglicéridos a diglicéridos, sustrato principal de la lipasa sensible a hormonas (HSL).

El control principal de la ATGL parece ser principalmente a nivel de expresión del ADN presentando una alta expresión en el tejido subcutáneo durante el desarrollo adipocitario, maduración y adipogénesis. Esta expresión parece tener cierto grado de control por la insulina, reduciendo la misma su expresión. Se han descrito incrementos en su expresión en dietas con reducción calórica en cerdos y en dietas de restricción calórica en humana (259). También se observan incrementos en su expresión mediante estimulación por catecolaminas. El papel de esta enzima en adipogénesis y restricción calórica es todavía desconocido (252).

La revisión realizada por Bezaire (260) recoge los factores de activación de la lipasa sensible a hormona (HSL) entre los que se encuentra la activación/inhibición por receptores adrenérgicos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  que activan la adenil ciclasa A (PKA) que fosforiliza y activa la HSL, siendo por otro lado inhibida mediante la estimulación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ .

Otros factores de regulación son la hormona del crecimiento, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y la interleukina 6.

La HSL está presente en elevada concentración en adipocitos y muestra actividad lipolítica a pH neutro (lipasa neutra) *in vitro* frente a triacilglicéridos, diacilglicéridos y monoglicéridos, siendo esta actividad mucho mayor para los diacilglicéridos. Presenta distintos grados de fosforilación con tres residuos fosforilables.

Las fosfolipasas son enzimas que actúan principalmente en fosfolípidos existiendo 4 tipos atendiendo principalmente a su punto de actuación. Existen interacciones entre las fosfolipasas y el estado oxidativo. Así la actividad de la fosfolipasa A2 se inhibe mediante la suplementación con vitamina E (261). Por otra parte también se ha evidenciado una relación entre la actividad fosfolipasa y las mermas a las 48 h, en carnes con bajo pH<sub>45'</sub> tras el sacrificio

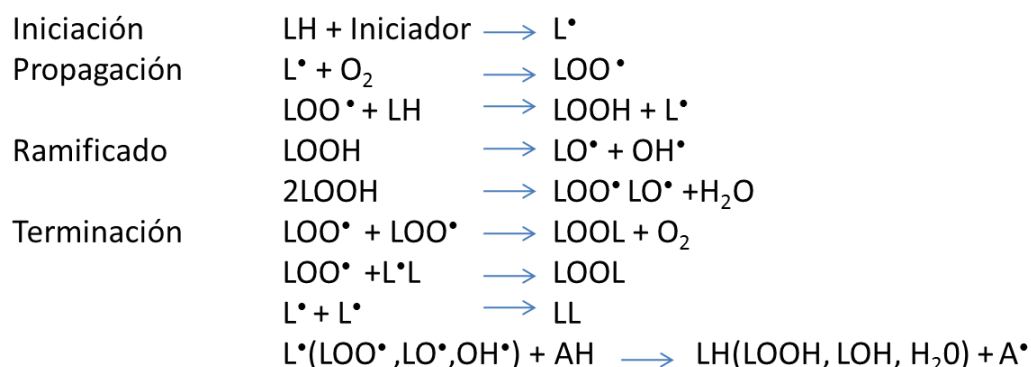
(potencialmente PSE). Esta puede deberse a la estimulación por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en fosfolipasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (262).

#### 3.4.2.4. Oxidación lipídica

La oxidación anteriormente mencionada en las proteínas, es un proceso clave también en la química de la fracción lipídica, siendo la oxidación enzimática de las grasas una de las principales vías de obtención de energía en el organismo, y especialmente en las fibras rojas del músculo. Dado el potencial redox de los ácidos grasos, multitud de compuestos pueden iniciar la oxidación, entre ellos, describimos el efecto del oxígeno singlete. El oxígeno singlete es un oxígeno excitado donde los dos electrones en la órbita más externa giran en sentidos opuestos. Esta configuración hace el oxígeno muy electrofílico permitiendo que interactúe directamente con los enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

En el caso concreto de los lípidos, una vez iniciada la oxidación continúan las fases de la propagación, la ramificación y a veces la terminación (Figura 26). Los peróxidos (LOOH) son importantes intermediarios en la oxidación.

Los metales de transición o la irradiación descomponen los peróxidos (LOOH) siendo estos un importante intermediario en la oxidación.



**Figura 26.** Principales fases de la oxidación lipídica (263, 264).

##### 3.4.2.4.1 Control *in vivo* de la oxidación

La mayoría de las moléculas orgánicas pueden sufrir procesos de oxidación, como los lípidos, proteínas, ADN (265), con diferentes consecuencias, como pérdida de actividad enzimática, mutación del ADN, rancidez etc... Dentro de estas moléculas las más susceptibles son los lípidos poliinsaturados (266).

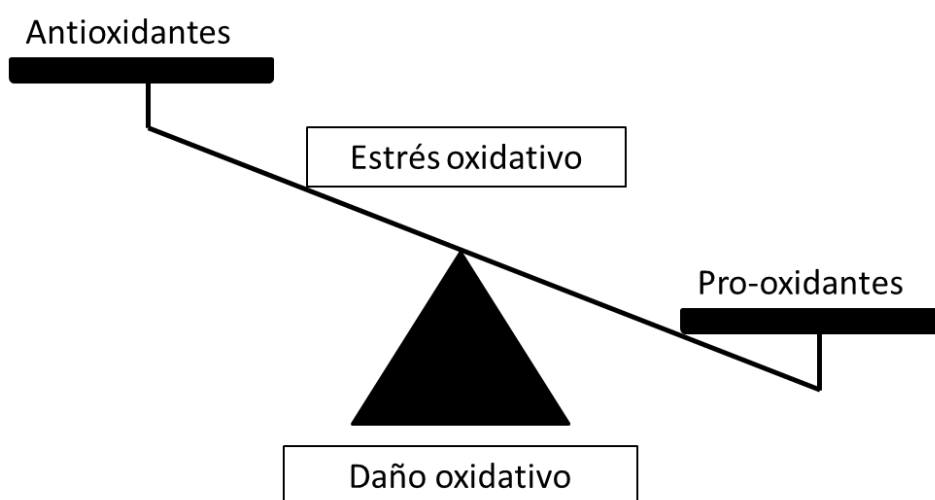
Es complicado mantener la homeostasis ya que una vez que se producen ROS el proceso se autoacelera y por tanto, se expanden y generalmente autoperpetúan. Los organismos vivos pueden también reparar los productos oxidados, aunque únicamente puede realizarse hasta cierto grado de oxidación (267). La reparación del daño oxidativo requiere energía para deshacer la estructura cuaternaria, realizar la reparación y volver a recomponer la estructura cuaternaria inicial o destruir las proteínas dañadas. Este reciclaje corresponde a los lisosomas y proteasomas que en células envejecidas pierden parte de su capacidad lítica provocando una acumulación de proteínas dañadas (268, 269).

Un balance oxidativo descompensado (Figura 27) puede ocasionar distintas patologías derivadas de un sistema inmune ineficiente o cambios en la fisiología de la célula. Se ha vinculado el balance oxidativo con el Alzheimer, envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, cataratas, cáncer y deficiencias inmunes (270-273).

Dentro del ámbito de la producción animal, también encontramos patologías de importancia como el síndrome del destete. Esta patología tiene lugar cuando los lechones son separados de la madre y puestos en un entorno nuevo con alimentación por pienso, diferente temperatura y compañeros. Estos componentes generan una descompensación entre la producción de ROS y antioxidantes que se traduce en síntomas digestivos, peor índice de conversión, aumento de la mortalidad y retraso del crecimiento (274).

Otras proteínas clave en procesos biológicos pueden verse dañadas por la oxidación como la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa que mantiene el gradiente de calcio ya que contiene varios grupos tiol sensibles al deterioro oxidativo. Cuando la enzima está dañada, pierde poder catalítico y cambia la homeostasis del calcio generando un aumento de la proteólisis y destruyendo el citoesqueleto celular (275).

El ADN mitocondrial presenta también con frecuencia daño oxidativo al encontrarse cercano a uno de los puntos de mayor generación de ROS (276). Las mitocondrias envejecidas producen menos ATP. Esta ineficiencia conlleva un incremento de los niveles de oxidación (277).



**Figura 27.** Representación esquemática de los sistemas pro y antioxidantes (278).

Los antioxidantes son un grupo de sustancias presentes en bajas concentraciones en relación con las posibles moléculas a oxidarse, que retardan o previenen su oxidación así como la formación de radicales libres (279). Estos antioxidantes pueden variar en función de su origen (exógenos vs endógenos), solubilidad (hidrofílicos vs hidrofóbicos), actividad y naturaleza (enzimáticos vs. no enzimáticos), siendo esta última clasificación la más empleada. La clasificación por mecanismo de acción también resulta importante, pudiendo actuar en la prevención de la oxidación si rompen hidroperóxidos sin crear radicales o quelan metales de transición o bien cortando la cadena de la oxidación o atrapando radicales libres directamente. Debido a estas funcionalidades algunos sistemas antioxidantes multicomponente presentan sinergias, como las interacciones entre sustancias quelantes y captadores de radicales libres *Free Radical Scavenger* (FRS) o interacciones entre FRS (Figura 28). Otro ejemplo de sinergia lo presentan los tocoferoles con el ácido ascórbico, siendo este último capaz de regenerar el tocoferol manteniéndolo como el principal antioxidante de membrana.

Los radicales libres (FR) pueden ser inactivados por captadores de radicales FRS capaces de donar un electrón dando lugar a un radical de menor energía (280). Los grupos donantes de hidrógeno son principalmente el grupo hidroxil (ascorbatos y antioxidantes fenólicos) sulfidrilos (glutatión, cisteína, ácido lipoico) o aminas (281).



**Figura 28.** Esquema de inactivación de radicales libres por captadores de radicales libres (FRS).

Los radicales libres con alta energía raramente pueden reaccionar con los FRS dada su corta vida debida a su reactividad y la baja concentración de los FRS (263).

Los antioxidantes no enzimáticos son una de las principales barreras a la oxidación. Se encuentran en la fracción lipídica, en la membrana (previniendo o parando la oxidación de la misma) y en la fracción acuosa de la célula.

Entre los antioxidantes de membrana y lípidos destaca la vitamina E. Vitamina E es el término general utilizado para describir los compuestos que presentan la actividad biológica del  $\alpha$ -tocoferol (Figura 29). Estas moléculas comparten un núcleo estructural con un 2-metil-6-cromanol con un enlace en el carbono 16 de la cadena isoprenoide saturado (tocoferoles) o insaturado (tocotrienoles) enlazado al carbono 2 (264). Las moléculas diferentes presentan variación en el número y posición de las metilaciones ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) en el anillo cromanol. La cadena isoprenoide presenta tres centros de asimetría que generan estereoisómeros. La mayoría de las moléculas aisladas de la naturaleza presentan la configuración RRR- y una mayor actividad biológica. Las fuentes sintéticas presentan todas las formas racémicas y son llamadas all-rac (por all racemic forms).

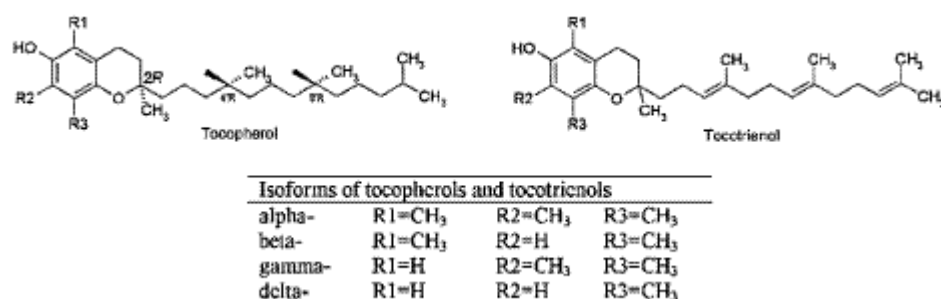


Figura 29. Estructuras químicas de la vitamina E: tocoferol y tocotrienol (282).

La vitamina E se encuentra principalmente localizada en las membranas, con el anillo cromanol en la superficie de la misma o en contacto con proteínas. Es el anillo fenólico que atrapa los radicales y puede ser nuevamente reducido por otros antioxidantes lipídicos o hidrofílicos (283, 284).

Cuando el grupo fenol del anillo cromanol encuentra un radical ( $ROO^{\bullet}$ ) forma un hidroperóxido y un radical tocoferoxil ( $TO^{\bullet}$ ). La constante cinética de esta reacción es muy elevada (hasta  $10^6$  /mol s) y es por tanto superior a la velocidad de propagación ( $10^2$  /mol s) (285). Esta diferencia de velocidades permite al tocoferol ser muy eficiente a bajas concentraciones (264).

Existen cuatro caminos para la recuperación del tocoferol a partir del radical tocoferoxil; estos son la reacción con ascorbato, con glutatión, o la reacción con otros antioxidantes solubles en agua como la ubiquinona o el NADH de la mitocondria.

El contenido en tocoferoles de los animales puede manipularse a través de la nutrición incrementando su contenido en la dieta (286).

La ubiquinona es también conocida como la Coenzima Q. Es un compuesto fenólico conjugado a una cadena isoprenoide (287) que inhibe la oxidación lipídica y puede encontrarse en la membrana mitocondrial y en los lisosomas. Su contenido puede incrementarse mediante suplementación nutricional (288), pero su precio actual no lo hace compatible con la producción animal.

La última familia de moléculas soluble en lípidos son los carotenoides. Se trata por tanto de un grupo muy diverso de polienos capaces de inactivar y prevenir la oxidación de especies reactivas de oxígeno.

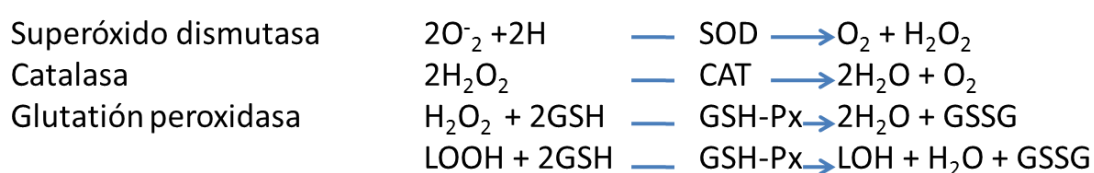
Los atrapadores de radicales solubles en agua del músculo están localizados principalmente en el citosol. El ascorbato (vitamina C) es uno de los principales FRS del grupo con un radical resultante de baja energía (280) que facilita la funcionalidad e incluso permite la recuperación de la vitamina E. El ascorbato también puede propiciar la liberación de metales de las

estructuras proteicas. Esto hace que pueda presentar función antioxidante y prooxidante (289). Dada esta dualidad, no ha sido empleado con gran extensión en nutrición animal como antioxidante.

Los tioles son un grupo que incluye la cisteína, el glutatión y el ácido lipoico. Estas moléculas pueden donar un H a un FR. La energía resultante del radical puede seguir siendo suficientemente alta como para oxidar ácidos grasos poliinsaturados (280).

El glutatión en su forma reducida (GSH) tiene un alto potencial como antioxidante en el músculo esquelético por que alcanza una concentración elevada (60-90 mg/kg músculo) (290). El GSH puede actuar como cofactor reductor de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px). Esta enzima y el nivel de glutatión son desarrollados más adelante en el documento.

Otras sustancias que puedan actuar como antioxidantes son aminas, ácido úrico, nucleóticos, poliaminas (putrescina, carnosina) y aminoácidos como la histidina, tirosina, fenilalanina, triptófano, cisteína, prolina y lisina (291), algunos de ellos se generan durante el período de conservación *post-mortem* y durante la elaboración de productos cárnicos.



**Figura 30.** Principales enzimas antioxidantes en músculo.

Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y tioredoxina (TRX) son las principales enzimas antioxidantes que mantienen su acción *post-mortem* (Figura 30).

La SOD es ubicua y se encuentra en la mayoría de los sistemas biológicos. Está generalmente presente en dos formas, una en el citosol con cobre y zinc como cofactores y otra en las mitocondrias con manganeso como cofactor (292). Esta enzima cataliza la dismutación del anión superóxido mediante la reacción expuesta en la Figura 30. Como particularidad, la SOD disminuye significativamente durante el envejecimiento (293).

La catalasa por su parte contiene un grupo hemo y descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno molecular (294). Es estable hasta el octavo día de añejado (293).

La enzima más importante dentro del trabajo realizado en la tesis, es la glutatión peroxidasa, una enzima que descompone mayor variedad de ROS y que contiene al Selenio integrado en su estructura. Una representación esquemática de estas reacciones puede verse en la Figura 30. El glutatión reducido GSH es necesario como cofactor y el producto resultante es glutatión oxidado (GSSH) (295). Esta enzima puede modularse a través de la nutrición mediante la suplementación de la dieta con selenio (295) y se mantiene activa durante el almacenamiento refrigerado de la carne (296).

El glutatión oxidado (GSSH) retorna al estado de glutatión reducido (GSH) a través de la glutatión reductasa (GR). Esta enzima también presenta un puente disulfuro en su centro activo al que se une el NADPH liberando NADP tras la reducción del GSSH a GSH.

La tioredoxina reductasa también contiene selenio. Esta enzima regenera el tioredoxin y el glutatión oxidado (297).

Otro nivel de defensa aparte de la prevención de la formación de radicales o reducción de su propagación, son los sistemas de eliminación y reparación de las partes dañadas de las moléculas. Este sistema está formado por lipasas, peptidasas, proteasas, transferasas, enzimas reparadoras del ADN etc.(18).

En estos tres niveles de protección, prevención, eliminación y reparación las selenoproteínas participan en al menos dos niveles, previniendo la formación de radicales (eliminando  $H_2O_2$  y  $O_2^*$ ) y reduciendo la concentración de hidroperóxidos (18).

Con todo esto, resulta interesante destacar que los niveles de antioxidantes pueden regularse mediante expresión genética, modificaciones en la traducción del ARN (298) y mediante manipulación nutricional.

#### 3.4.2.4.2 La oxidación *post-mortem*, importancia y cambios ocasionados

La matriz muscular es compleja y mantiene un delicado balance entre antioxidantes y pro-oxidantes, cuyo equilibrio final depende de un complejo equilibrio de factores ante y post mortem. Durante esta última fase la mayoría de los antioxidantes permanecen activos pero su eficiencia disminuye de manera progresiva con el tiempo (299, 300) al mismo tiempo que otros compuestos con potencial efecto antioxidante se van generando como consecuencia de la actividad proteolítica. Como es obvio, tras el sacrificio su aporte cesa, dando lugar a una depleción de los mismos. En tanto que los distintos pro-oxidantes de la carne, con una alta concentración de ácidos grasos poli-insaturados (PUFAS), pigmentos hemo y metales (301), comenzarán a generar radicales iniciando la oxidación química.

El orden por el que se acaban los antioxidantes es ascorbato = glutatión >  $\alpha$ -tocoferol > ubiquinona (302). La vitamina E puede encontrarse en altas concentraciones tras largos períodos *post-mortem*, así se ha descrito una alta concentración en jamones ibéricos tras períodos superiores a los dos años de curación (303).

Existen diferencias en la susceptibilidad de la carne de diferentes especies de animales. Estas se basan en el nivel de ácidos grasos insaturados (304) y compuestos prooxidantes (305). Una comparación realizada con carne picada y cocinada de distintas especies muestra como orden de susceptibilidad a la oxidación al pollo, seguido del cerdo, la ternera y oveja (304).

Otros factores que es importante definir en los estudios *post-mortem* afectados por la oxidación son el pH, ya que ésta aumenta con pHs inferiores (263, 306) y la temperatura que también presenta un papel importante, acelerando las reacciones en temperaturas más elevadas (307). Fuera del alcance de este estudio, otro de los factores principales de control de la oxidación es la concentración de cloruro sódico, que también puede promover la oxidación lipídica (308) así como ejercer algún efecto antioxidante (309).

La oxidación *post-mortem* es causa de importantes pérdidas para la industria ya que genera alteraciones en la coloración de la carne y productos cárnicos que pueden afectar de modo diferente a distintos músculos y cortes lo que produce heterogeneidad y disminuye la apreciación visual y la vida útil del producto con el subsiguiente rechazo del consumidor.

## 3.5. El agua en la carne

### 3.5.1. Distribución del agua, factores e importancia

Los caracteres de calidad de la carne presentan una baja heredabilidad y una gran influencia de los factores ambientales (310, 311). Esto es especialmente cierto con los factores que afectan a la capacidad de retención de agua (CRA) de la carne. Hay factores genéticos, como algunas mutaciones, que afectan a la funcionalidad de las proteínas, pero también existen factores metabólicos que influyen en el resultado final (311).

Aparte de los genes mayores ya conocidos de calidad de carne como el de la sensibilidad del Halotano y el Rendement Napole, vinculados a líneas genéticas determinadas se han descubierto recientemente nuevos factores como la expresión polimórfica del receptor 4 de la melanocortina, la subunidad gamma 3 de la proteína quinasa MP, el receptor de la rianodina (312-314), así como otros factores no genéticos de importancia en la CRA final como el estrés, los depósitos de glucógeno, la creatin fosfato, la actividad de la creatinina fosfoquinasa (CPK), el pH final, la evolución del pH *post-mortem*, el tipo de fibra, el sistema de aturdimiento, la velocidad de enfriamiento, el grado de contracción del sarcómero, la actividad de la lactato

deshidrogenasa, el tipo de miosina, la actividad piruvato deshidrogenasa, la calsequestrina y la superóxido dismutasa entre otros (310).

Se han realizado distintos intentos para evidenciar biomarcadores para evaluar la potencial calidad de carne, especialmente la CRA (45, 310). La expresión genética en el músculo es flexible para permitirle adaptarse a condiciones cambiantes (315), existiendo ejemplos de adaptación del nivel de glucógeno, capacidad oxidativa y velocidad de degradación proteica (316, 317).

En general estos biomarcadores se encuentran relacionados con unas pocas funciones biológicas como el metabolismo energético, la degradación proteica, el metabolismo del calcio, la comunicación celular, la apoptosis, el estado de oxidación y la estructura muscular (310). En las siguientes secciones desarrollamos la distribución del agua *in vivo* y *post-mortem*, así como la evolución de la ubicación del agua y las estrategias posibles para modificar la CRA.

### 3.5.2. Distribución del agua *in vivo*.

El músculo vivo contiene aproximadamente 75 % de agua y un 20 % de proteína (318). El agua, como molécula dipolar es atraída por la carga eléctrica. Dada esta característica, podemos clasificar el agua como agua asociada y agua no asociada que puede estar bien inmovilizada o libre, existiendo un intercambio continuo entre las tres fracciones. El agua, según su grado de libertad, reacciona de una manera diferente bajo un campo magnético perturbado por un pulso de radiofrecuencia, produciéndose su relajación en dos planos ( $T_1$  longitudinal y  $T_2$  transverso), siendo este el fundamento de la relaxometría de resonancia magnética nuclear (RMN) que es la base de la investigación en la que se asientan los siguientes datos (86).

Existen por tanto tres poblaciones de agua con propiedades diferentes:

El agua asociada o ligada se encuentra fuertemente atraída por fuerzas electrostáticas a estructuras proteicas, por lo que es difícil de eliminar, permaneciendo inalterada incluso durante la congelación. Se estima que se encuentra ligada de esta forma aproximadamente 0.5 g de agua por cada gramo de proteína. Es decir, aproximadamente el 10% del peso de la carne (54). En estudios de RMN presenta un tiempo de relajación muy breve (rápido).

El agua retenida, o inmovilizada en estructuras proteicas organizadas que forman la red densa de proteínas miofibrilares (agua miofibrilar) que en estudios de RMN corresponde con la población  $P_{21}$  y representa el 80-95 % de la relajación transversa, caracterizada además por un tiempo de relajación muy rápido. Esta agua se encuentra retenida por fuerzas de capilaridad entre los filamentos gruesos y delgados y constituye la fracción mayoritaria del agua de la carne (hasta el 85 %). La cantidad total se ve fuertemente afectada por el pH de la carne, ya que el espacio intramiofibrilar depende de la atracción y repulsión de las cargas eléctricas de las proteínas, de modo que en el punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (pH=5.5) la capacidad es mínima.

El agua libre corresponde a la población  $P_{22}$ , que supone el 5-14 % de la relajación transversa y tiene un tiempo de relajación lento. Esta agua tiene una localización extramiofibrilar en el sarcoplasma (intermiofibrilar) y entre fibras musculares, entre músculos en los espacios interfasciculares y extrafasciculares (54).

### 3.5.3. Distribución del agua *post-mortem*

#### *Puntos clave tras el sacrificio en la distribución del agua*

Durante todo el proceso de instauración y resolución del rigor mortis, el agua se sigue distribuyendo en las tres fracciones señaladas (agua asociada a proteínas, agua retenida en estructuras proteicas y agua libre). No obstante, como también se ha señalado, existe un complejo intercambio dinámico entre estas tres fracciones durante la etapa *post-mortem*,

debido a los cambios físicos y químicos que acontecen (caída de pH, contracción músculos, proteólisis, cambios en los espacios intermiofibrilares etc.) que modifican el reparto de agua entre estas fracciones.

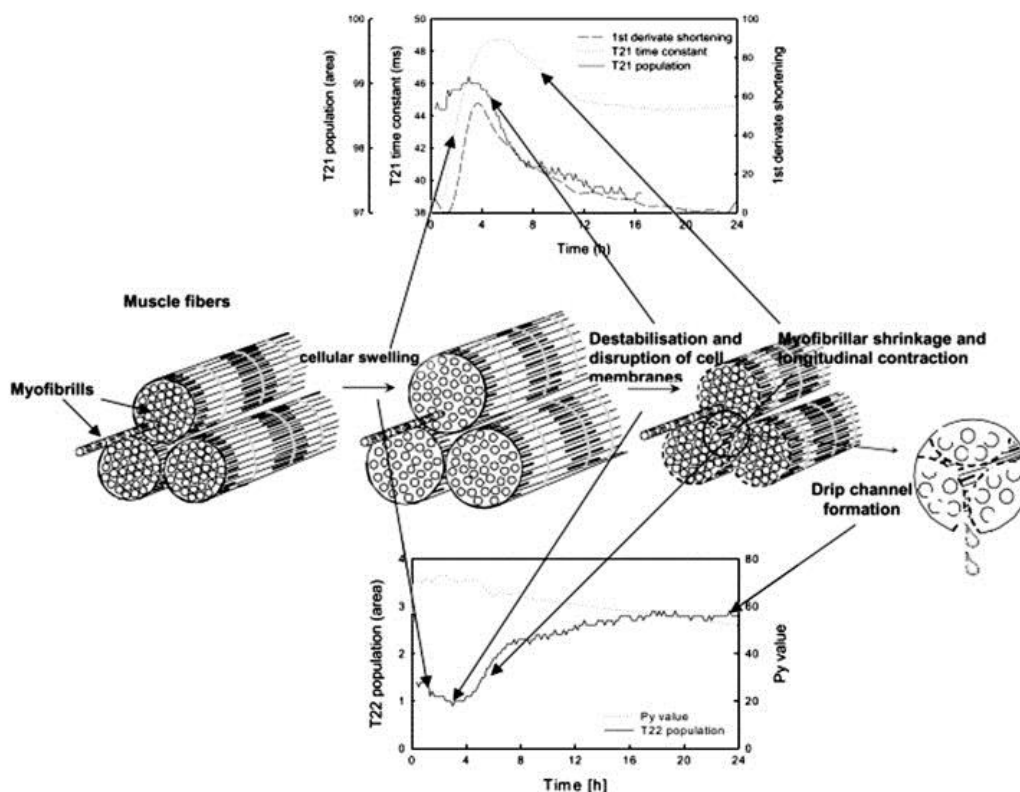
El conjunto de estos procesos, altamente interdependientes y el modo en que el agua pasa de una fracción a otra durante las diferentes etapas son de importancia crítica para conseguir una óptima capacidad de retención de agua de la carne (54, 89, 319).

Durante el sacrificio y desangrado la regulación hormonal es interrumpida ya que no presenta vías de transporte (320). Esto unido al entorno pobre en oxígeno resulta en condiciones similares a la isquemia que conducen a un incremento de la fuerza iónica que genera un hinchamiento celular con una entrada del agua extracelular al espacio intracelular que se ve acompañado de un incremento de la repulsión electrostática (Figura 31). Tras este aumento inicial, las células vuelven a su estado normal expulsando el volumen sobrante y volviendo al tamaño original.

Estos movimientos se confirman con los estudios de RMN, encontrando inicialmente un aumento en la población  $P_{21}$  junto con un descenso en el agua libre ( $P_{22}$ ) (321).

Los filamentos gruesos y delgados comienzan a contraerse y recortar la longitud del músculo al liberarse iones calcio del retículo endoplasmático mientras el músculo sigue disponiendo de ATP. Al reducirse la funcionalidad celular, se reduce la capacidad del retículo de secuestrar los iones  $Ca^{2+}$  resultando en una contracción acelerada. Este acortamiento genera un aumento en el diámetro de las miofibrillas y un incremento del espacio lateral entre los filamentos gruesos y delgados que resulta también en un aumento del diámetro de la fibra.

Conforme el ATP se agota, el músculo continúa contrayéndose longitudinalmente y ahora también lateralmente en la medida en que la asociación entre actina y miosina se vuelve irreversible, dada la falta de ATP (322).



**Figura 31.** Mecanismo de reorganización de los fluidos del músculo y su relación con los cambios observados en la población  $P_{22}$  de la RMN (321, 323).

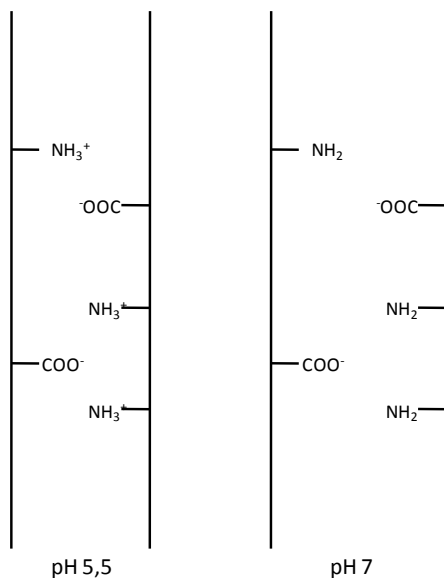
El grado de bajada de pH varía pero generalmente termina en un rango entre 5.5-5.6 (324) variando según las prácticas del matadero y de la genética pudiendo alcanzar un promedio

superior a 5.8. Conforme las proteínas se acercan a su punto isoeléctrico (5.3-5.5), la carga neta y la repulsión electrostática se reduce, lo que contribuye a la reducción del espacio intramiofibrilar y genera una expulsión de agua debido a la contracción lateral (Figura 32). Si el pH cae rápidamente mientras el músculo todavía se encuentra caliente ( $\text{pH} < 6$  con temperatura de la carne superior a  $32^\circ\text{C}$ ), las cabezas de la miosina se desnaturalizan generando un acortamiento mayor (325) lo que produce una reducción de la CRA y carnes pálidas blandas y exudativas (PSE). Uno de los hallazgos principales de investigaciones es que la predicción de la CRA es mayor cuando se mide el pH a las 4 y 6 horas *post-mortem* que con el pH último (pHu) (92).

Como se describió en la sección *Estructura de las proteínas* de esta tesis, las miofibrillas están unidas al sarcolema por proteínas específicas en la banda I; así en la medida que se genera tensión en las miofibrillas esta se transmite a los tejidos circundantes (otras miofibrillas o el sarcolema) resultando una reducción del volumen de la célula (54). Ver Figura 33.

Esta reducción en la sección al corte, estimada en el 9%, influencia claramente el movimiento del agua desplazando esta del espacio intramiofibrilar al extramiofibrilar que aumenta en volumen (54, 321). Otros autores (326, 327) estiman que el espacio entre los filamentos gruesos y delgados es  $570 \text{ \AA}$  en estado de prerigor y  $320 \text{ \AA}$  durante el mismo. Esto genera una reducción de aproximadamente 3 veces el espacio intramiofibrilar

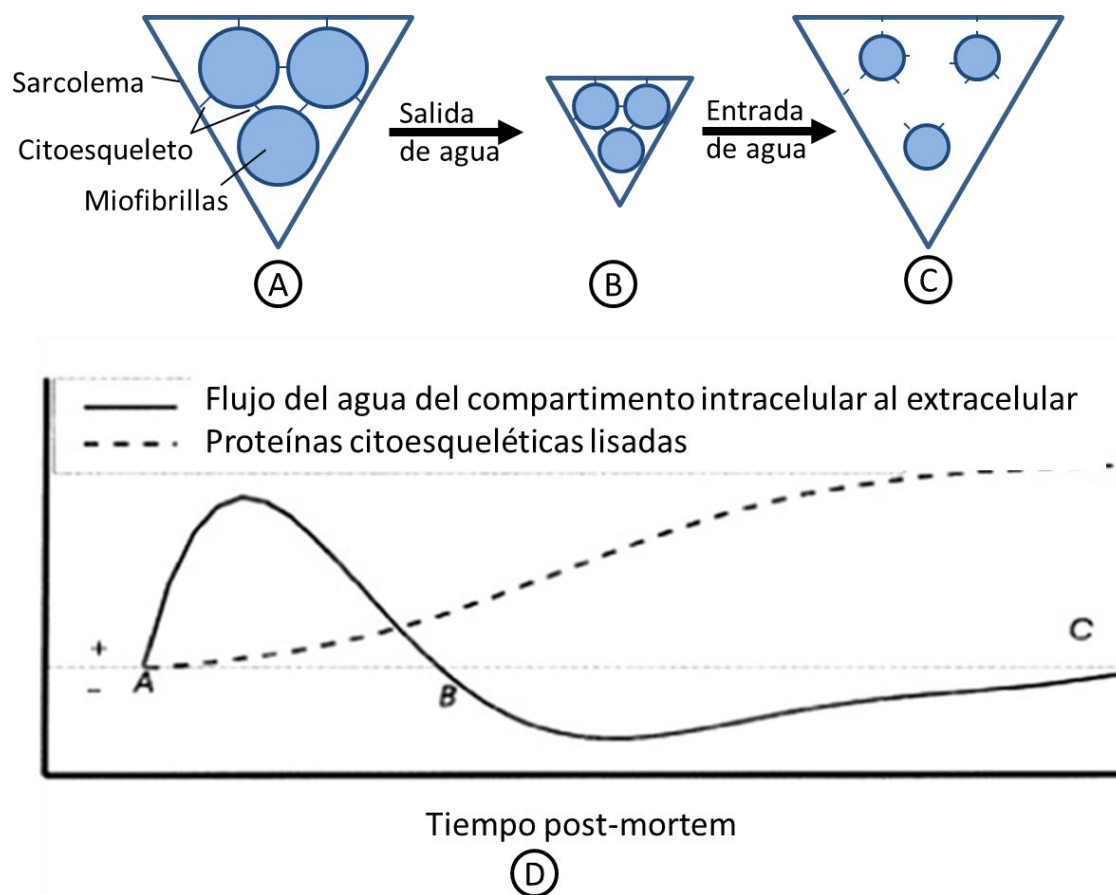
Durante el desarrollo del *rigor mortis* se producen también alteraciones en la membrana celular, que conducen a que se permita el intercambio de fluidos y la salida fuera de la célula. A medida que la membrana pierde la impedancia existe un aumento en el área extramiofibrilar que corresponde con membranas que pierden fluidos (328).



**Figura 32.** Esquema del acortamiento por cambios en el pH de la carne del músculo con pH 7 a la carne con pH 5.5. Debido al incremento de carga en los grupos amino ( $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$ ) las proteínas de la carne se aproximan al punto isoeléctrico a pH 5.2-5.3 y por tanto minimizan el espacio intermiofibrilar (324).

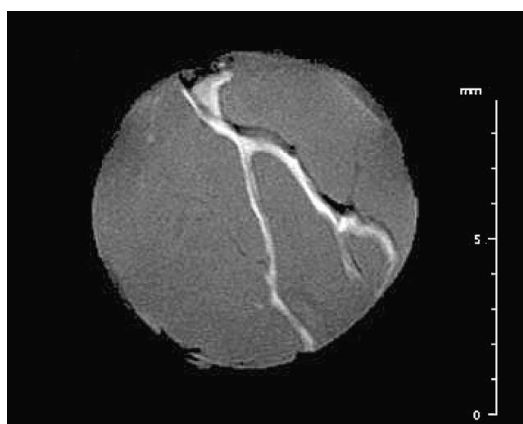
Este acortamiento junto a un citoesqueleto intacto (desmina sin degradación) y membranas permeables resulta en el desacoplamiento de haces de fibras del epimisio de manera que se permite el exudado de líquido (329).

Si aceptamos una membrana permeable y un citoesqueleto intacto, el agua del músculo y las estructuras tendrán los siguientes desarrollos (86): el acortamiento de la célula es concurrente con el acortamiento del tejido conjuntivo del endomisio (ya que las uniones permanecen intactas), esto genera la rotura de las redes del endomisio y perimisio, generando la acumulación de agua en el perimisio mientras la fibra muscular sigue acortándose dentro del endomisio acumulando agua en los espacios. Así el agua se mueve primero del espacio intermiofibrilar al extramiofibrilar (los espacios inter y extrafasciculares) dando un incremento estimado de 1.6 veces comparado con el tejido vivo a las 24 hr (86, 330).



**Figura 33.** Cambios en la CRA de la carne tras el sacrificio y durante la maduración. A.- célula muscular simplificada en estado anterior al rigor y con las miofibrillas conectadas entre ellas y a la membrana celular por el citoesqueleto. B.- Acortamiento *post-mortem* de miofibrilla por reducción de toda la célula muscular que genera una salida de agua del espacio intracelular al espacio extracelular. C.- La proteólisis del citoesqueleto rompe la unión de la proteína con la membrana y permite mantener el agua desplazada del espacio intermiofibrilar al extramiofibrilar, pero dentro de las estructuras membranosas celulares. D.- Relación entre el flujo de agua, tiempo *post-mortem* y cantidad de proteínas citoesqueléticas proteolizadas (329).

Debido a estos eventos, se generan huecos entre las fibras musculares (Figura 34), haces y en la red del perimio, junto con la formación de canales en la proximidad del tejido conjuntivo que permiten al agua fluir estando altamente correlacionados con el exudado (323, 329).



**Figura 34.** Figura de el músculo de un conejo a 1 h *post-mortem*. Pueden apreciar canales en la proximidad del tejido conjuntivo (323).

La mayoría de los autores sitúan el comienzo de la maduración tras el establecimiento del rigor mortis, no obstante la proteólisis comienza antes de que el músculo entre en rigor (331). La degradación del citoesqueleto libera la tensión al eliminar las uniones intermiofibrilares y con el sarcolema que permiten a la célula recuperar su volumen (149). Este proceso permite la entrada de agua a las células ya que reduce las fuerzas de expulsión de la misma a los compartimentos extracelulares. Es también claro que para que esta degradación ejerza efecto sobre la expulsión de agua, necesita ejercer su efecto hasta una cierta extensión. Lawson y Zhang por otra parte, encontraron que la degradación de la integrina (otra proteína del citoesqueleto) estaba asociada con un aumento de la pérdida de agua (89, 319).

Todos estos efectos de presión deben encontrar un balance que se adecúa inicialmente liberando agua como exudado y a posteriori la fuerza osmótica facilita la retención de la misma ya que una gran proporción de las proteínas permanecen intramiofibrilares *post-mortem* (329).

La proteólisis excesiva también puede reducir la CRA de la carne ya que se disminuye la cantidad de agua retenida en estructuras proteicas, que recordemos constituye la fracción mayoritaria del agua (329). Por otro lado muchos estudios muestran como la CRA de la carne de cerdo aumenta a las dos semanas de maduración lo que se relaciona con una mayor concentración de fragmentos proteicos cargados eléctricamente que permiten mayor retención de agua ligada (319, 329, 332, 333).

### *Hipótesis y modelos de la CRA*

La complejidad y multifactorialidad de los problemas relacionados con la CRA de la carne resulta extremadamente difícil de conocer y controlar en la práctica, lo que ha generado diferentes aproximaciones teóricas para explicar los procesos. En una primera aproximación, la pérdida de líquido se explicaba según la denominada hipótesis del vaso vacío, de modo que la carne que ha perdido agua debería mantener mejor la restante (332). Esta hipótesis se ha cuestionado con abundante evidencia experimental por Kristensen y Purslow ya que ellos encontraron un aumento de la CRA sin existir un cambio en la cantidad total de agua de las muestras (329).

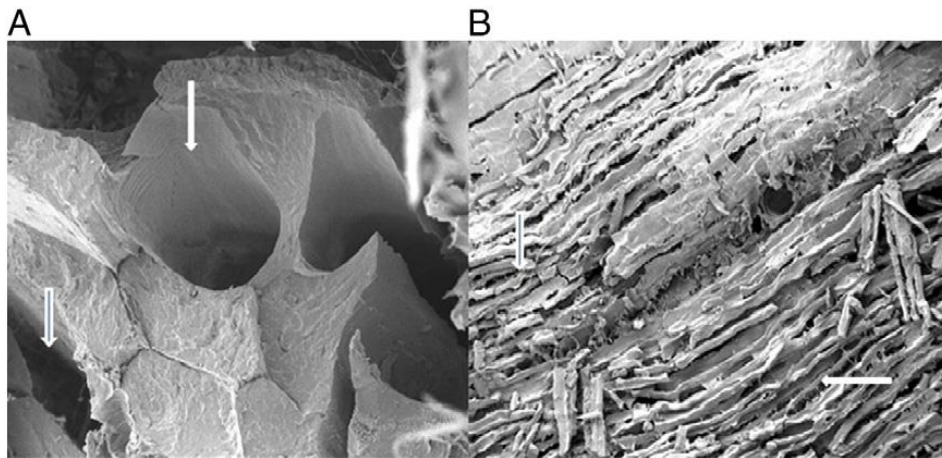
Estos mismos autores proponen que la pérdida de líquidos se debe a la destrucción de las proteínas citoesqueléticas, que supone una reducción en el acortamiento lateral permitiendo la entrada de agua de nuevo a las células. Esta hipótesis presenta como bases los recientes descubrimientos que vinculan la CRA con la destrucción de la desmina (149).

Farouk y colaboradores por su parte cuestionan algunos aspectos en esta última y propone que la reducción en la contracción lateral puede tener un mayor peso en la CRA durante el rigor y poco después, ya que otros autores encontraron como pequeño el efecto de la estructura en las fases iniciales (334, 335). Tampoco se explica con este modelo el incremento de la CRA que ocurre en la carne con muy larga maduración (hasta 14 semanas a temperaturas negativas  $-1.5^{\circ}\text{C}$ ). El aumento en la CRA no puede atribuirse únicamente al acortamiento lateral.

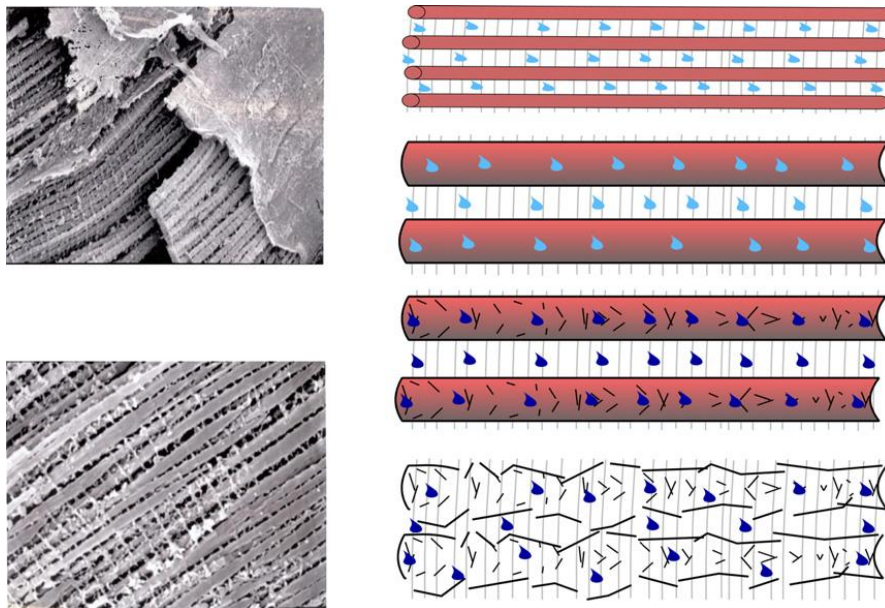
Farouk y colaboradores (334) por su parte también presentan una alternativa para explicar los cambios en la CRA que se define como el "efecto esponja", que propone que el exudado se comporta como un fluido Newtoniano y los canales como microtúbulos cilíndricos y rígidos (Figura 35 y Figura 36). Esta hipótesis mejora la anterior planteada por Kristensen y Purslow (329) y defiende que en la medida que el tiempo permite una mayor actuación e incremento de la proteólisis, los péptidos generados incrementan la viscosidad del exudado a la vez que suponen obstáculos en los canales, existiendo referencias anteriores en las que se demuestra incremento de concentración proteica con pérdidas menores por exudado e incluyendo posibles efectos de desnaturalización proteica. Así en las pruebas realizadas por López-Bote, se encontró una buena relación ( $r = -0.65, -0.22$  y  $-0.38$ ) entre la concentración de proteínas

sarcoplásmicas, miofibrilares y totales respectivamente con las pérdidas por exudado y la reflectancia (336).

La hipótesis presentada por Farouk y colaboradores justifican los resultados obtenidos en la parte experimental de esta tesis (334).



**Figura 35.** Micrografías en el SEM de secciones longitudinales y transversales del músculo semimembranoso, mostrando los canales intactos (mag x 1000) a través de los cuales el exudado se pierde (figura a) y la Figura del músculo madurado (mag x 40) b. Las flechas blancas apuntan a los canales y la estructura destruida (334).



**Figura 36.** Representación de la hipótesis "efecto esponja" para la mejora de la CRA con la maduración. Las proteínas estructurales entre las miofibrillas se rompen progresivamente con la maduración (1-4), y la viscosidad del exudado continúa aumentando con el tiempo resultando una mayor retención o fuerza necesaria para la expulsión del agua de la carne por gravedad (334).

### 3.5.4. Métodos para la determinación de la CRA

La cantidad de agua extracelular se estima cercana al 15 % del total de agua en carne (337). Éste agua se localiza fuera de las células musculares y se mantiene mediante fuerzas capilares, pero también se evapora o gotea. Como se ha observado la CRA es un indicador muy sensible de los cambios en la estructura y en las células (50).

Existen muchos métodos para la medición de la CRA de la carne, pero no hay consenso general sobre cual debe ser el de referencia. Según Honikel (337), la medida de la CRA puede realizarse por tres motivaciones diferentes, estas son evaluación de la calidad, evaluación de la producción y protocolos de procesado y por último como herramienta para la realización de estudios estructurales.

Existen muchos factores que afectan el análisis del exudado en el laboratorio como la situación de la carne en el momento en el que la carne se ha medido, que debe ser definida exactamente para la obtención de resultados comparables (322). Es muy importante la definición del tamaño de la muestra, forma, dirección de las fibras, maduración, material de corte, composición de la muestra (sin grasa de cobertura), temperatura, factores microclimáticos en el paquete y posición (2). Otros factores a definir están relacionados con el análisis en sí como el tiempo de análisis y la temperatura (337).

Los métodos pueden clasificarse dependiendo de la fuerza que genera el expulsado del agua. La mayoría de los métodos tradicionales (338) lo realizan sin la aplicación de fuerzas externas colocando la muestra sin contacto externo en un recipiente estanco con saturación de humedad y midiendo los cambios de peso durante un período de tiempo. Esto puede realizarse con carne fresca o descongelada. Los trozos de dimensiones determinadas son tomados en un momento definido tras el sacrificio de un área definida del músculo a investigar y cortados de manera perpendicular a la orientación de la fibra. Estos trozos son entonces suspendidos en una bolsa hinchada de plástico o en un contenedor cerrado. Durante el tiempo definido de medida (los más usuales 24 y 48 horas) la muestra debe mantenerse a temperatura de refrigeración 1-5°C.

Otros métodos aplican una fuerza externa que puede ejercerse a través de centrifugación, presión con filtro de papel o succión mediante capilares. Estas fuerzas estimulan la liberación de agua, pero esta puede proceder de otros espacios y únicamente revelar una tendencia de cómo se comportará la carne fresca.

Existen también métodos que aplican altas temperaturas para evaluar la CRA a través del cocinado. Estos son altamente dependientes de la temperatura aplicada.

Como se ha mencionado anteriormente en la resonancia magnética nuclear (RMN) el valor T2 se corresponde bien con la CRA determinada por métodos gravimétricos en distintos rangos de CRA (328, 339, 340).

Esta tesis pretende evaluar el mecanismo actual por el cual el selenio orgánico (o el selenio) incrementa la CRA de la carne. Existen diferentes variables que afectan a la CRA que podrían verse afectados por una proteólisis potencialmente mejorada.

Según Melody y Lonergan (54, 149), una mejora del estado antioxidante pueden mejorar la CRA al reducir la formación de canales y el acortamiento lateral de las células debido a la rotura estructural. Según esto, la CRA puede mejorarse debido a una menor cantidad de agua extracelular y menores canales.

Según Farouk y colaboradores (334) la carne reacciona como una esponja y dada esta mayor proteólisis habrá un efecto concomitante de los menores canales y una mayor presencia de fragmentos que obstruirán los canales.

Para el desarrollo de este proyecto se han empleado distintos métodos de evaluación de la CRA, observando los diferentes valores obtenidos en diferentes laboratorios realizando métodos similares. Se propone además un nuevo método para la medición del CRA con un congelado previo de la muestra seguida de una liofilización en la que se registran las pérdidas de peso a distintos tiempos. Este método nos debe permitir mantener la estructura del músculo a la vez que obtenemos en principio el agua de los capilares. Mientras se evapora la muestra, esperamos encontrar barreras similares a través de los capilares debidas a la precipitación proteica.

Suponemos que las condiciones de congelado pueden cambiar el resultado final, ya que congelaciones lentas generan cristales de mayor tamaño que pueden dañar las membranas y

alterar las dinámicas de liofilización, por lo que se testan también distintos sistemas de congelación para observar el resultado final en el producto.

## 3.6. El selenio

### 3.6.1. Química y metabolismo del selenio

El selenio es un mineral traza que pertenece al grupo 6º de la tabla periódica en la columna del oxígeno, azufre y telurio pudiendo actuar en reacciones químicas con valencia positiva (+2, +4, +6) o negativa (-2). Esta posición entre metales y no metales permite que las proteínas que contienen selenio (selenoproteínas) puedan actuar como catalizadores efectivos en reacciones redox (341).

El selenio está presente en la naturaleza tanto de manera inorgánica (en diferentes minerales) como orgánica, encontrándose esta última como parte de la selenometionina y seleniocistina donde sustituye al azufre de la molécula debido a la gran analogía química entre estos dos elementos. La forma más común en animales y plantas es en la forma de selenometionina, representando esta más del 50 % del total del selenio ingerido en la dieta animal (342). La seleniocistina por su parte puede considerarse desde el punto de vista metabólico como un aminoácido diferente (el aminoácido 21), ya que se integra en las cadenas proteicas con el codón UGA y se transporta por su propio tARN (343, 344). Existen actualmente más de 10.000 referencias científicas respecto al selenio y sus implicaciones nutricionales siendo este un campo activo de investigación.

El Selenio entra principalmente en la pirámide trófica a través de plantas y levaduras que lo absorben del suelo como selenito, selenato o en su forma metálica. Así su concentración en las plantas depende de múltiples factores como su concentración en el suelo (con variación entre 0.1 ppm y 2 ppm), pH (la acidificación del suelo reduce su absorción), nivel de fertilización (la fertilización inorgánica con azufre reduce su disponibilidad), potencial redox, composición mineral, precipitaciones, aireación (baja aireación reduce absorción) y tipo de planta entre otros para ilustrar factores que inciden en su concentración (342). Algunas levaduras presentan una elevada absorción del selenio del medio convirtiendo este en selenio orgánico que es posteriormente acumulado alcanzando concentraciones tan altas como 3000 ppm ya que lo incorporan en la metionina y cistina en lugar de azufre (345) y se llega a alcanzar una tasa de reemplazo de la metionina por seleniometionina del 30 % (346).

Una vez que el selenio alcanza al animal a través de la dieta, es absorbido o metabolizado de forma diferente según su estado (Figura 37). Su biodisponibilidad y distribución depende de la forma química así como de la presencia de otros compuestos químicos, las necesidades de selenio y especie animal (347). La selenometionina se absorbe directamente en el tracto gastrointestinal como si se tratara de metionina y es mejor absorbida que el selenito y la seleniocistina (342, 348), siendo transformada con el tiempo en seleniocistina al incorporarse de manera específica a proteínas (349), o acumulada sustituyendo metionina. La eliminación del selenio orgánico se produce principalmente por vía fecal (350).

El selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) se incorpora a los eritrocitos, donde se reduce a ión selenio ( $\text{Se}^{2-}$ ) por el glutatión, para ser posteriormente trasladado por el plasma de manera selectiva conjugado con la albúmina y siendo finalmente transferido al hígado (351). El selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) se transporta directamente al hígado, incorporándose a través del consumo de glutatión pudiendo ser a posteriori eliminado con la orina, siendo esta su principal vía de eliminación en niveles fisiológicos (348).

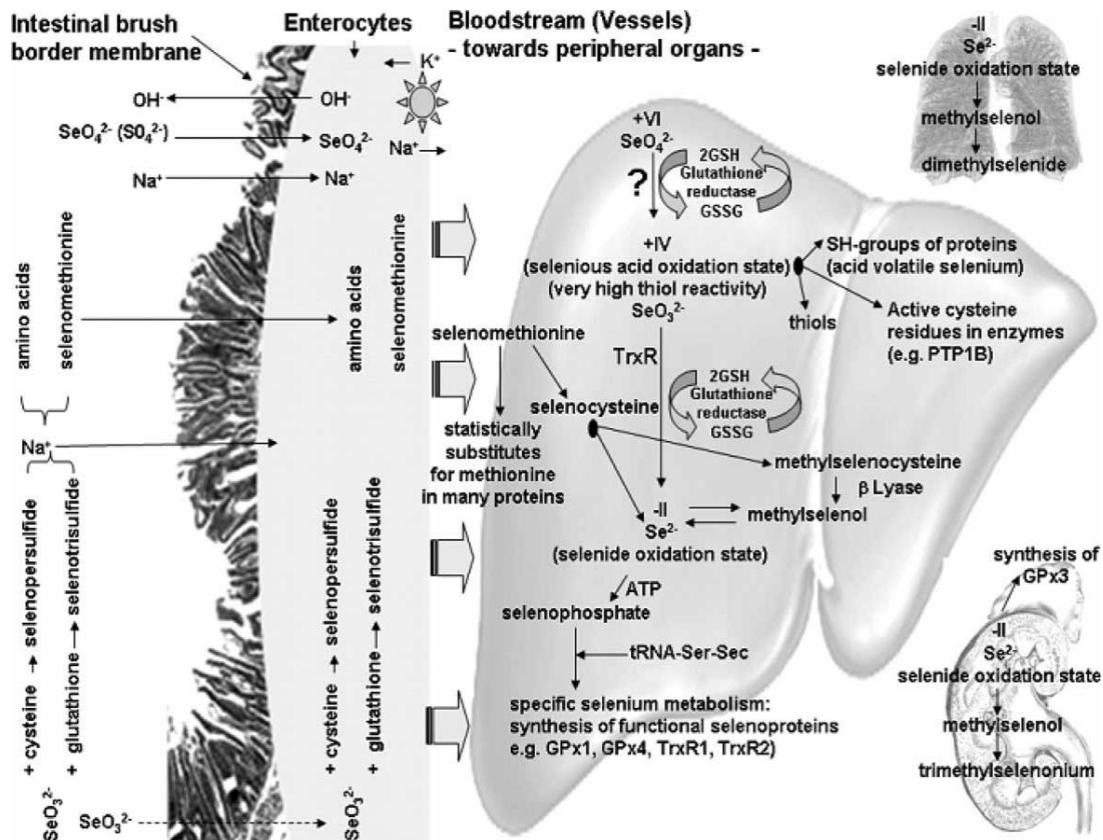


Figura 37. Metabolismo del selenio en mamíferos (77).

El destino del selenio en el organismo parece variar en función de su fuente. Existen dos depósitos metabólicos de selenio (348), un depósito activo para la síntesis de selenoproteínas (depósito metabólico intercambiable) que proviene principalmente del consumo de selenito y selenato y otro formado por proteínas con alto contenido en selenio derivado del consumo de las formas orgánicas denominado depósito de metionina. El músculo esquelético es el principal órgano de acumulación, almacenando hasta un 46.9 % del selenio total del organismo.

Dadas las diferencias descritas en uso, el selenio inorgánico supone una fuente mejor para necesidades agudas dado su rápido metabolismo. El selenio orgánico por su parte, al permitir una mayor acumulación permite reducir deficiencias crónicas. Debido a sus características químicas y posibilidad de sustituir al azufre en algunos aminoácidos, el selenio juega un papel relevante y único en un buen número de procesos vitales.

Se estima que los mamíferos poseen entre 30 y 50 selenoproteínas diferentes (352) entre las que destacan la enzima glutatión peroxidasa (GPX1), la tioredoxin reductasa (TR) (353), la yodo reductasa, la tioredoxina, la iodo tironina 5' deionidasa, selenoproteína P (SeP) etc. El selenio se encuentra en las proteínas de tres maneras diferentes: por unión específica a proteínas, a través del codón específico del ADN y la incorporación no específica como selenometionina.

En caso de deficiencia, existe una jerarquía de uso teniendo preferencia la glutatión peroxidasa (354), siendo la selenoproteína P el marcador que implica consumo óptimo máximo. En situaciones de estrés el proteasoma rompe las proteínas dañadas, así como proteínas con selenio como forma de incrementar la disponibilidad para la formación de proteínas con selenio con propiedades antioxidantes.

La Glutathion Peroxidasa (GPX o GSH-Px) es una proteína tetramérica con 4 subunidades idénticas cada una de las cuales con un átomo de Selenio unido (355). La selenocisteína del centro activo se oxida a ácido selénico que es posteriormente reducido por la acción de 2 moléculas de glutatión reducido (GSH) (356). Dentro de la familia de la GPX existen 6 selenoproteínas, destacamos las 3 principales. La glutatión peroxidasa fosfolípido hidroperóxido (PH-GSH-Px), la glutatión peroxidasa gastrointestinal GI-GSH-PX y la glutatión

peroxidasa celular. La PH-GSH-Px (también GPX4) es activa en la interfase de las membranas (357) es ubícua en los tejidos pudiendo encontrarse en la mitocondria (forma L) y fuera de ella (forma S) (358, 359). Presenta una gran expresión y protege al ADN del daño oxidativo, su desestabilización y además evita la liberación del citocromo C de la mitocondria (360). Los ratones a los que se elimina esta enzima (KO) no son viables.

La GI-GSH-PX (también GPX2) presenta una localización gastrointestinal y actua como barrera frente a la reabsorción de los hidroperóxidos (361). Los ratones KO a esta enzima (KO) son viables (362). La glutatión peroxidasa citosólica (GPX1) es también ubícua (363), en caso de deficiencia de selenio su concentración baja y los ratones KO son viables, pero más sensibles a oxidantes y patógenos (364).

Estas proteínas son responsables de la detoxificación de hidroperóxidos y el peróxido de hidrógeno, empleando como molécula dadora del electrón la glutatión (GSH). La regeneración del glutatión oxidado (GSSH) se realiza a través de la glutatión reductasa y NADPH+H<sup>+</sup> (365-367). La seleniocistina en el centro activo de la GPX se oxida a ácido selénico, que vuelve a su estado original a través del gasto de dos moléculas de glutatión reducido (GSH) (356).

La expresion de la GSH-Px tiene una regulación compleja, ya que es específica de género, y presenta variación en función de la concentración de estrógenos (354), concentración de selenio, medio ambiente y exposición a diferentes sustancias químicas como la vitamina E, hierro, zinc, riboflavina, vitamina B<sub>6</sub>, cobre, dietas grasas o hipercolesteronémicas e incluso el estado oxidativo. Entre estos factores hay que destacar su relación con la concentración de selenio, alcanzando una r de 0.91 en ratas y 0.81 en cerdos (368, 369).

El Sistema Tiorredoxina está compuesto por tres proteínas principales la tiorredoxina (TRX), la tiorredoxina peroxidasa (TPx) y la tiorredoxina reductasa (TR) (297). La TR presenta como sustratos el NADPH, el ascorbato oxidado y la tiorredoxina oxidada pudiendo revertirlas a la forma reducida. En su forma reducida, la TRX participa en funciones antioxidantes como aceptor de electrones en las reacciones de la tiorredoxin peroxidasa, en la síntesis de ADN con la reductasa de nucleótidos y como factor de transcripción (370, 371). La TRX presenta en su centro activo un ditiol-disulfuro con dos cisteínas vecinas que generan el plegamiento que le permite actuar como antioxidante proteico. El sistema tiene como funciones la actividad antioxidante y regulación del potencial red-ox. Modula varios factores de transcripción, la fosforilación y la apoptosis (372-374).

Vistas las propiedades del selenio es conveniente revisar las posibles interacciones con la Vitamina E generando sinergias en la actividad antioxidante que se han observado en parte de los estudios realizados (Figura 38).

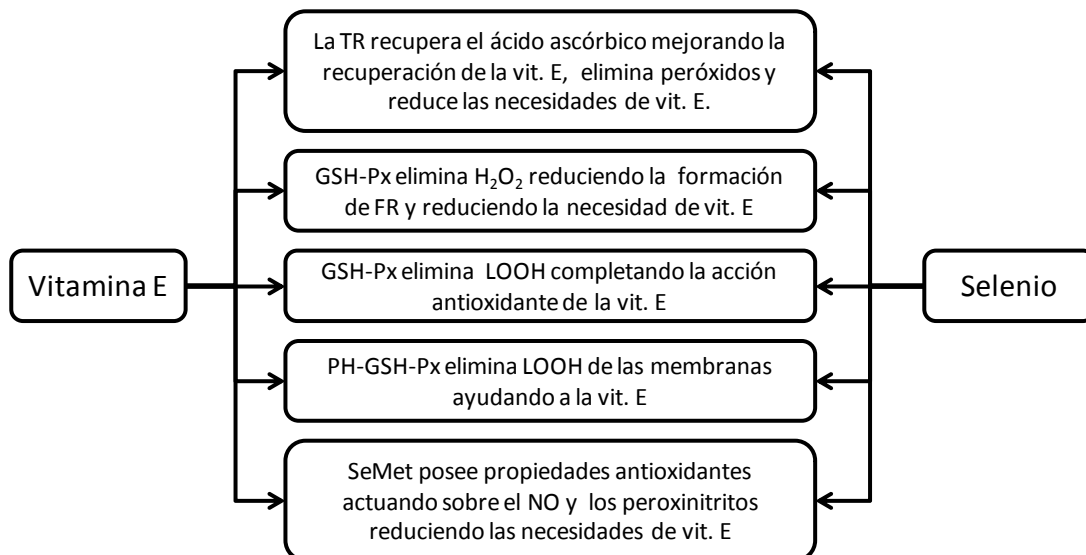


Figura 38. Interacción de la Vitamina E con el Selenio (18).

### 3.6.2. El selenio en la nutrición porcina

Desde un punto de vista nutricional el selenio es un nutriente especialmente difícil, ya que tiene unos límites estrechos entre la situación de aporte mínimo que evite deficiencia, de nivel de suplementación para optimizar la respuesta y nivel de toxicidad. Además el exceso de selenio acumulado puede ser potencialmente tóxico también para el consumidor de carne. Por otra parte, la concentración de Selenio en los alimentos presentan fuertes variaciones entre países dadas las diferencias en su concentración en el suelo, que se trasladan posteriormente a toda la cadena alimentaria. Las necesidades de este nutriente para ganado porcino recogidas por el NRC se han mantenido en las ediciones de 1998 y 2012 (375). Estas varían en función de la edad de los cerdos siendo mayores en la etapa de lechón (0.3 ppm hasta los 11 kg), disminuyendo en transición (0.25-0.2 ppm) y alcanzando un plateau una vez alcanzada la fase de crecimiento (50 kg) que se mantienen en gestación y durante la lactancia (0.15 ppm).

El selenio orgánico seleccionado para la suplementación en los ensayos es el Sel-Plex® (Alltech Inc, Nicholasville, KY) aprobado como aditivo para nutrición animal en el reglamento CE nº 1750/2006 con número 3b8.10. Este aditivo se corresponde a la forma orgánica de selenio producida por *Saccharomyces cerevisiae* que se compone principalmente por seleniometonina (63%) y componentes de selenio de bajo peso molecular (34-36%) con un contenido de 2000-2400 mg Se/kg (97-99% de selenio orgánico). Esta forma, pese a considerarse segura, ha sido revisada por el Panel para Aditivos y Productos o Sustancias empleados en alimentación animal de la EFSA en 2011 (376). El límite en la aplicación del selenio orgánico se debe al estrecho margen existente entre potenciales efectos adversos, así como a su potencial bioacumulación. Vemos así la toxicidad aguda a dosis de 250 mg individuales o fraccionadas en un breve espacio de tiempo, generando efectos tóxicos como náuseas, fragilidad en uñas etc. La toxicidad crónica se inicia en dosis tan bajas como 0.03-0.4 mg/kg kg animal vivo (377). Simulando diferentes dietas basada en productos reforzados con selenio orgánico en distintas poblaciones y empleando el nivel máximo de consumo crónico sin riesgo del Comité Científico (377) (300 µg/día en adultos y 60 µg/día en niños de 1-3 años) se define un nivel sin riesgo de 0.2 mg/kg en pienso.

La deficiencia en selenio puede provocar distrofia muscular, degeneración necrótica del hígado y corazón en mora en animales de granja, el exceso presenta toxicidad con pérdida de pelo y pezuñas frágiles (378). Los estudios realizados mediante suplementación de Selenio de distintas fuentes durante la fase de finalizado 80-120 kg (Tabla 4) no presentan resultados

concluyentes sobre su efecto en la productividad y calidad de la canal, siendo más las referencias que indican la inexistencia de las mismas (379-385), que las positivas (386) o positivas únicamente para machos enteros (387) y existiendo también referencias que indican peores índices productivos (381). Los efectos hayados son variados pudiendo encontrar canales más magras, con menor tocino dorsal o mayor área del lomo en animales suplementados con este mineral (379, 380, 383). Esto puede deberse al posible efecto del selenio sobre la insulina y el engrasamiento descrito en ratas Zucker obesas (388). Al selenio se le han atribuido propiedades en ambos sentidos, siendo por un lado mimético de la insulina y antidiabético, con registros de efectos positivos aplicando altas dosis de selenato y en registros más recientes prodiabético (77). Las funciones biológicas las desarrolla en base a las selenoproteínas y así encontramos como la expresión de la GPx1 y la selenoproteína P pueden alterar el funcionamiento de la insulina. Así el selenito retrasa la fosforilación inducida por la insulina de la Akt y el FoxO1, existiendo una asociación entre altas concentraciones de selenio en plasma, hiperglicemia y dislipemia compatibles en distintos estadíos con los resultados en cerdo. En el ensayo de Pinto y colaboradores, las células musculares tras un consumo de 0.5 mg/kg materia seca de selenio durante 16 semanas presentaban una mayor expresión de TRX1 y GPx1 ( $p < 0.05$ ). La proteína kinasa B (Akt) es activada por fosforilación dependiente de insulina de los residuos Thr 308 y Ser407. Esta presenta una mayor fosforilación en tejido adiposo de animales suplementados, que se acompaña de un mayor nivel de mRNA de lipoproteinlipasa LPL y lipasa adipocitaria de triglicéridos (ATGL) enzimas fuertemente vinculadas con la lipólisis, así como una infraregulación de la piruvato kinasa y mayor nivel de LPL en músculo, cambios que evidencian el paso de un metabolismo altamente dependiente de hidratos de carbono a uno con un empleo preferente de lípidos (389). Este efecto puede generar un metabolismo similar al síndrome metabólico e incluso diabetes con caquexia que reducirá el espesor graso a la vez que incrementará los ácidos grasos libres al existir una mayor cantidad de enzima.

En machos enteros la mejora en el índice de conversión puede deberse al incremento de células de Sertoli concomitante con mayor testosterona (390) que puede traducirse en incrementos productivos (387). El empleo principal que se viene realizando ya de manera comercial abarca las fases de lactancia al destete realizando un refuerzo de las defensas antioxidantes de los lechones en fases de estrés para su sistema inmune que presentan un reducido coste por kg de carne final producido (391). También se ha observado una reducción del stress térmico reduciendo el estrés oxidativo concomitante (392).

**Tabla 4.** Revisión bibliográfica efectos del selenio y su fuente en los caracteres productivos del cerdo.

Referencia	Genética peso inicio y fin	Dosis/Días	Índices productivos	Calidad de canal
Wolter et al., (379)	PIC 406 Halotano (+) PV 22kg-110kg	24 animales 0.3 ppm SeO (Sel-plex <sup>®</sup> ) vs 24 animales 0.3 ppm SS última fase de 80 a 110 concentración más baja de la esperada 0.261 para SeO y 0.172 para SS	Sin efecto	Baja grasa dorsal sube área lomo en algunas áreas
Mahan et al. (380)	PVo 20.4, PVf 105	9 tratamientos factorial 2x4 SS vs SeO 0.05, 0.1 0.2 0.3 + control	Sin efecto	Tendencia aumento área lomo
Jacyno et al., (381)	Línea sintética 990	80 machos enteros SS 0.2ppm +30 mg vit. E. SeO 0.2+60mg vit. E 110 días	Peor índice productivo grupo SeO	
Mateo et al., (382)	Camboroug 22 x PIC PVo=34.4kg PVf=129.9	180 cerdos, 6 réplicas 6 cerdos por réplica I control (basal alto nivel SeO 0.18 ppm), II + 0.1 ppm SeO, III + 0.2 ppm SeO, IV + 0.3 ppm SeO, V + 0.3 ppm SS	Sin efecto	Sin efecto en TLPU, TD
Jiang et al., (384)	Duroc x Landrace x Large White PVo=6, PVf 95 (105 días)	64 animales, 4 tratamientos I control, II 0.15 SeO, III 0.3SeO y IV 0.3SS	Sin efecto	
Li., (173)	Genética PIC ¿? Pvo=10kg, PVf = 47kg 56 días	10 animales por tratamiento basal, +0.3 +3.0g/kg	Sin efecto	
Speight et al., (387)	Yorkshire x Landrace PVo=8.2kg machos enteros, PVf=124kg	117 animales 3 tratamientos Basal basal + 0.3 SeO (Sel-plex) + 0.3 SS	Disminuye IC control 2.75 vs 2.64 SeO vs 2.71 SS	Sin efecto en TLPU, TD
Cao et al., (386)	Duroc x Landrace x Yorkshire PV=9.9kg, 42 días	36 animales por tratamiento (MC y HE). Control dieta maíz vs 2 0.3 mg/kg SS vs 3 0.1 mg/kg SeY vs 4 0.3 mg/kg SeY, vs 5 0.5 mg/kg SeY vs 6 0.7 mg/kg SeY.	Bajada IC en 4 y en 6	
Lisiak (383)	(LW polaco x LD polaco) x Du PVf 100kg	10 animales por tratamiento, grupo suplementado 0.45 mg/kg SS fase 1 y fase 2 0.38mg kg (mayores de 60kg)		Sin efecto en TLPU, TD
Lisiak (383)	(LW polaco x LD polaco) x Du	15 0.5SS/kg SS, 17 SeO/kg (Trow		Baja TD con SeO

Biswal et al., (393)	Pvo=60 PVf= 110kg 40-50 días Yorkshire x Landrace Pvo=14.96 PVf=61.4	nutrition), 13 control sin añadido 20 machos 4 tratamientos I, control, II, 0.3 SS, III 100ppm Vit. E, IV 0.3ppm SS +100ppm vit. E	Sin efecto
Liu et al. (385)	Duroc x Landrace x Largewhite Pvo=47kg, PVf=105kg (69 días)	180 animales 3 tratamientos, control, minerales inorgánicos con SS a 0.3ppm y III minerales orgánicos SeO 0.3 (Selplex)	Sin efecto

---

### 3.6.3. Concentración de selenio en tejidos animales

Como se ha señalado anteriormente, otro aspecto importante a tener en consideración al definir el nivel de inclusión en dietas para ganado porcino, es el de la retención de este nutriente en los tejidos animales, ya que existe una clara relación entre los aportes y la acumulación tisular, con diferencias importantes entre tejidos (394) (Tabla 5).

Es preciso señalar en primer lugar que los alimentos de origen animal constituyen una de las principales fuentes de selenio en nutrición humana y una oportunidad para corregir posibles situaciones de deficiencia, pero también un riesgo potencial en caso de excesos incontrolados. Para una misma dosis, el riñón presenta las mayores acumulaciones, seguido del hígado y el músculo estriado (394). En este sentido, el consumo de carne enriquecida supone un aporte interesante, alcanzándose con el consumo de 200 g de músculo de cerdo suplementado con SeO una ingestión total de 70 µg (el doble del consumo diario habitual por habitante en España).

**Tabla 5.** Efecto de distintas fuentes de selenio en la concentración tisular al final del cebo, suplementación 40 días peso final 105 kg (394).

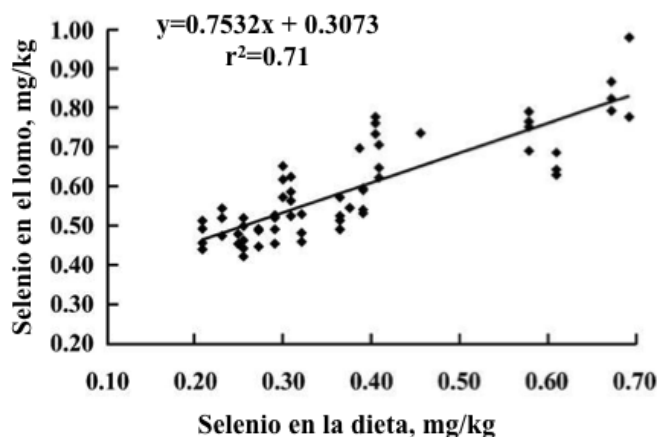
Localización	Control (0.045 µg/kg)	Selenito sódico (0.345 µg/kg)	Selenio orgánico (0.345 µg/kg)
Suero µg/ml	0.06 ± 0.013 <sup>y</sup>	0.15 ± 0.011 <sup>x</sup>	0.16 ± 0.013 <sup>x</sup>
Hígado µg/g	0.27 ± 0.027 <sup>z</sup>	0.53 ± 0.025 <sup>y</sup>	0.72 ± 0.052 <sup>x</sup>
Músculo estriado µg/g	0.10 ± 0.022 <sup>z</sup>	0.14 ± 0.022 <sup>y</sup>	0.35 ± 0.036 <sup>x</sup>
Riñón µg/g	1.7 ± 0.28 <sup>y</sup>	2.3 ± 0.32 <sup>x</sup>	2.6 ± 0.27 <sup>x</sup>

Medias con distinta letra en el superíndice de una misma fila son significativamente diferentes (P<0.05)

### 3.6.4. El selenio en nutrición humana: importancia de la carne

En general existe una deficiencia nutricional de Selenio en alimentación humana tanto en EEUU como en la UE dadas las características mayoritarias del suelo. La EFSA en 2009, pese a no reconocer un consumo inadecuado, sí considera probada la relación entre la ingesta de selenio con la protección frente al daño oxidativo del ADN, proteínas y lípidos, así como la función normal del sistema inmune, la tiroides y la espermatogénesis (395). Dadas las dificultades de evaluación de su ingesta, se emplea la concentración del mismo en plasma en la población como medida indirecta de consumo (396). La carencia observada, no alcanza en general el nivel crítico, que se encuentra en consumos inferiores a 0.1 mg/kg de peso vivo, equivalentes a una concentración en plasma inferior a 25 mg/l (397). Este último nivel es el requerido para la prevención de deficiencias de la GPx (396), maximizando la actividad de esta enzima a 95mg/l. Estos niveles son inferiores a las recomendaciones para el óptimo aprovechamiento del potencial del selenio de 300 µg/día, correspondientes con una concentración en plasma de 120-134 µg/L (396, 398), los 55-100 µg/día del NRC (1989) y las recomendaciones genéricas de 55 µg/día y 70 µg/día para mujeres y hombres respectivamente (399). No obstante, estas recomendaciones son anteriores a la asociación del consumo de Selenio y la diabetes. El estudio de Biesalski (400) muestra que el consumo de Selenio en Europa está bajando por debajo de los niveles recomendados. El aporte de la carne de cerdo de dicho estudio presenta un contenido de 0.14 µg/g peso húmedo/peso en Inglaterra, siendo de 0.104 µg/g en Irlanda, 0.265 µg/g en EEUU y de 0.078 µg/g en Polonia (18). En España la concentración de selenio en la carne de cerdo es similar a Polonia, presentando un nivel en cerdos con una alimentación comercial una chuleta una concentración de 0.081±0.035 µg/g, el

jamón fresco  $0.087 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$  y el curado  $0.179 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$  (401). Estos valores se corresponden con una alimentación sin suplementación según los estudio de (380, 402) (Figura 39).



**Figura 39.** Relación de la concentración de selenio en lomo (en base húmeda) con el selenio en dieta del estudio concentración selenio en piensos (402).

Existen también variaciones en la concentración del selenio en distintos tejidos animales en función de la fuente de suplementación utilizada. La Tabla 6 muestra los resultados en cerdos enfrentando la nutrición basal control sin refuerzo de selenio ( $0.045 \text{ mg Se/kg}$ ) frente aquellos suplementados con selenito o selenio orgánico a  $0.3 \text{ mg/kg}$  durante 40 días en cerdos de 60 kg (Du x LD x Yk). Vemos una mayor acumulación dependiendo de la fuente.

En España existen pocos estudios sobre la ingesta o situación del Selenio en la población y en general muestran una concentración plasmática baja. Aunque no se encuentran muchas referencias nutricionales válidas con los niveles de selenio en la dieta española, dada la complejidad de su análisis (396). Diaz-Alarcón estima un consumo medio de  $35 \mu\text{g/día}$  (401). También en el caso de la Unión Europea existen evidencias de presentación de deficiencia no clínicas, que no permiten alcanzar el óptimo rango de incorporación de este elemento a la dieta. Es importante definir la fuente de selenio ya que existen fuertes variaciones en las formas orgánicas y disponibilidad que hacen necesario definir el producto (403).

**Tabla 6.** Referencias de consumo de selenio por país resaltando áreas de bajo consumo (18).

Países consumo muy bajo		Países consumo bajo	
País	Consumo ( $\mu\text{g/día}$ )	País	Consumo ( $\mu\text{g/día}$ )
China	2-36	Francia	29-48
Arabia Saudita	15	Portugal	37
Polonia	11-40	Alemania	35-48
Reino Unido	12-43	Italia	43

La Tabla 7 resume las principales diferencias que pueden observarse entre el selenio orgánico y el mineral.

**Tabla 7.** Principales diferencias entre el selenio organico y el selenito. Adaptado de (18).

<b>Parámetro</b>	<b>Selenio organico</b>	<b>Selenito</b>
Absorción	Similar a la metionina con transporte activo en el tracto gastrointestinal	Similar a otros minerales con transporte pasivo
Acumulación	Presenta acumulación mediante incorporación de Se-Met en proteínas	No presenta alta acumulación en el cuerpo
Toxicidad	Al menos 3 veces menos tóxico que el selenito	Altamente tóxico, puede penetrar por la piel
Biodisponibilidad	Mayor biodisponibilidad en comparación con el selenito	Baja disponibilidad para rumiantes debido a reducción por los microorganismos en el rumen
Actividad antioxidante	SeMet con propiedades antioxidantes “per se”, puede atrapar distintos radicals como el NO	Posee propiedades pro-oxidantes y puede estimular la producción de radicals libres reaccionando con la GSH (Figura 40)
Efectos en el ADN	SeMet estimula las enzimas reparadoras del ADN	Puede producir daño en el ADN
Transferencia a los huevos leche y carne	Transferido a huevos leche y carne	Baja transferencia
Transmisión por la placenta	Transmisión mayor que el selenito	
Reacciones con otros elementos	Neutral, el ácido ascórbico promueve la asimilación de la SeMet de la dieta	Reactivo, Puede ser reducido a metálico sin asimilación por el ácido ascórbico
Protección en condiciones de estrés	Aumenta la protección al incrementar las reservas tisulares	No supone protección adicional dada la baja acumulación como reservas
Aspectos ambientales	Mejor retención en los tejidos que evita una mayor excreción	Baja retención presenta una elevada liberación a través de heces y orina

Fuera del campo de esta tesis, hay que destacar dentro de la investigación actual en el selenio las propiedades anticarcinogénicas que se le asocian (364), existiendo una relación entre deficiencia de selenio y mayor riesgo de cáncer (404, 405). El selenio se presenta como un compuesto importante reduciendo el impacto de los cancerígenos a través de una batería de efectos, reduciendo la actividad mutagénica, cambiando su toxicidad, estimulando el sistema inmune, previniendo la oxidación de Cys en la subunidad reguladora del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, regulando la apoptosis y la necrosis, reduciendo la síntesis de ADN, además de los efectos ya enunciados como antioxidante. Se considera el efecto prooxidante del selenito como parte importante del efecto anticarcinogénico (364).



**Figura 40.** Mecanismo propuesto de generación de radicales superóxido por el selenito (406, 407).

Esta es una pequeña revisión de un área de investigación con más de 100.000 artículos existentes (408) que presenta constantes cambios y evoluciones que ayudará a comprender la complejidad en el uso de este nutriente esencial así como sus posibles implicaciones.

### 3.7. Manipulación de la CRA a través de la nutrición

La CRA puede también modularse a través de la nutrición, pese a que los principales condicionantes sean la genética y el manejo anterior y posterior al sacrificio (1).

Los resultados bibliográficos de mejora en la CRA deben ser tomados con cuidado ya que los métodos analíticos presentan grandes variaciones estando ésta presente incluso entre los duplicados de muestras intralaboratorias.

Diferentes métodos han sido propuestos para la manipulación de la CRA de la carne y se seguirán proponiendo dada la importancia económica y comercial de la misma. Algunos presentan un mecanismo de acción mientras otros necesitan una revisión de los mismos en base al estado actual del conocimiento.

#### 3.7.1. Manipulación de macronutrientes

Existen pocas evidencias de que se pueda manipular la capacidad de retención de agua a través de cambios en la fuente de grasa, o en el nivel de proteína o lisina (1). Los principales macronutrientes para la mejora de la CRA son los carbohidratos, ya que dietas que supongan una reducción de las reservas de glucógeno aumentan la CRA (1). La concentración muscular de glucógeno anterior al sacrificio y la velocidad de glucogenólisis y glucolisis regulan la acumulación del lactato (59), que a través de la velocidad de bajada del pH puede determinar la proteólisis por calpaínas al suponer cambios en su activación (149, 409).

Esta reducción de las reservas puede alcanzarse a través de dietas pobres en almidón (bajo índice glicémico), con elevada fibra y alta grasa que suponen un aumento del  $\text{pH}_{24\text{hr}}$  y  $\text{pH}_{45\text{min}}$  (43).

Existen también referencias vinculando al ácido linolénico conjugado (CLA) con un aumento de la capacidad de retención de agua pero la realización de un metaanálisis con los mismos no demostró ningún efecto (1).

Estas dietas no se están realizando actualmente ya que presentan efectos económicos negativos secundarios al generar menores rendimientos y ser más caras de producir o gestionar en las últimas fases de la producción.

#### 3.7.2. Manipulación de micronutrientes

##### 3.7.2.1. Selenio

El efecto de la suplementación con selenio y en especial con selenio orgánico en cerdos se propone como mecanismo para la mejora de las propiedades funcionales y de calidad organoléptica de la carne (410). El selenio protege tanto a los lípidos como a las proteínas de los efectos deletéreos de la oxidación (411).

Las publicaciones al respecto varían en los resultados obtenidos pero también en el tipo de animal empleado, genética, suplementación, duración de la misma, nutrición, pesos finales, manejo perimortem y método de medición de la CRA generándose una fuerte variación en la que únicamente efectos “mayores” podrían generar resultados homogéneos.

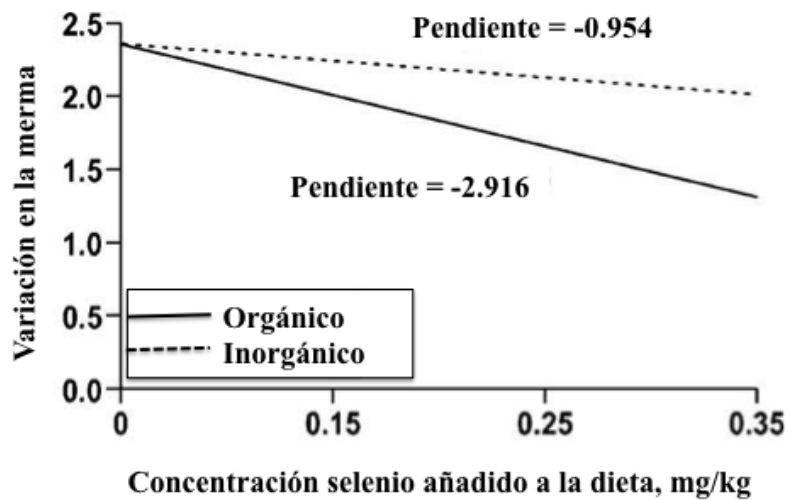
Los estudios encontrados (Tabla 8) sobre el efecto del selenio en la carne de cerdo muestran los resultados positivos de algunos investigadores que además de la mejora de la CRA encontraron otros efectos secundarios positivos como una carne más roja, con menor luminosidad y más estable a la oxidación (380, 412). En el estudio de Li y colaboradores se indicó un efecto nutrigenético incrementando la expresión del gen *Sepw1* que relacionó con el aumento de la CRA y capacidad antioxidante (412). Este incremento en la expresión va acompañado con incrementos en la glutatión peroxidasa que alcanzó los 10 días *post-mortem* (413).



**Tabla 8.** Principales estudios del efecto de la fuente y suplementación del selenio en la capacidad de retención de agua.

Referencia	Genética peso inicio y fin	Dosis (mg/kg pienso) /Días	Concentración alcanzada (mg/kg)	Selenio	Resultados CRA	pH
Wolter et al., 1998 (379)	PIC 406 Halotano (+) PVo 22kg PVf 110kg	48 anim. I. 24 anim. 0.172 SS PVo 80 PVf 110 II. 24 anim. 0.261 SeO (Sel-plex®).			Drip loss I. 2,56 SS vs II. 2.74 CRA I. 66.99 II. 66.46	pH <sub>24hr</sub> 5.37-5.38
Mahan et al., 1999 (380)	PVo 20.4kg, PVf 105kg	9 tratamientos I control y factorial 2x4 SS II 0.05, III 0.1 IV 0.2 V 0.3 SeO VI 0.05, VII 0.1 VIII 0.2 IX 0.3 (Sel-plex® Alltech)	I.- 0.085 II.- 0.106, III.- 0.114 IV.- 0.118 V.- 0.124 VI.- 0.134 VII.- 0.170, VIII.-0.249 IX.- 0.332		Drip loss del SS mayor 0.12 SeO similar al control	pH <sub>24hr</sub> I.- 5.49, II.- 5.53, III.- 5.47, IV.- 5.64, V.- 5.56, VI.- 5.59, VII.- 5.47, VIII.- 5.59, IX.- 5.49
Bobcek et al., 2004 (414)	LW x finalizador híbrido 40% heterocigotos halotano PVo =35, PVf=105	10 animales, 3 normales x sexo y 2 heterocigotos por tratamiento. I.- 0.18 SeO II.- 0.48 SeO	I.- 0.357 II.- 0.922		Tendencia I.- 6.98; II.- 6.26	pH <sub>45'</sub> I.- 6.28 II.- 6.35 pH <sub>24hr</sub> I.- 5.86 II.- 5.90
Zhan et al., 2007(394)	Duroc x Landrace x Yorkshire PVo=70kg, 40 días	108 animales 24 por tratamiento I.- 0.045 II.- 0.3 SS III.- 0.3ppm SeMet (Sigma)	I.- 0.06, II.- 0.14, III.- 0.35		SeO baja merma a 8 (I.- 8, II.- 7.4 III.- 6.8) y 16hr (I.- 14.3, II.- 14, III.- 12.5)	pH <sub>45'</sub> I.- 6.1, II.- 6.3 III.- 6.4
Mateo et al., 2007 (382)	Camboroug 22 x PIC Castrados PVo= 34.4kg PVf=129.9	180 anim, 6 réplicas 6 cerdos por réplica I.- (basal alto nivel SeO 0.18 ppm), II + 0.1 ppm SeO, III + 0.2 ppm SeO, IV + 0.3 ppm SeO, V + 0.3 ppm SS (SelenoSource-AF®)	I.- 0.132, II.- 0.196 III.-, 0.209, IV.- 0.336, V.- 0.201		Se mejora CRA en cerdos con selenio reducción merma lineal con concentración selenio en dieta (merma =2.305-2.398 x SeO dieta) (Figura 41)	Sin efecto en pH <sub>24h</sub> I.- 5.61, II.- 5.63, III.- 5.61, IV.- 5.57, V.- 5.58
Li et al., 2011 (412)	Genética PIC machos Pvo=10kg, PVf = 47kg 56 días	10 animales por tratamiento basal, I +0.3 II +3.0g/kg (Fubang®)	Concentración Se control 0.030, I 0.100, II 0.580		Drip loss reducida I.- 3.42 <sup>a</sup> vs 3.09 <sup>ab</sup> vs 2.52 <sup>b</sup>	pH <sub>45'</sub> 5.33 vs 5.94 vs 5.98 pH <sub>24</sub> 5.19 vs 5.5 vs 5.56
Lisiak et al., 2014 (383)	(LW polaco x LD polaco) x Du PCC Pvo=60 PCC= 85kg 40-50 días	15 0.5SS/kg SS, 17 SeO/kg (Trouw nutrition), 13 control sin añadido	Menor contenido en Se en el lomo con SS control 0.073mg/kg, SeO 0.094 SeO, control 0.078 muy similares		Baja la exudación con el SeO (4.33 con SS, 3.95 SeO y 4.03 control)	pH <sub>45'</sub> 6.32 con SS, 6.53 SeO y 6.37 control. pHu 5.86 SS, 5.9 SeO y 5.78 control





**Figura 41.** Variación observada en la merma a las 48h y la concentración de selenio orgánico o inorgánico añadido a la dieta (382).

Analizando los artículos anteriores vemos como en general no se ha incorporado el pH último o la caída del mismo al análisis de los resultados. Así en los artículos de Mahan (380) y Mateo (382) encontramos a un pH inferior menor merma en cerdos suplementados con SeO, pero un estudio directo de la merma que no llega a significativo. Si se descarta que el selenio tenga efecto en el pH final, sería necesario poder comparar entre iguales.

Los mecanismos de acción que se pueden plantear como hipótesis de funcionamiento del selenio en la CRA son variados. El mecanismo de acción sugerido tradicionalmente para los antioxidantes lipídicos es la mejora de la estabilidad de las membranas que se traduciría en una mayor capacidad de retención de líquidos dentro de las células (415, 416) y estructuras subcelulares. Este mecanismo se puede producir en el selenio gracias a su papel sinérgico con la vitamina E facilitando la recuperación de la misma a través de la glutatión peroxidasa que se ve incrementada por su consumo. Otro mecanismo más recientemente elucidado implica la calpaína y la sensibilidad de la misma a la oxidación, así encontramos como el nivel de péroxidos en el músculo está directamente relacionado con la merma (417) e inversamente relacionado con la proteólisis, que aumentada se refleja en la rotura de proteínas citoesqueléticas como la desmina, proteína Z, filamina, sinemina, distrofina y vinculina que permiten al sarcómero mantener su diámetro (54), así como evitar la formación de canales de exudado al no transmitirse la contracción de las estructuras e interferir en el establecimiento de las mismas (149). Otro mecanismo potencial a la vista de los resultados encontrados en los análisis puede ser una ligera modificación en la deposición del glucógeno, dada la peor respuesta de las células a la insulina, que genera una reducción del pH más lenta (73, 418). Esta opción, no se ha propuesto con anterioridad, pero a la vista de los resultados encontrados en las publicaciones podría confirmarse incrementando el número de animales.

En el estudio realizado por Edens y colaboradores en pollo (419), encuentran un efecto estacional del selenio en la CRA durante la primavera, pero no lo confirman en el resto de temporadas. Esto es achacado en este artículo a una estacionalidad, pero puede deberse a que el efecto del selenio, así como el de los antioxidantes no es tan manifiesto sino que precisa de condiciones específicas para desarrollar su actividad de forma que la misma sea evidente.

Dados estos condicionantes y la inestabilidad en la obtención de resultados consistentes, la EFSA en su revisión de 2011 no considera probados la mejora en el color de la carne ni la reducción en el exudado (376).

### 3.7.2.2. Vitamina E

La vitamina E puede ejercer su efecto en la capacidad de retención de agua de distintas maneras. Como el mecanismo de acción propuesto para el selenio, la vitamina E ejerce actividad antioxidante previniendo la oxidación de la calpaína y manteniendo las membranas celulares estables con fosfolípidos no oxidados (415, 416). No obstante, como en el caso del selenio, muchas referencias no encuentran este aumento de la CRA. A parte de todos los factores que pueden afectar a su evaluación expuestos en el Selenio, la vitamina E también puede generar un aumento en las reservas de glucógeno en los cerdos que se podrían traducir en una mayor bajada de pH y disminución de la CRA (40, 420).

Una reciente revisión (Tabla 9) de las publicaciones existentes y la realización de un metaanálisis (con las mismas arroja un efecto positivo de la suplementación en la CRA de la carne de cerdo (1). En esta publicación se encontró que suplementación de 100 mg/kg aumenta la CRA en 10.1 %, alcanzando a 200 mg/kg pienso una reducción cercana al 30 %. Los períodos de suplementación recomendados en esta publicación son superiores a 40 días.

**Tabla 9.** Efecto de la suplementación con vit. E ( $\alpha$ -tocoferol) en el porcentaje de pérdidas por goteo de la carne de cerdo (1).

Referencia	Control	Vitamina E (mg $\alpha$ -tocoferol/kg de dieta)		
		100	200	$\geq 400$
Ashgar et al., (421)				
3 días	19.0 <sup>x</sup>	16.2 <sup>x</sup>	10.2 <sup>y</sup>	
6 días	20.1 <sup>x</sup>	19.5 <sup>x</sup>	12.2 <sup>y</sup>	
10 días	21.3 <sup>x</sup>	21.2 <sup>x</sup>	14.1 <sup>y</sup>	
Cheah et al., (261)				
Exp. 1	9.1 <sup>x</sup>			5.0 <sup>y</sup>
Exp. 2	7.5 <sup>x</sup>			5.0 <sup>y</sup>
Cannon et al., (422)				
0 días	5.01	4.76		
14 días	3.81	3.30		
28 días	2.96	2.68		
Dirinck et al., (423)	8.5		8.17	
Jensen et al., (424)		3.7	4.0	4.4
Hoving-Bolink et al., (425)	6.9		6.9	
Rosenvold et al., (426)	5.3			4.7
Swigert et al., (427)	3.23			2.74
Meta-analysis (p=0.237) <sup>1</sup>	7.85	7.06	5.46	5.82
SE	$\pm 1.481$	$\pm 1.823$	$\pm 1.694$	$\pm 1.646$

<sup>1</sup> Control vs. Suplementación con vit. E por contrastes (p = 0.106)

<sup>x,y</sup> en una fila indica si presenta el mismo superíndice que no diferentes estadísticamente, si diferente superíndice que existe diferencia significativa (p<0.05)

SE, standard error

Uno de los mecanismos de acción propuestos es el aumento de la actividad proteolítica sobre distintas proteínas citoesqueléticas que se traduce en una mayor desaparición por ejemplo de la troponina T (Figura 42).

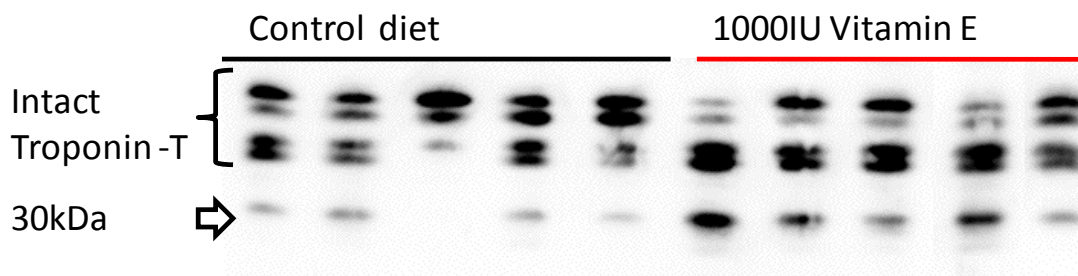


Figura 42. Cambio en la proteólisis de la troponina T entre dieta control y dieta suplementada con vitamina E (428).

Esta mejora de la estabilidad y capacidad proteolítica es la que planteamos como mecanismo de acción para la mejora de la CRA en el selenio.

### 3.7.2.3. Otros métodos

A través de la suplementación con **magnesio** a corto plazo antes de sacrificio podemos alcanzar una reducción en la estimulación neuromuscular ya que actúa como antagonista del calcio (429, 430). Esto se puede alcanzar mediante la suplementación de distintas fuentes y tiempos siendo significativa esta reducción de la estimulación desde el primer día de suplementación, no alcanzándose este resultado en suplementaciones largas (429, 431, 432) o a través del agua (433, 434). El grado de reducción alcanzado en estos estudios es importante bajando las pérdidas por exudado hasta un 23% (435).

La suplementación con **romo** presenta también resultados variables, encontrando que a 200ppb durante 35 y 55 días reduce las pérdidas por exudado (436), no siendo capaces de verificar este resultado otros autores (437, 438) encontrando efectos secundarios como una disminución del índice de yodo (437).

La **vitamina D3** desempeña también un papel importante en el metabolismo del calcio. Así altas dosis anteriores al sacrificio se cree que aumentan las concentraciones de calcio intracelulares aumentando la actividad de la calpaína (439-442). Esta investigación se ha desarrollado principalmente en vacuno y los estudios en cerdo no han mostrado resultados positivos, sino una reducción en los factores productivos, principalmente la ganancia media diaria (442, 443).

La **vitamina C** es uno de los principales antioxidantes hidrosolubles. Peeters y colaboradores concluyeron que su suplementación supranutricional no mejoró la CRA pero sí redujo la luminosidad e incrementó el valor  $a^*$  (444). Estudios anteriores (445) encontraron un incremento de la CRA suplementando los cerdos 4 horas antes del sacrificio.

El **resveratrol**, es un compuesto antioxidante producido por las plantas para su defensa contra ataques fúngicos. Pese a no ser actualmente viable para la práctica comercial, Zhang y colaboradores encuentran durante la fase de finalizado que la suplementación con 300-600 mg/kg que supone un aumento del pH, reducción de la merma, potencial glicolítico y aumento de la proteína (446).

El **triptófano** es uno de los precursores de la serotonina que puede verse reducida en los cerdos que experimentan situaciones de estrés. Un incremento en la dieta muestra una menor

prevalencia de carnes PSE y reduce las agresiones en los corrales de espera del matadero (447).

La suplementación con **creatinina** puede generar un aumento de los depósitos energéticos del músculo *post-mortem* sin generación de ácido láctico (448, 449) y mejorando al CRA.

El uso de **fitasas** incrementa la disponibilidad de muchos de los nutrientes revisados mejorando la CRA (450, 451). Así, en esta línea se han realizado estudios cubriendo el 200 % de las necesidades micro-nutricionales de los animales en base a los criterios del NRC. Este estudio ha mostrado una reducción de las pérdidas por exudado de un 30 % en LM.

Los estudios realizados con la creatinina son ilustrativos de otro factor de variabilidad importante como la genética. En el estudio de Young y colaboradores (452) vemos como la genética Duroc reacciona de manera diferente que los cerdos Landrace. Al tratarse de una fuente de energía y de genéticas con diferente cantidad de fibras oxidativas o glucolíticas parece posible la interacción de la genética o la fisiología diferente de las fibras con los resultados en la CRA. Este, junto con todos los factores perimortem y de nutrición muestra la dificultad de extraer información a través de metaanálisis que conlleven una simplificación del sistema.

## 4. Planteamiento y Objetivos

La capacidad de retención de agua de la carne es una cuestión importante desde el punto de vista comercial. Afecta a la pérdida de peso de canales y carnes (rendimiento, mermas), a la apariencia y a las propiedades tecnológicas.

La CRA está directamente relacionada con el estatus oxidativo, ya que diversos estudios desarrollados en los años 90 del pasado siglo han demostrado que el aporte de cantidades elevadas de vitamina E mejoraba la CRA. El mecanismo de actuación más generalmente aceptado es que estabiliza las membranas frente a la oxidación y ello permite retener mejor agua en las estructuras celulares (453). No obstante, algunos estudios más recientes señalan que el efecto de la vitamina E sobre la CRA puede estar también mediado por el papel protector sobre la calpaína en las horas inmediatamente posteriores al sacrificio. La calpaína es una proteasa muy susceptible a sufrir deterioro oxidativo, perdiendo su funcionalidad. Su acción proteolítica en los momentos posteriores al sacrificio es importante ya que produce una desvinculación de proteínas miofibrilares a la membrana celular, lo que puede permitir que el fenómeno de acortamiento durante el *rigor mortis* no lleve asociado un menor volumen celular y por tanto una pérdida de líquido (54).

Aunque la vitamina E es efectiva, se precisan dosis elevadas en pienso (superiores a 100-150 ppm) y tiempos de administración prolongados para producir efecto antioxidante en la carne, lo que unido al alto precio, hace que en la práctica el interés potencial en la mejora de la retención de agua sea cuestionable desde el punto de vista económico.

El selenito sódico (selenio mineral) se utiliza habitualmente en los correctores ya que previene patologías como el corazón de mora, la hepatitis dietética o el músculo blanco y aporta poder antioxidante, pero no se ha descrito hasta el momento que afecte a la CRA de la carne ni mejore de un modo apreciable la estabilidad oxidativa de la carne tras el sacrificio (454, 455).

La seleniometonina (selenio orgánico) que producen las levaduras en determinadas circunstancias se absorbe en el intestino por transporte activo y tiene un potencial antioxidante muy superior al selenio mineral. La alta disponibilidad, unido al carácter hidrosoluble y al rápido metabolismo permiten conseguir un efecto antioxidante con tiempos de administración más reducidos.

Por todas estas razones se plantea como principal objetivo en esta tesis doctoral estudiar las posibilidades que tiene el selenio orgánico de mejorar la CRA de la carne, aportando evidencia experimental sobre posibles mecanismos de acción.

La presente tesis tendrá como objetivo el análisis del efecto del selenio orgánico respecto al selenio mineral en la carne de cerdo:

Para ello, los objetivos parciales serán analizar este efecto:

1. En el estatus oxidativo de la carne, incluyendo la estabilidad del color de la carne.
2. En la concentración de vitamina E en el tejido muscular, lo que podría explicar las interacciones de estos dos nutrientes
3. En la composición de ácidos grasos
4. En la retención de agua de la carne
5. En el desarrollo de procesos proteolíticos *post-mortem*
6. En el desarrollo de procesos lipolíticos *post-mortem*



## 5. Trabajos experimentales

### 5.1. Trabajo Experimental 1

#### Effect of dietary selenium source (organic vs. mineral) and muscle pH on meat quality characteristics of pigs.

Los resultados del presente ensayo se recogen en el siguiente artículo ya publicado:

Effect of dietary selenium source (organic vs. mineral) and muscle pH on meat quality characteristics of pigs

Luis Calvo, Fidel Toldrá, Ana I. Rodríguez, Clemente López-Bote & Ana I. Rey

Food Science and Nutrition, 5(1), 2017, 94-102

.



## ORIGINAL RESEARCH

**Effect of dietary selenium source (organic vs. mineral) and muscle pH on meat quality characteristics of pigs**Luis Calvo<sup>1</sup>, Fidel Toldrá<sup>2</sup>, Ana I. Rodríguez<sup>1</sup>, Clemente López-Bote<sup>3</sup> & Ana I. Rey<sup>3</sup><sup>1</sup>Incarlopsa, Ctra. N-400 km. 95400, Tarancón, Cuenca 16400, Spain<sup>2</sup>Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Av Agustín Escardino 7, Paterna (Valencia) 46980, Spain<sup>3</sup>Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain**Keywords**

Color stability, drip loss, organic selenium, pH, TBARS

**Correspondence**Ana I. Rey, Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n., 28040 Madrid, Spain.  
Tel: +34.913943889; Fax: +91.3943781;  
E-mail: anarey@vet.ucm.es**Funding Information**

This research was supported by projects CDTI (IDI-20111017) and MEDGAN-CAM (S2013/ABI-2913).

Received: 15 January 2016; Revised: 17 March 2016; Accepted: 19 March 2016

**Food Science & Nutrition 2017; 5(1): 94–102**

doi: 10.1002/fsn3.368

**Introduction**

Selenium (Se) has become an interesting nutrient in animal production because it improves the nutritional value and quality characteristics of meat products (Surai 2006). This trace mineral was identified as a component of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px) (Rotruck et al. 1973), which participates in redox regulation by removing and decomposing hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides using glutathione as electron donor (Hayes and McLellan 1999). Consequently, selenium deficiency has been associated with diseases induced by increased oxidative stress such as various types of muscular dystrophy (Rederstorff et al. 2006), and in human increased susceptibility to some degenerative diseases such as cancer (Gramadzinska et al. 2008). These antioxidant functions of Se have also been shown to persist in postmortem

**Abstract**

This study evaluates the effect of organic (Se-enriched yeast; SeY) versus inorganic selenium (sodium selenite; SeS) supplementation and the different response of selenium source according to muscle pH on pork meat quality characteristics. Pigs ( $n = 30$ ) were fed the Se-supplemented diets (0.3 mg/kg) for 65 days. Neither electric conductivity (EC) nor drip loss were affected by the selenium source. The SeY group had lower TBARS in muscle samples after day 7 of refrigerated storage and higher  $a^*$  values on days 1 and 7 than the SeS group. The effect of dietary selenium source on some meat quality characteristics was affected by muscle pH. Hence, as the muscle pH increases, the drip loss decreases but this effect is more marked with the dietary organic Se enrichment. Muscle pH seems to modulate the action of selenium in pork, especially some meat characteristics such as drip loss.

muscle tissue (Mahan et al. 2014). Hence, various dietary strategies in animal feeding have been developed for providing Se-enriched meat in order to increase human selenium intake (Zhang et al. 2010).

Se is commonly added to pig diets as sodium selenite (SeS;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), an inorganic form. However, there has been increasing interest in organic Se in recent years because of its higher absorption and biological effectiveness in pigs (Mahan et al. 1999, 2014; Jang et al. 2010), broilers (Mikulski et al. 2009; Briens et al. 2013), turkeys (Juniper et al. 2011), cows (Juniper et al. 2008), and more recently laying hens (Delezie et al. 2014). Organic Se has also been reported to have higher antioxidant activity, whereas the inorganic form may act as a prooxidant (Spallholz 1994) and have toxic effects particularly at high levels (Seko et al. 1989). Antioxidant functions of organic Se are also more effective in delaying

postmortem oxidation reactions (Mahan et al. 2014), which affects adversely the nutritional value, flavor, and shelf life of meat products (Morrissey et al. 1998). In addition, other meat quality characteristics such as water-holding capacity or color, which are considered useful parameters for evaluating quality and consumer acceptability, were affected by organic Se supplementation (Mahan et al. 1999; Zhan et al. 2007). However, the organic form (from Se-enriched yeast) used in the feed industry does not always show positive effects on meat quality characteristics (Juniper et al. 2008, 2011; Kawecka et al. 2013; Lisiak et al. 2014). Organic forms such as Se-enriched yeast (SeY), are taken up via methionine transporter mechanisms and can be incorporated to selenoenzymes or in place of methionine into general body proteins (Suzuki and Ogra 2002) more readily than the inorganic form (Surai 2006). Se utilization and its effects on meat quality may also be affected by muscle characteristics since PSE filets from chickens present a compromised enzymatic antioxidant defense system with lower GSH-PX activity (Dos Santos et al. 2012). However, there is no information available on how different combinations of Se sources, organic and inorganic, and muscle pH affect pork meat quality.

We hypothesize that in pigs, selenium source affects meat quality characteristics in a different way depending on the pH of the meat 24 h after slaughter. The objectives of the present research were to study the effect of the source of selenium supplementation in pigs (organic as Se-enriched yeast vs. mineral as selenium selenite in feed) on some meat quality characteristics and the different response of selenium source according to muscle pH. Meat quality characteristics were measured as conductivity, drip loss, TBARS, and color changes.

## Material and Methods

All the experimental procedures used in this study comply with the Spanish guidelines for the care and use of animals in research (BOE 2013) and were in accordance with the protocols approved by the University Complutense of Madrid.

### Animals, experimental diets, and sample collection

Thirty pigs (Topigs 20 × Top York Topigs international) were housed in an environmentally controlled, slatted-floor facility (COPISO, Soria, Spain). Pigs were fed a commercial diet that fulfilled the minimum NRC requirements (NRC 2012). At an average, live weight of 61.2 ± 0.5 kg pigs were randomly selected and

distributed into two groups. Each pig was housed in an individual box (4.5 m<sup>2</sup>) during the experimental period. Experimental diets were formulated to provide nutrient composition above NRC (2012) recommendation diets (Table 1) and were identical in composition except for the selenium source: sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) (SeS) or selenomethionine from a Se-enriched yeast diet (*Sacharomices cervisae*, Sel-Plex; Alltech, Spain; Commission Regulation (EC) N° 1750/2006) (SeY). In all cases, Se was introduced in the vitamin–mineral mix to achieve a final concentration of 0.3 mg/kg (Table 1). Pigs were fed the experimental diets until the end of the experiment (65 days in total), with 120.4 ± 2.5 kg. Food and water were provided ad libitum during the duration of the study.

**Table 1.** Ingredients and chemical composition of the experimental diets.

<b>Ingredients</b>	
Wheat (%)	30.5
Barley (%)	20.2
Biscuit promic (%)	15.0
Pea 22/11, %	15.0
Sunflower 32 (%)	8.00
Colza 38 (%)	5.00
Fat 3/5	3.40
Soya bean 47	1.00
Calcium carbonate	0.95
L-lysine 50 (%)	0.32
Premix <sup>1</sup> (%)	0.20
Salt (%)	0.14
Bicalcium phosphate (%)	0.12
Enzyme pig	0.10
Bactericide	0.05
Fungicide	0.03
L-Threonine (%)	0.02
<b>Major nutrients</b>	
Dry matter (%)	90.1
Crude protein (%)	15.1
Fat (%)	5.90
Crude fiber (%)	5.30
Starch (%)	43.9
Lysine dig (%)	0.70
Met dig (%)	0.21
Met + Cis dig (%)	0.50
ED, kcal/kg	3,317

<sup>1</sup>Premix (per kg of finished diet): Vitamin A: 4000000 IU; Vitamin D<sub>3</sub>: 900000 IU; Vitamin E (all rac  $\alpha$ -tocopheryl-acetate): 7500 mg; Vitamin B<sub>1</sub>: 250 mg; Vitamin B<sub>2</sub>: 750 mg; Vitamin B<sub>12</sub>: 6 mg; Vitamin B<sub>6</sub>: 500 mg; Nicotinic acid: 7500 mg; Calcium Pantothenate: 5000 mg; Vitamin K<sub>3</sub>: 250 mg; Choline chloride: 50000; Fe (ferrous carbonate): 35000 mg; Cu (pentahydrate sulfate): 7500 mg; Co (hydrate carbonate): 25 mg; Zn (oxide): 50000 mg; Mn (oxide): 20000 mg; I (potassium iodure): 250 mg; Se (sodium selenite): 150 mg; 3-fitase EC 1,6,3,2: 325000 FTU; BHT E321: 1000 mg; citric acid E330: 3450 mg; sodium citrate E331: 100 mg.

For organic selenium, supplementation reduced to 0. Se in basal diet previous to premix addition was 0.14 mg/kg.

At the end of the experiment period, pigs were sent to a commercial slaughterhouse (Incarlopsa, Tarancón, Cuenca, Spain) and slaughtered after a fasting period of 24 h. Carcasses were chilled (4°C) and samples, approximately 15 cm in size, were taken from the *Longissimus thoracis* muscle. Before packing in modified atmosphere (60–70% CO<sub>2</sub>, 30–40% N<sub>2</sub>, and <0.5% CO) and approximately 24 h after slaughter, electric conductivity (EC), and pH were measured by means of a LFStar conductivity meter (Mattahäus Ingenieurbüro, Klaus, DE) and a portable pH meter pH\*K21 (NWK Binar, Puerger, DE), respectively.

## Laboratory analysis

### Drip loss in muscle samples

Drip loss was estimated by the suspension method (Honikel et al. 1986). For the determination of weight loss during storage, approximately 1 cm<sup>3</sup> samples (weighing approximately 10 g) were taken from the *Longissimus thoracis* muscle. After cutting, samples were weighed, put inside of a mesh and a plastic bag that was closed, and placed under refrigerated conditions at 4°C. Samples were weighed again at 72 h of storage. The difference between final and initial weights was used to calculate the drip loss that was expressed as a percentage of the initial weight.

Another piece of muscle was used for tocopherol and TBARS quantification and color measurement. Hence, 2-cm-thick samples were placed on trays, overwrapped with an oxygen-permeable polyvinyl chloride wrap, and kept at 4°C under florescent light (600 lx) for the following determinations.

### Tocopherol quantification in muscle samples

The  $\alpha$ -tocopherol concentration in muscle samples was quantified by direct extraction as described by Rey et al. (2010). Thus, muscle samples were mixed with 0.054 mol/L dibasic sodium phosphate buffer adjusted to pH 7.0 with HCl and absolute ethanol. After mixing, the tocopherol was extracted with hexane by centrifugation. The upper layer was evaporated to dryness and dissolved in ethanol prior to analysis. Tocopherols were analyzed by reverse phase HPLC (HP 1100, equipped with a diode array detector; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) as described elsewhere (Rey et al. 2010). Identification and quantification were carried out using a standard curve ( $R^2 = 0.999$ ) of the pure compound (Sigma, Alcobendas, Madrid). All samples were analyzed in duplicate. The  $\alpha$ -tocopherol concentration in muscle was assessed on days 1 and 7 of refrigerated storage at 4°C.

### TBARS analysis of muscle samples

Oxidation was assessed on days 1 and 7 by the thiobarbituric acid method described by Salih et al. 1987. A total quantity of 27 mL of perchloric acid (3.83% v/v) were added to 5 g of meat and the mixture was homogenized with an Ultra-Turrax homogenizer for 1 min. and filtered through filter paper. Aliquots were added to thiobarbituric acid (0.02 mol/L) (1:1) and heated in boiling water for 15 min. A standard curve was prepared with 1,1,3,3-tetraethoxypropane in water. Absorbance was measured at 532 nm and the values were expressed as mg MDA/kg meat.

### Instrumental color analysis

The same 2-cm-thick samples placed on trays and kept at 4°C were used for color measurement. Muscle color was evaluated on days 1 and 7 after slaughter by means of a Chroma Meter (CM 2002, Minolta, Camera, Osaka, Japan) previously calibrated against a white tile in accordance with the manufacturer's recommendations (CIE 1976). The average of five random readings was used to measure lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ), and yellowness ( $b^*$ ).

### Statistical analysis

The experimental unit for analysis of all data was the pig. Data were analyzed following a completely randomized design using the general linear model procedure contained in SAS (1999) (version 9; SAS Inst. Inc., Cary, NC).

To study differences in pH, EC, and drip loss, dietary treatment was considered the fix effect according to the following model:

$$Y_t = \mu + \alpha_t$$

where  $Y_t$  is the dietary treatment-dependent variable,  $\mu$  the overall mean, and  $\alpha_t$  the dietary treatment effect.

To compare differences in oxidation rate, vitamin E concentration, color parameters, and pigments between groups during time of refrigerated storage, dietary treatment, and time were considered fixed effects according to the following model:

$$Y_{ta} = \mu + \alpha_t + \beta_a + (\alpha\beta)_{ta}$$

where  $Y_{ta}$  is the dietary treatment or time response-dependent variable,  $\mu$  the overall mean,  $\alpha_t$  the dietary treatment effect,  $\beta_a$  the effect of time (at which samples were performed), and the corresponding interaction  $(\alpha\beta)_{ta}$ .

Data were presented as the mean of each group and root mean square error (RMSE) together with significance levels ( $P$  value). Differences between means were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

The relationships between storage time (dependent variable) and muscle TBARS as well as pH (dependent variable) and drip loss were also quantified by regression equations (Statgraphics Centurion XVI, v. 16.1). A Student's *t*-test was used to compare slopes of the regression equations.

## Results and Discussion

### Drip loss, electric conductivity, and pH in muscle samples

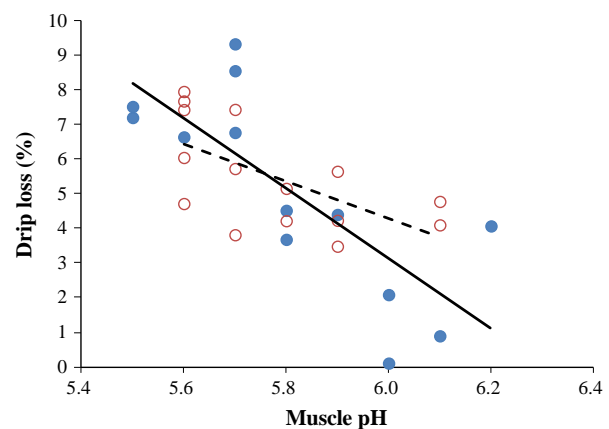
The EC and drip loss of the muscle samples from pigs fed with the experimental diets are presented in Table 2. Neither EC nor drip loss were affected by the selenium source. EC has been considered a reliable predictor of drip loss in pork muscle when measured at 24 h post-mortem (Lee et al. 2000). Previous studies on the effect of diverse selenium sources on these meat quality characteristics showed different results. Some authors found that the drip loss was lower and water-holding capacity was higher in pigs fed with the organic selenium (Mahan et al. 1999; Zhan et al. 2007; Li et al. 2011; Lisiak et al. 2014). However, other authors found a lack of effect in pork (Castro-Ríos and Narvaéz-Solarte 2013), or turkey meat (Juniper et al. 2011). The mechanism by which antioxidants modify drip loss and water-holding capacity has been attributed to its capacity to stabilize membrane integrity postmortem (Ashgar et al. 1991), whereas others have proposed that proteolysis and even protein oxidation are key in influencing the moisture retention capacity of meat (Lonergan and Lonergan 2005). In this sense, it has been reported that the mechanism by which Se forms act are different. Organic Se (in the form of Se-enriched yeast) is taken up via methionine transporter mechanisms and can be incorporated into selenoenzymes or in place of methionine in general body proteins (Suzuki and Ogra 2002). The replacement of Met by Se-Met does not significantly alter protein structure, but may influence the activity of enzymes if Se-Met replaces Met in the vicinity of the active site (Schrauzer 2000).

**Table 2.** Effect of selenium source (organic, SeY vs. mineral, SeS) on electric conductivity (EC) and pH at 24 h after slaughter,  $\alpha$ -tocopherol ( $\mu\text{g/g}$ ) and TBARS (mg MDA/kg meat) on days 1 and 7 of refrigerated storage in muscle samples from pigs fed with the experimental diets.

	SeY	SeS	RMSE	<i>P</i>
EC24	3.54	3.84	1.046	0.3107
pH24	5.53	5.77	0.075	0.1648
Drip loss (%)	7.13	5.50	1.613	0.4834

RMSE, Root of the mean square error.

Drip loss depends on the shortening of sarcomeres which is regulated by the interaction of muscle temperature and rigor development (Fischer 2007) and on the interactions between water and protein, which is affected in turn by postmortem proteolysis. Consequently, the velocity and extent of the pH fall after slaughter are considered determinant for meat drip loss. Low pH (about 5.4–5.6) decreases muscle protein ability to bind to water as well as reduces negative electrostatic repulsion between filaments, diminishing the space between them and causing shrinkage of myofibrils (Den Hertog-Meischke et al. 1997). To study with more detail the possible effect of muscle pH on the effect that dietary selenium source produce on meat quality characteristics, linear regression analysis was carried out. Muscle pH and drip loss were directly related by the linear equation: drip loss =  $52.2 \pm 9.2 - 8.11 \text{ pH} \pm 1.6$  ( $P = 0.0001$ ;  $R^2 = 0.50$ ; RSD = 1.23). Hence, as the muscle pH increases, the drip loss proportion decreases in turn with previous studies (Fischer 2007). Moreover, in the regression study carried out, it can be observed a different response between dietary Se source and muscle pH ( $R^2$  organic: 0.72,  $P = 0.0005$ ;  $R^2$  mineral: 0.37,  $P = 0.015$ ) in which the slope ( $-13.08 \pm 2.56$  for the organic form vs.  $-5.25 \pm 0.74$  for the mineral form) was statistically different (Fig. 1). As the muscle pH increases, the drip loss decreases but this effect is more marked in meat from pigs that received organic Se in the diet (Fig. 1). There is no previous information on the possible interaction effects between pH and selenium source in the literature. A possible explanation is that calpain enzymes are particularly susceptible to inactivation by oxidation and muscle pH



**Figure 1.** Drip loss (%) as affected by dietary treatment (organic Se —●—; or inorganic Se ---○) and muscle pH (Organic Se =  $80.72 (\pm 14.79) - 13.08 \times \text{pH} (\pm 2.56)$  a;  $R^2 = 0.72$ ; RSD = 1.19;  $P = 0.0005$ ; Inorganic Se =  $36.01 (\pm 10.95) - 5.28 \times \text{pH} (\pm 0.74)$  b;  $R^2 = 0.37$ ; RSD = 1.01;  $P = 0.015$ ).

(Lonergan and Lonergan 2005) since they contain histidine and SH-containing cysteine residues at their active sites. Calpain activation produces a rapid fragmentation of intermediate protein filaments in meat (such as desmin, which links myofibrils to the cell membrane), preventing shrinking of the overall muscle cell membrane (Lonergan and Lonergan 2005). Consequently, to maintain calpain activity reducing drip losses, a higher antioxidant balance and an enough high pH are needed. Hence, this study may point to a possible effect of pH on selenium biochemistry in muscle tissue. These results also suggest a different mechanism of Se on drip loss when compared to vitamin E which mainly act by protecting muscle membranes (Buckley et al. 1995) being consequently not muscle pH-dependent.

### Tocopherol accumulation

Vitamin E concentration was measured taking into account the synergistic relationship that exists between selenium and vitamin E to protect against cellular damage caused by reactive oxygen species (Saito et al. 2003) and this synergism may enhance meat quality (Surai 2002). Concentrations of  $\alpha$ -tocopherol in muscle of pigs are presented in Tables 3 and 4. Organic or inorganic selenium supplementations to pigs resulted in similar concentrations of  $\alpha$ -tocopherol in muscle at day 1 and 7 of refrigerated storage. Although tocopherol concentrations were not different ( $P = 0.087$ ), values in muscle samples from pigs fed with SeY seemed to be numerically higher with time of storage. There is not much available information on the possible effects of the selenium source on muscle vitamin E accumulation. It has been reported that

absorption of vitamin E is impaired by severe Se deficiency, and Se alleviates such deficiency, permitting higher levels of vitamin E to be absorbed (Finkel and Holbrook 2000).

Concerning the effect of storage time on  $\alpha$ -tocopherol concentration, it was found that as the storage time increased, the  $\alpha$ -tocopherol concentration was higher in muscle samples at day 1 when compared to day 7 (Table 3). These results were expected since vitamin E is the major lipid-soluble antioxidant present in the cell membrane and plays an important role as a chain-breaking lipid antioxidant and free radical scavenger in the membranes of cells and subcellular organs (Brigelius-Flohé and Traber 1999). It is interesting to note the reduction in vitamin E along storage ( $P = 0.0001$ ). Rey et al. (2010) also reported a 30% decrease in tocopherols concentration of dry-cured ham slices during the first 7 days of storage. These authors also found that samples in which the level was initially higher had a more intense decrease. However, there is not more available information in the literature on the effects of storage time on  $\alpha$ -tocopherol concentration in raw meat. In our study, no interactions were found between the time and selenium source of vitamin E levels. This lack of interaction effect was expected since vitamin E was not statistically affected by the selenium source.

Moreover, in our study, muscle pH did not affect vitamin E concentration (Table 4). A direct association between muscle vitamin E and lower drip loss has been described (Ashgar et al. 1991) and also a trend toward higher muscle pH at 24 h postmortem (5.7 vs. 5.5) (Lu et al. 2014); however, there is no further information on the possible interaction effects with the selenium source.

**Table 3.** Effect of selenium source (organic, SeY vs. mineral, SeS) and time on evolution of meat quality characteristics.

	SeY	SeS	Initial	Final	RMSE <sup>1</sup>	RMSE <sup>2</sup>	Time	Se	Time*Se
TBARS, mg	0.16	0.19	0.02	0.33	0.002	0.002	0.0001	0.0130	0.0125
MDA/kg meat									
Muscle	3.03	2.49	3.42	2.11	1.610	0.945	0.0001	0.0845	0.3280
$\alpha$ -tocopherol, $\mu$ g/g									
$L^*$ value	55.14	54.72	55.38	54.49	13.127	4.549	0.0774	0.9389	0.8475
$a^*$ value	6.77	5.55	7.02	5.30	2.116	0.827	0.0001	0.0027	0.7589
$b^*$ value	14.07	13.09	14.65	12.51	1.149	0.954	0.0001	0.0026	0.9320
Oxymyoglobin (OxyMb)	1.63	1.56	1.65	1.54	0.161	0.133	0.0001	0.0520	0.1926
Deoxymyoglobin (DeoxyMb)	1.05	1.05	1.04	1.05	0.948	0.942	0.2841	0.3282	0.3277
Metmyoglobin (MetMb)	0.87	0.87	0.84	0.90	1.145	1.123	0.0001	0.1335	0.1459

<sup>1</sup>RMSE: Root of the mean squares error from the main effect (selenium source).

<sup>2</sup>RMSE: Root of the mean squares error of the time and interactions.

**Table 4.** Effect of selenium source (organic, SeY vs. mineral, SeS) and pH on  $\alpha$ -tocopherol concentration, TBARS, and color (CIELAB  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , chroma, hue) of muscle samples from pigs fed with the experimental diets.

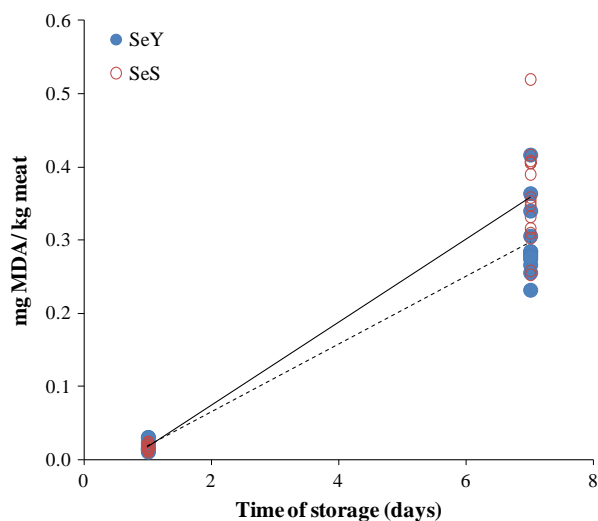
	SeY	SeS	RMSE	Se	pH	Se x pH
Muscle $\alpha$ -tocopherol, $\mu\text{g/g}$						
Day 1	3.24	3.03	1.452	0.1284	0.2981	0.2070
Day 7	1.93	1.96	0.554	0.1093	0.8636	0.3615
Days 1–7	1.32	1.07	1.345	0.3191	0.3080	0.2805
TBARS refrigerated storage, mg MDA/kg meat						
Day 1	0.02	0.02	0.006	0.5375	0.5162	0.9651
Day 7	0.33	0.36	0.056	0.0087	0.1646	0.1471
$L^*$ value						
Day 1	54.82	54.18	2.057	0.9637	0.3396	0.2590
Day 7	52.26	51.52	3.143	0.8772	<b>0.0248</b>	0.1524
Days 1–7	2.55	2.66	2.923	0.8430	0.1261	0.5761
$a^*$ value						
Day 1	7.61	6.62	1.186	<b>0.0060</b>	0.8666	0.5080
Day 7	6.84	5.72	1.149	<b>0.0106</b>	<b>0.0129</b>	0.9815
Days 1–7	0.77	0.91	1.143	0.7303	<b>0.0233</b>	0.3872
$b^*$ value						
Day 1	15.10	14.19	0.901	<b>0.0121</b>	0.8056	0.9941
Day 7	13.05	11.49	1.118	<b>0.0307</b>	0.5546	0.0714
Days 1–7	2.06	2.70	1.366	0.9314	0.8411	0.1432
Chroma						
Day 1	16.94	15.68	1.252	<b>0.0850</b>	0.8042	0.8930
Day 7	14.95	13.09	0.916	<b>0.0006</b>	0.8996	0.4231
Days 1–7	1.99	2.59	1.295	0.9272	0.6685	0.3947
Hue						
Day 1	63.56	65.14	2.881	<b>0.0260</b>	0.7898	0.2741
Day 7	62.55	66.14	3.830	<b>0.0164</b>	<b>0.0202</b>	0.6141
Days 1–7	-1.01	1.00	3.215	0.2702	<b>0.0135</b>	0.8782

RMSE, Root of the mean square error.

$L^*$  = luminosity;  $a^*$  = redness;  $b^*$  = yellowness; Chroma = color saturation; Hue = tone.

## TBARS in muscle samples

To evaluate the oxidative status of pig meat according to the source of selenium supplementation, TBARS were measured in muscle (Tables 3 and 4). The group supplemented with SeY had lower malondialdehyde (MDA) concentration in muscle samples than the SeS group ( $P = 0.013$ ) with the storage time (Table 3). The higher stability of muscle samples against lipid oxidation by SeY in pork has been reported previously (Zhan et al. 2007; Li et al. 2011). Similar results have been found in broiler (Chen et al. 2014) and turkey meat (Mikulski et al. 2009). Selenomethionine, the main form of organic Se present in Se-enriched yeast, is an efficient scavenger of strong oxidant peroxynitrite, which is a product of nitric oxide and superoxide and capable of oxidizing a high variety of biomolecules (Padmaja et al. 1996). Moreover, the oxidative status of the samples was related to the storage time; as the time increased, the MDA concentration was higher in muscle samples from the SeS group when compared to that from the SeY group (interaction time x source;  $P = 0.0125$ ) (Table 3, Fig. 2). Hence, the positive



**Figure 2.** TBARS (mg MDA/kg meat) as affected by dietary treatment (organic Se — ●; or inorganic Se --- ○) and time (Organic Se =  $0.027 (\pm 0.012) + 0.046 \times \text{days} (\pm 0.002)$  b;  $R^2 = 0.94$ ; RSD = 0.02;  $P = 0.0001$ ; Inorganic Se =  $0.039 (\pm 0.015) + 0.057 \times \text{days} (\pm 0.003)$  a;  $R^2 = 0.93$ ; RSD = 0.03;  $P = 0.0001$ ).

slope of the regression equation was lower for the SeY-enriched pigs than for the SeS enriched. This result agrees with those that report the higher antioxidant activity of the organic Se and its more effective effects in delaying postmortem oxidation reactions (Mahan et al. 2014).

Moreover, TBARS numbers were not statistically affected by muscle pH ( $P = 0.16$ ) and no interaction effect between selenium source and muscle pH was found. However, muscle samples with low pH had numerically higher TBARS than those with high pH. Juncher et al. (2001) reported that pork chops from groups with the lowest pH had higher TBARS and were less stable to oxidation compared to those with higher pH. It has been reported that the pH reduction could accelerate lipid oxidation due to the enhanced autoxidation of hemoglobin at reduced pH (Tsuruga et al. 1998). Consequently, TBARS development as affected by pH could also be studied by looking at its effect on color and pigment stability.

### Muscle color changes

Color changes, measured as  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (red color),  $b^*$  (yellow-green color), chroma (saturation or color intensity), and hue (color tone) after 1 and 7 days of refrigerated storage, are presented in Table 3. The SeY group had higher  $a^*$  values with storage time ( $P = 0.0027$ ) than the SeS-supplemented groups. The selenium source also affected the  $b^*$  values similarly. Hence, pigs supplemented with Se-enriched yeast diets had higher  $b^*$  values than those from the SeS group with the storage time ( $P = 0.0026$ ). These results are also observed in Table 4 where the Se and pH effect was evaluated. Chroma was also higher ( $P = 0.0006$ ) on day 7 and hue lower on day 1 ( $P = 0.026$ ) and 7 ( $P = 0.016$ ) in SeY group when compared to SeS group (Table 4). The results of this study are also consistent with those observed for the TBARS numbers. The color stabilization effect of different dietary selenium sources has been reported by others (Bobcek et al. 2004; Zhan et al. 2007). Moreover, it has been reported that the inorganic form may have more prooxidant properties than the organic form (Spallholz 1994). Mahan et al. (1999) reported that pigs fed with inorganic Se had paler muscle tissue that increased linearly as dietary Se level increased, but not when pigs were fed organic Se. However, other authors have not found any effect of selenium on meat color (Lisiak et al. 2014). Juniper et al. (2011) suggested that once the Se content of tissue exceeds the requirements of antioxidant enzymes, further increases in tissue Se do not result in any noticeable improvement in meat quality. Furthermore, organic forms such as Se-enriched yeast, are taken up via methionine transporter mechanisms and can be incorporated into selenoenzymes or in place of methionine

into general body proteins (Suzuki and Ogra 2002), in a different way to the inorganic form (Surai 2006). Consequently, 0.3 mg/kg of the organic Se used in this study resulted in higher intensity of the color and redness than the inorganic form.

Moreover, muscle pH also influenced  $L^*$  and  $a^*$  values (Table 4). Hence, samples with low muscle pH had higher  $L^*$  and lower  $a^*$  values than those with high pH at day 7 of storage ( $P = 0.025$  and  $P = 0.013$ , respectively). Losses in  $a^*$  value (red color) with time were also higher in low pH muscle samples ( $P = 0.023$ ). Color parameters were also not affected by Se and pH interaction as was observed for MDA content. The oxidation of oxymyoglobin to metmyoglobin which is accompanied by a change in the muscle redness is usually related to the muscle pH (James et al. 2002; Underland et al. 2004). This study provides novel information concerning the effect of Se and muscle pH. Zhan et al. (2007) reported that Se may slightly increase the pH value but no further research is available in the literature.

In conclusion, dietary organic selenium (SeY 0.3 mg/kg) improved the lipid stability of meat by reducing TBARS concentration with time when compared to the use of the inorganic sodium selenite. Dietary organic selenium also resulted in higher  $a^*$ ,  $b^*$  values, and color intensity in pig meat. Moreover, regression equations show that there is a different response between dietary Se source and muscle pH; hence, dietary organic Se results in a more marked drip loss decrease as the muscle pH increases. This study may point to a possible effect of pH on selenium biochemistry in muscle tissue. Further research is needed to understand the specific effect of pH on the chemistry and metabolism of selenium.

### Acknowledgments

This research was supported by projects CDTI IDI-20111017 and S2013/ABI-2913-MEDGAN-CAM.

### Conflict of Interest

This research has no conflict of interest.

### References

- Ashgar, A., J. I. Gray, E. R. Miller, P. K. Ku, A. M. Booren, and D. J. Buckley. 1991. Influence of supranutritional vitamin E supplementation in the feed on swine growth, performance and deposition in different tissues. *J. Sci. Food Agric.* 57:31–41.
- Bobcek, B., R. Lahucky, J. Mrazova, R. Bobcek, K. Novotna, and D. Vasicek. 2004. Effects of dietary organic selenium supplementation on selenium content, antioxidative status

- of muscles and meat quality of pigs. *Czech J. Anim. Sci.* 49:411–417.
- BOE. 2013. RD 53/2013, de 21 de octubre por la que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, Spain. *Bol. Of. Estado* 252:34367–34391.
- Briens, M., Y. Mercier, F. Rouffineau, V. Vacchina, and P. A. Geraert. 2013. Comparative study of a new organic selenium source v. seleno-yeast and mineral selenium sources on muscle selenium enrichment and selenium digestibility in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 110:617–624.
- Brigelius-Flohé, R., and M. G. Traber. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13:1145–1155.
- Buckley, D. J., P. A. Morrissey, and J. I. Gray. 1995. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *J. Anim. Sci.* 73:3122–3130.
- Castro-Ríos, K., and W. Narvaéz-Solarte. 2013. Sensory quality and cooking loss in pork meat: effect of sex and source of selenium. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial* 11:130–135.
- Chen, G., J. Wu, and C. Li. 2014. Effect of different selenium sources on production performance and biochemical parameters of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 98:747–754.
- CIE (Commission Internationale de l'Eclairage). 1976. Recommendations on uniform colour spaces color difference equations, *Psychometric Color Terms. Suppl. 2 to CIE Publication No. 15 (E-1.3.1.) 1978,1971/(TC-1-3)*. Commission Internationale de l'Eclairage, Paris, France.
- Delezie, E., M. Rovers, A. Van der, A. Ruttens, S. Wittocx, and L. Segers. 2014. Comparing responses to different selenium sources and dosages in laying hens. *Poult. Sci.* 93:3083–3090.
- Den Hertog-Meischke, M. J. A., R. J. L. M. van Laack, and F. J. M. Smulders. 1997. The water-holding capacity of fresh meat. *Vet. Q* 19:175–181.
- Dos Santos, G. R., D. F. Marchi, J. N. de Almeida, F. J. Mendonca, M. Shimokomaki, and A. L. Soares. 2012. Secreted phospholipase A (2) and glutathione peroxidase activities in chicken PSE (pale, soft, exudative) meat. *Seminario-Ciencias Agrarias* 33:3111–3115.
- Finkel, T., and N. J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247.
- Fischer, K. 2007. Drip loss in pork: influencing factors and relation to further meat quality traits. *J. Anim. Breed. Genet.* 124:12–18.
- Gramadzinska, J., E. Reszka, K. Bruzelius, W. Wasowicz, and B. Akesson. 2008. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur. J. Nutr.* 47:29–50.
- Hayes, J. D., and L. I. McLellan. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res.* 31:273–300.
- Honikel, K. O., C. I. Kim, R. Hamm, and P. Roncales. 1986. Sarcomere shortening of prerigor muscles and its influence on drip loss. *Meat Sci.* 16:267–270.
- James, B. W., R. D. Goodband, J. A. Unruh, M. D. Tokach, J. L. Nelssen, S. S. Dritz, et al. 2002. Effect of creatine monohydrate on finishing pig growth performance, carcass characteristics and meat quality. *Anim. Feed Sci. Technol.* 96:135–145.
- Jang, Y. D., H. B. Choi, S. Durosoy, P. Schlegel, B. R. Choie, and Y. Y. Kim. 2010. Comparison of bioavailability of organic selenium sources in finishing pigs. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 23:931–936.
- Juncher, D., B. Ronn, E. T. Mortensen, P. Henckel, A. Karlsson, L. H. Skibsted, et al. 2001. Effect of pre-slaughter physiological conditions on the oxidative stability of colour and lipid during chill storage of pork. *Meat Sci.* 58:347–357.
- Juniper, D. T., R. H. Phipps, E. Ramos-Morales, and G. Bertin. 2008. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 86:3100–3109.
- Juniper, D. T., R. H. Phipps, and G. Bertin. 2011. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in commercial-line turkeys. *Animal* 5:1751–1760.
- Kawecka, M., E. Jacyno, B. Matysiak, A. Kolodziej-Skalska, and A. Pietruszka. 2013. Effects of selenium and vitamin E supplementation on selenium distributions and meat quality of pigs. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.* 63:194–200.
- Lee, S., J. M. Norman, S. Gunasekarn, R. L. J. M. van Laack, B. C. Kim, and R. G. Kauffman. 2000. Use of electrical conductivity to predict water-holding capacity in post-rigor pork. *Meat Sci.* 55:385–389.
- Li, J., J. Zhou, H. Zhao, X. Lei, Z. Xia, G. Gao, et al. 2011. Enhanced water-holding capacity of meat was associated with increased *Sepw1* gene expression in pigs fed selenium-enriched yeast. *Meat Sci.* 87:95–100.
- Lisiak, D., P. Janiszewski, T. Blicharski, K. Borzuta, E. Grzeslowski, B. Lisiak, et al. 2014. Effect of selenium supplementation in pig feed on slaughter value and physicochemical and sensory characteristics of meat. *Ann. Anim. Sci.* 14:213–222.
- Lonergan, E., and S. T. Lonergan. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of post-mortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* 71: 194–204.
- Lu, T., A. F. Harper, J. M. Scheffler, B. A. Corl, M. J. Estenne, J. Zhao, et al. 2014. Supplementing antioxidants to pigs fed diets high in oxidants: II. Effects on carcass

- characteristics, meat quality, and fatty acid profile. *J. Anim. Sci.* 92:5464–5475.
- Mahan, D. C., T. R. Cline, and B. Richert. 1999. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality. *J. Anim. Sci.* 77:2172–2179.
- Mahan, D. C., M. Azain, T. D. Crenshaw, G. L. Cromwell, C. R. Dove, S. W. Kim, et al. 2014. Supplementation of organic and inorganic selenium to diets using grains grown in various regions of the United States with differing natural Se concentrations and fed to grower-finisher swine. *J. Anim. Sci.* 92:4991–4997.
- Mikulski, D., J. Jankowski, Z. Zdunczyk, M. Wroblewska, K. Sartowska, and T. Majewska. 2009. The effect of selenium source on performance, carcass traits, oxidative status of the organism and meat quality of turkeys. *J. Anim. Feed Sci.* 18:518–530.
- Morrissey, P. A., P. J. A. Sheehy, K. Galvin, J. P. Kerry, and D. J. Buckley. 1998. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci.* 49:73–86.
- NRC. 2012. National Research Council, Nutrient requirement of Swine, 11th edition. NRC, National Academy Press, Washington DC, USA.
- Padmaja, S., G. L. Squadrito, J. N. Lemercier, R. Cueto, and W. A. Pryor. 1996. Rapid oxidation of DL-selenomethionine by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 21:317–322.
- Rederstorff, M., A. Krol, and A. Lescure. 2006. Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:52–59.
- Rey, A. I., C. J. López-Bote, A. Daza, and C. Lauridsen. 2010. Accumulation and evolution of tocopherols in dry-cured hams from Iberian pigs as affected by their feeding and rearing system. *Food Chem.* 123:1170–1175.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, and W. G. Hoekstra. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179:588–590.
- Saito, Y., Y. Yoshida, T. Akazawa, K. Takahashi, and E. Niki. 2003. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J. Biol. Chem.* 278:39428–39434.
- Salih, M., D. M. Smith, J. F. Price, and L. E. Dawson. 1987. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult. Sci.* 66:1483–1488.
- SAS. 1999. SAS user's guide statistics. Statistical Analysis Systems Institute Inc, Cary, NC.
- Schrauzer, G. N. 2000. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J. Nutr.* 130:1653–1656.
- Seko, Y., Y. Saito, J. Kitahara, and N. Imura. 1989. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. Pp. 33–70 *in* A. Wendel, ed. *Selenium in biology and medicine*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Spallholz, J. E. 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic. Biol. Med.* 17:45–64.
- Surai, P. F. 2002. Selenium in poultry nutrition 2. Reproduction, egg and meat quality and practical applications. *World's Poult. Sci. J.* 58:431–450.
- Surai, P. F. 2006. Selenium absorption and metabolism. Pp. 161–171 *in* Cromwell Press, ed. *Selenium nutrition and health*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Suzuki, K.T., and Y. Ogra. 2002. Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Addit. Contam.* 19:974–983.
- Tsuruga, M., A. Matsuoka, A. Hachimori, Y. Sugawara, and K. Shikama. 1998. The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin. *J. Biol. Chem.* 273:8607–8615.
- Underland, I., H. G. Kristinsson, and H. O. Hultin. 2004. Hemoglobin-mediated oxidation of washed minced cod muscle phospholipids: effect of pH and hemoglobin source. *J. Agric. Food Chem.* 52:4444–4451.
- Zhan, X., M. Wang, R. Zhao, W. Li, and Z. Zu. 2007. Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132:202–211.
- Zhang, W., S. Xiao, H. Samaraweera, E. J. Lee, and D. U. Ahn. 2010. Improving functional value of meat products. *Meat Sci.* 86:15–31.



## 5.2. Trabajo Experimental 2

### Meat quality, free fatty acid concentration and oxidative stability of pork from animals fed diets containing different sources of Selenium

Los resultados del presente ensayo se recogen en el siguiente artículo en evaluación:

Meat quality, free fatty acid concentration and oxidative stability of pork from animals fed diets containing different sources of Selenium

Luis Calvo, José Segura,\* , Fidel Toldrá, Mónica Flores, Ana Isabel Rodríguez, Clemente José López-Bote, Ana Isabel Rey



## Meat quality, free fatty acid concentration and oxidative stability of pork from animals fed diets containing different sources of Selenium

Luis Calvo<sup>1,2</sup>, José Segura<sup>1,\*</sup>, Fidel Toldrá<sup>3</sup>, Mónica Flores<sup>3</sup>, Ana Isabel Rodríguez<sup>2</sup>,  
Clemente José López-Bote<sup>1</sup>, Ana Isabel Rey<sup>1</sup>

*1 Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain*

*2 Incarlopsa, N-400, Km 95.4, 16400, Tarancón (Cuenca), Spain*

*3 Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna (Valencia), Spain*

---

*This study evaluates the effect of the source of dietary Selenium (Se) supplementation (organic vs mineral) and the combined effect of organic Se and vitamin E on the fatty acid composition and lipolysis in pork intramuscular fat and other meat quality characteristics such as drip loss and lipid stability. Higher vitamin E deposition, lower drip loss and higher stability against oxidation were detected in muscle from pigs fed organic Se. Also higher proportion of free fatty acids was observed in intramuscular fat from pigs fed organic Se than group fed inorganic Se, being these mainly coming from neutral lipid fraction. In addition, the inclusion of vitamin E in the diet enhanced such effect. Dietary organic Se also increased  $\Delta 9$ -desaturase and elongase indexes and C18:1n-9 concentration. A related decrease of C18:0 concentration was also observed. Described differences in the lipid-fraction composition could affect sensory characteristics of meat and meat products.*

---

**Keywords:** organic selenium; vitamin E; drip loss; TBARS; lipolytic enzymes; free fatty acids.

### INTRODUCTION

The inclusion of antioxidants such as selenium (Se) and/or vitamin E in animal diets is one of the most used dietary interventions focused in the improvement of meat quality. Some pork-quality parameters improved by vitamin E are color, lipid stability against oxidation (Faustman and Want, 2000; Rey et al., 2004) and water holding capacity (WHC) (Ashgar et al., 1991; Monahan et al, 1992). Effects of dietary vitamin E supplementation such as

reduction of cellular water losses are explained by its antioxidant effect on cell membranes (Apple, 2007).

In animals, Se is necessary for selenoproteins, which play a key role in numerous metabolic processes such as the defense against free radicals and their detoxification (Lener et al., 2012) thereby, reducing the risk of many diseases (Fairweather-Tait et al., 2011). In humans, meat enriched with Se may improve body-Se levels, especially in Se-deficient populations. Se has been added to swine diets as

sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) and Se-methionine from Se-enriched yeasts, an inorganic and organic form respectively. Higher antioxidant activity has been reported for organic Se, whereas the inorganic form may act as a prooxidant (Spallholz, 1994) and have toxic effects particularly at high levels (Kim and Mahan, 2001; Seko et al., 1989). Organic Se has also higher effectiveness in delaying post-mortem oxidation reactions (Mahan et al., 2014). The antioxidant functions of Se are related to the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (Schrauzer, 2000) which has been shown their persistence in post-mortem muscle tissue (Mahan et al., 2014). Moreover, when diets are supplemented with the organic form, higher amount of Se is accumulated in muscles and organs of pigs (Kim and Mahan, 2001). In addition, it has been reported that dietary Se also improves WHC and color, especially when it is supplied as organic form (Bobček et al., 2004; Mateo et al., 2007).

Some recent works indicate that the inclusion of antioxidants in animal diets can, not only improve the oxidative stability of meat but also the activity of some enzymes. Particularly, it has been observed the enhanced post-mortem activity of calpains by the inclusion of vitamin E (Rowe et al., 2004). Fully related is the proposition of Huff-Loneragan and Lonergan (2005) in which they describe that calpain activation may increase a rapid proteolysis of intermediate filament proteins in meat (mainly

desmin), avoiding shrinking of the overall muscle cell and, consequently, reducing cell membrane contraction, directly linked to WHC. Supporting these results, Calvo et al. (2016a) described that organic Se effectively increased WHC and post-mortem muscle proteolytic activity. Additionally, it has been reported that Se may regulate adipogenesis and lipolysis in the organism (Wang et al., 2016) and that some vitamins may also have metabolic regulation of lipids in vivo (Koshkenbaev et al., 1985). However, there is not information on the possible lipolytic effects of the different forms of Se post-mortem. Therefore, it was hypothesized that Se source may also affect the lipolysis process happening after slaughter in pigs.

The objective of the present research was to study the effect of the source of dietary Se supplementation in pigs (organic as Se-enriched yeast vs mineral as selenium selenite in feed) and the combined effect of organic Se and vitamin E on the fatty acid composition and, therefore, lipolysis in pork intramuscular fat. In addition, other meat quality characteristics such as drip loss or lipid stability were studied.

## MATERIAL AND METHODS

All the experimental procedures used in this study comply with the Spanish guidelines for the care and use of animals in research (BOE, 2013).

### **Animals, Experimental Diets and Sample collection**

Thirty pigs (Topigs 20 × Top York Topigs international) were randomly selected at an average live weight of  $61.2 \pm 0.5$  kg and distributed into three groups (COPISO, Soria, Spain). Each pig was housed in an individual box during the experimental period. Diets were formulated to provide nutrient composition above NRC (2012) recommendation diets (Table 1) and were identical in composition except for the selenium source: sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (SeS), selenomethionine from a Se-enriched yeast diet (*Sacharomices cervisiae*, SelPlex; Alltech, Spain; Commission Regulation (EC) N° 1750/2006) (SeY). A third group included organic Se and vitamin E (100 mg alpha-tocopheryl acetate per kg diet) (SeY-E). In all cases, Se was introduced in the vitamin-mineral mix to achieve a final concentration of  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (Table 1). Pigs were fed the experimental diets until the end of the experiment (65 days in total), with  $120.4 \pm 2.5$  kg BW. Food and water were provided ad libitum during the duration of the study. At the end of the experiment period, pigs were sent to a commercial slaughterhouse (Incarlopsa, Tarancón, Spain) and slaughtered after a fasting period of 20 h. Carcasses were chilled ( $4^\circ\text{C}$ ) and samples, approximately 50 cm in size, were taken from the Longissimus thoracis (LT) muscle.

### **Methods**

*Drip loss in Muscle samples.* For the determination of weight loss during storage, approximately 1 cm<sup>3</sup> samples (weighing approximately 10 g) were taken from the LT muscle. After cutting, samples were weighed and placed under refrigerated conditions at  $4^\circ\text{C}$  in a saturated atmosphere. Samples were weighed again at 72 h of storage. The difference between final and initial weights was used to calculate the drip loss that was expressed as a percentage of the initial weight (Honikel, 1997).

*Lyophilization of samples.* Removing moisture from samples was carried out by including 50 g of minced fresh meat in a Lyophilizer (Lyoquest, Telstar, Tarrasa, Spain) until constant weight. The difference between final and initial weights was used to calculate the water loss by lyophilization that was expressed as a percentage of the initial weight.

*Tocopherol Quantification in Muscle Samples.* The  $\alpha$ -tocopherol concentration in muscle samples was quantified by direct extraction as described by Rey et al. (2006). Thus, muscle samples were mixed with 0.054 M dibasic sodium phosphate buffer adjusted to pH 7.0 with HCl and absolute ethanol. After mixing, the tocopherol was extracted with hexane by centrifugation. The upper layer was evaporated to dryness and dissolved in ethanol prior to analysis. Tocopherols were analyzed by reverse phase HPLC (HP 1100, equipped with a diode array detector; Agilent Technologies, Waldbronn,

Germany) as described elsewhere (Rey and López-Bote, 2014). Identification and quantification were carried out using a standard curve ( $R^2 = 0.999$ ) of the pure compound (Sigma, Alcobendas, Madrid). All samples were analyzed in duplicate. The  $\alpha$ -tocopherol concentration in muscle was assessed on day 0.

*TBARS Analysis of Muscle Samples.* Oxidation was assessed on days 1 and 7 by the thiobarbituric acid method described by Salih et al. (1987). Twenty-seven mL of perchloric acid (3.83% v/v) were added to 5 g of meat and the mixture was homogenized with an Ultra-Turrax homogenizer for 1 min. and filtered through filter paper. Aliquots were added to thiobarbituric acid (0.02 M) (1:1) and heated in boiling water for 15 min. A standard curve was prepared with 1,1,3,3-tetraethoxypropane in water. Absorbance was measured at 532 nm and the values were expressed as mg MDA per kg meat.

*Glutathione quantification.* Reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSH) were quantified spectrophotometrically at 405 nm in deproteinized muscle using the corresponding diagnostic colorimetric kit (Arbor assays, USA). The concentration of oxidized glutathione was determined from the 2-vinylpyridine-treated samples read off 2-vinylpyridine-treated standard curve. Concentrations of free glutathione (GSH-free) were obtained from the 2-vinylpyridine-treated standard from non-treated standards and samples (total GSH). The

concentrations obtained were expressed as  $\mu\text{M}$  of glutathione.

*Instrumental Color Analysis.* Two-cm-thick samples were placed on trays and kept at 4 °C for color measurement. Muscle color was evaluated on days 1 and 6 after slaughter by means of a Chroma Meter (CM 2002, Minolta, Camera, Osaka, Japan) previously calibrated against a white tile in accordance with the manufacturer's recommendations (CIE, 1976). The average of five random readings was used to measure lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ), and yellowness ( $b^*$ ).

*Lipid fractions of Intramuscular fat.* Lipids from muscle samples were extracted and methylated using the procedure described by Segura and López-Bote (2014). Lyophilized samples were accurately weighed in a safe-lock micro test tube, homogenized in 1.5 mL dichloromethane-methanol (8:2), and mixed in a mixer mill (MM400, Retsch technology, Haan, Germany). The final biphasic system was separated by centrifugation (8 min at 10,000 rpm) and the collected solvent was evaporated under nitrogen stream. The lipid content was gravimetrically determined. Total lipid extracts were fractionated in neutral lipids (NL), free fatty acids (FFA) and polar lipids (PL) using the procedure described by Ruiz et al. (2004). Briefly, 20 mg of intramuscular fat dissolved in 0.15 mL of hexane : chloroform : methanol (95:3:2) was added to a 500 mg aminopropyl minicolumn (Varian, CA, USA), which

had been previously activated with 7.5 mL of hexane. NL were eluted with 5 mL of chloroform, FFA were eluted with 5 mL of diethylether : acetic acid (98:2) and PL were eluted in two different fractions. The first one with 2.5 mL methanol : chloroform (6:1) and the second one with 2.5 mL of sodium acetate in methanol : chloroform (6:1). The two fractions containing PL obtained with this method were mixed and analyzed together.

*Fatty acid profile.* Lipid fractions were subjected to esterification by heating the obtained fractions at 80 °C for 1 h in 3 mL of methanol : toluene : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (88:10:2 by volume) as described by Garcés and Mancha (1993). After tempering, the fatty acids methyl esters (FAMES) were extracted with hexane and directly injected in GC system. Gas-liquid chromatography conditions: FAMES were separated using a gas chromatograph (HP 6890 Series GC System) equipped with flame ionization detector. Separation was performed with a JandW GC Column, HP-Innowax Polyethylene Glycol (30 m × 0.316 mm × 0.25 µm). Nitrogen was used as a carrier gas. After injection at 170 °C, the oven temperature was raised to 210 °C at a rate 3.5 °C/min, then to 250 °C at a rate of 7 °C/min and held constant for 1 min. The flame ionization was held at 250 °C. FAME peaks were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain), quantified by using

C15:0 as internal standard and expressed as percentage (%).

Unsaturation index (UI) was calculated as follows: 1 (% monoenoics)+2 (% dienoics) + 3 (% trienoics)+4 (% tetraenoics) + 5 (% pentaenoics) + 6 (% hexaenoics). Average chain length (ACL) was calculated as  $\Sigma (n \times (\% \text{ fatty acid } n)) / 100$ , n = number of atoms of carbon. Desaturase and elongase indexes were calculated according to Korniluk et al. (2008).

*Statistical Analysis.* The experimental unit for analysis of all data was the pig. Data were analyzed following a completely randomized design using the general linear model (GLM) procedure contained in SAS (version 9; SAS Inst. Inc, Cary, NC). Data were presented as the mean of each group and root mean square error (RMSE) together with significance levels (P - value). Duncan's test was used to separate treatment means. Means were statistically different when P - value was lower than 0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

Tocopherol accumulation, selenium, minerals content and oxidative status of muscle

Concentration of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) in muscle of pigs is presented in Table 2. Muscle samples from pigs fed SeY group showed a 23 % increased  $\alpha$ -tocopherol level than those fed SeS (P < 0.0001) even though same concentrations of vitamin E were added to the feed. There is a synergism

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets.

	SeS	SeY	SeY-E
<i>Ingredients<sup>1</sup>(mg·kg<sup>-1</sup>)</i>			
Vitamin E (α-Tocopherol)	21.6	22.4	121.1
Selenium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	0.4	0	0
Selenium (Selplex)	0	0.4	0.4
<i>Chemical composition(g·kg<sup>-1</sup>)</i>			
Dry matter	8.98	8.98	8.98
Crude protein	1.32	1.32	1.32
Fat	0.62	0.62	0.62
Crude fiber	0.42	0.42	0.42
Ash	0.44	0.44	0.44
Starch	4.63	4.63	4.63
Lysine dig	0.07	0.07	0.07
Met dig	0.02	0.02	0.02
Met + Cis dig	0.04	0.04	0.04
Thr dig	0.04	0.04	0.04
Premix <sup>2</sup>	8.98	8.98	8.98
<i>ED (kcal·kg<sup>-1</sup>)</i>	2449	2449	2449
<i>Fatty acids (mg·kg<sup>-1</sup>)</i>			
C16:0	7.3	8.0	8.2
C18:0	2.6	3.0	3.2
C18:1n-9	9.8	9.9	10.1
C18:1n-7	0.6	0.5	0.7
C18:2n-6	8.4	8.9	8.5
C18:3n-3	0.8	0.7	0.9

SeS: group of sodium selenite added; SeY: organic Selenium group; SeY-E: organic selenium and vitamin E group.

<sup>1</sup>Ingredients (g·kg<sup>-1</sup>): Barley, 484.4; Wheat, 25.0; Corn, 8.00; Soya cake 47, 6.00; Sunflower oil, 5.00; Mixed fats, 4.50 ; Calcium carbonate, 1.03; L-lysine, 0.54; Sodium bicarbonate, 0.50; Bicalcium phosphate, 0.37; Salt, 0.26; L-Threonine, 0.08; Bactericide, 0.05; Fungicide, 0.03.

<sup>2</sup>Premix (per kg of finished diet): Vitamin A: 8000000 IU; Vitamin D<sub>3</sub>: 1800000 IU; Vitamin B<sub>1</sub>: 500 mg; Vitamin B<sub>2</sub>: 150 mg; Vitamin B<sub>12</sub>: 12 mg; Vitamin B<sub>6</sub>: 1000 mg; Nicotinic acid: 1500 mg; Calcium Pantothenate: 5000 mg; Vitamin K<sub>3</sub>: 250 mg; Choline chloride: 100000; FeCO<sub>3</sub>: 35000 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O: 7500 mg; Co (hydrate carbonate): 25 mg; ZnO: 50000 mg; Mn (oxide): 20000 mg; KI: 250 mg; 3-fitase EC 1,6,3,2: 325000 FTU; BHT E321: 1000mg; citric acid E330: 3450; sodium citrate E331: 100 mg.

between Se and vitamin E to protect against cellular damage caused by reactive oxygen species (Saito et al., 2003), which may enhance meat quality (Surai, 2002). It has been reported that absorption of vitamin E is impaired by Se deficiency, and dietary Se alleviates such deficiency, allowing higher levels

of vitamin E to be absorbed (Finkel and Holbrook, 2000). However, there is not much available information on the possible effects of the Se source on muscle vitamin E accumulation. Calvo et al. (2016a) described higher vitamin E deposition in LT muscle of pigs fed with a 0.2 ppm inorganic Se

supplemented diet. Besides, the results of the present study agree with those found by Calvo et al. (2016b) who also found a trend towards a higher vitamin E muscle concentration in groups supplemented with the Se organic form ( $P = 0.08$ ), similarly as observed in the present study (Table 2).

Higher Se accumulation in muscle was observed in pigs fed SeY and SeY-E when compared to SeS (Table 2). Some studies using a Se supplementation of 0.3 ppm in the diet showed higher effectiveness in the accumulation of organic than inorganic Se in pig muscle (Jang et al., 2010; Mahan et al., 2014). Organic Se (in the form of Se-enriched yeast) is taken up via methionine transporter mechanisms and can be incorporated into selenoenzymes or in place of methionine in general body proteins (Suzuki and Ogra, 2002).

Attending to other mineral concentrations in the present study, Ca, Zn and P concentrations were higher in pigs fed with SeY and SeY-E ( $P < 0.01$ ) when compared to those fed SeS. Krajewska et al. (2012) found higher Ca in pancreas and higher Zn concentration in spleen of lambs fed with selenate (Se VI) when compared to a control group.

The evaluation of the oxidative status of the pig meat according to the sources of selenium supplementation (TBARS) is also shown in Table 2. The group supplemented with SeS showed higher malondialdehyde (MDA) concentration in muscle samples than the SeY group ( $P = 0.0713$ ) after day 3

of refrigerated storage. At day 6, MDA concentration was numerically lower in SeY than in SeS; however, differences were only statistically significant when comparing SeS and SeY-E groups. Zhan et al. (2007) and Li et al. (2011) reported higher stability of muscle samples against lipid oxidation by SeY in pork. Similar results were observed in broiler (Chen et al., 2014) and turkey meat (Mikulski et al., 2009). Selenomethionine is the main form of organic Se present in Se enriched yeast. Such compound is an efficient scavenger of peroxynitrite, a product of nitric oxide and superoxide anion and a strong oxidant capable of reacting with a high variety of biomolecules (Padmaja et al., 1996).

These results were also confirmed by the measurement of oxidized to reduced glutathione ratio (GSSH/GSH). Glutathione reductase is an enzyme related to redox homeostasis. Upon absorption of Se compounds, the higher-valence forms (selenite; Se(IV)) are reduced to the selenide state using reducing equivalents from reduced glutathione reductase and NADPH, and the organic forms release Se in the selenide state as a result of catabolism (Finley, 2006). Together, Grant et al. (1996) described that increased glutathione reductase activity under oxidative stress produces higher GSH concentration. In Table 2, it can be observed that the SeY-E group showed the lowest GSSH concentration ( $0.4 \mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and SeS the highest ( $0.9 \mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ ), whereas SeY had intermediate

value which was closer to the SeY-E group ( $0.6 \mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ). Similarly, higher GSSH/GSH ratio for both the SeY and SeY-E groups vs the SeS one was observed. These results would confirm a better antioxidant muscle status in groups supplemented with the organic form of Se.

#### **Drip and water losses of muscle**

Concerning the effects of dietary Se forms on muscle drip loss, there is information in the literature that reports higher WHC value in pigs fed the organic Se (Calvo et al., 2016a; Li et al., 2011; Lisiak et al., 2014; Mahan et al., 1999; Zhan et al., 2007). Whereas, others observed no effect (Castro-Ríos and Narváez-Solarte, 2013). In the present study, only a tendency to higher drip loss values was observed in SeS group when compared to the others. Nevertheless, a significant higher moisture obtained by lyophilization was found in the SeS group ( $P = 0.0001$ , Table 2). Lyophilization is based in the conversion of water from solid to gas state and, it is dependent on the structure through water molecules have to defund. In muscle system, water is linked to several structures. Thus, the differences in water migration by lyophilization process indicate that dietary Se may affect water linkage to biomolecules. The departing hypothesis of this work was the fact that a higher effectiveness of Se-dependent enzymes also increases the cell integrity and/or reduces drip channels. Such assumptions are based on the fact that Huff-Longergan and Lonergan (2005) described

that proteolysis of key cytoskeletal proteins as desmin may be related to drip production. These proteins have been shown to be degraded as early as 45 min to 6 h postmortem in some muscles. Degradation of these proteins at early postmortem time would certainly allow water that is expelled from the intramyofibrillar spaces, to remain in the cell for a longer period, as well as avoid the formation of drip channels as Farouk et al. (2012) explained. The lysis of such proteins is mediated by calpain activity. Hence, if calpain activity and activation is increased, intermediate filament proteins would be more effectively broken, higher protein-fragment concentration will be found in the sarcoplasm and therefore, less drip loss will be expected. This is in agreement with the results reported by Calvo et al. (2016a) who found higher WHC and higher proteolytic activity when organic Se was supplied.

#### **Instrumental color**

Instrumental color parameters are presented in Table 2. No color changes, measured as CIE  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (red color),  $b^*$  (yellow-green color), regarding to storage time were observed. CIE  $L^*$  and  $b^*$  parameters were not affected by dietary treatment in the present study. However, SeS-enriched pigs showed lower  $a^*$  value in muscle than those from SeY group. Bobček et al. (2004) and Zhan et al. (2007) have also described comparable color stabilization. Besides, Mahan et al. (1999) observed paler muscle tissue in pigs fed with inorganic Se diet

Table 2. Effect of selenium source (organic, SeY vs. mineral, SeS) and vitamin E and organic selenium (SeY-E) treatments on  $\alpha$ -tocopherol ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), intramuscular fat (IMF,  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), drip loss ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), water loss by lyophilization ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), moisture ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), minerals (ppm), TBARS ( $\text{mg MDA}\cdot\text{kg}^{-1}$  meat) on days 0, 3 and 6 of refrigerated storage, glutathione ( $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$  meat) and color parameters (CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) on days 0 and 6 of refrigerated storage in muscle samples from pigs fed the experimental diets.

	SeS	SeY	SeY-E	RMSE	P
Drip Loss	30.6 <sup>a</sup>	26.9 <sup>ab</sup>	25.5 <sup>b</sup>	8.4	0.1049
Water loss (72h Liophylization)	746 <sup>a</sup>	739 <sup>b</sup>	740 <sup>b</sup>	4.7	0.0001
Moisture	791	785	788	5.2	0.5884
IMF	48.8	49.1	49.3	1.5	0.708
Vitamin E	1.7 <sup>c</sup>	2.1 <sup>b</sup>	3.1 <sup>a</sup>	0.70	0.0001
Se	0.2 <sup>b</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.07	0.1742
Ca	66 <sup>b</sup>	76 <sup>ab</sup>	80 <sup>a</sup>	13.8	0.0079
P	2074 <sup>b</sup>	2376 <sup>a</sup>	2305 <sup>a</sup>	132	0.0007
Zn	67 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	24.1	0.0178
TBARS					
<i>Day 0</i>	2.0	1.8	1.9	1.02	0.8092
<i>Day 3</i>	2.5 <sup>a</sup>	1.9 <sup>b</sup>	2.0 <sup>b</sup>	1.06	0.0713
<i>Day 6</i>	3.2 <sup>a</sup>	2.7 <sup>ab</sup>	2.3 <sup>b</sup>	1.06	0.0381
Muscle glutathione					
GSSH	0.9 <sup>a</sup>	0.6 <sup>b</sup>	0.4 <sup>c</sup>	0.14	0.0211
GSH free	37.0 <sup>a</sup>	33.3 <sup>b</sup>	32.1 <sup>b</sup>	7.97	0.0337
GSSH/GSH	2.6 <sup>a</sup>	1.5 <sup>b</sup>	1.3 <sup>b</sup>	0.01	0.0209
Colour parameters					
<i>L*</i>					
<i>Day 0</i>	52.1	52.0	52.1	3.28	0.9874
<i>Day 6</i>	51.3	50.9	51.3	3.29	0.9063
<i>a*</i>					
<i>Day 0</i>	2.1 <sup>b</sup>	2.6 <sup>a</sup>	2.3 <sup>ab</sup>	0.79	0.1082
<i>Day 6</i>	1.7	2.0	1.7	0.83	0.2786
<i>b*</i>					
<i>Day 0</i>	11.9	12.4	12.2	1.14	0.2822
<i>Day 6</i>	11.9	12.1	12.0	0.96	0.7405

RMSE: root of the mean squares error from the main effect; IMF: intramuscular fat; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; GSH: glutathione; GSSH: Oxidized glutathione. Different letter indicates statistical difference ( $P < 0.05$ ) between dietary treatments.

when compared to those fed organic Se. Accordingly, Calvo et al. (2016b) found similar differences in color parameters attending to Se source.

### **Fatty acid profile**

The concentration of FFA, NL and PL depending on the treatment are shown in Figure 1. As it can be observed, the highest concentration of FFA was found in samples from SeY-E diet and the lowest in the SeS one, whereas SeY showed intermediate concentration. Such increase of FFA seems to be partially associated with a depletion of NL concentration while PL remained constant. These results suggest that dietary antioxidants administration produces higher post-mortem lipolysis in pork, thus leading to a higher FFA concentration. This is in agreement with previous finding in which antioxidants administration protected proteolytic enzyme integrity (Calvo et al., 2016a). It can be speculated that such antioxidant status may also affect post-mortem lipolytic enzyme activity, leading to higher FFA concentration. Nevertheless, in addition to the stabilizing enzymatic effect mainly due to the antioxidant Se properties, another possible explanation may be the insulin mimetic effect of Se (Stapleton, 2000), which can promote glucose uptake by the cell and, subsequently, affecting glycolysis, gluconeogenesis and fatty acid synthesis and degradation processes. In fact, it has been found that Se in its selenite form may alter the expression of

genes involved in different lipid metabolic pathways including lipolysis activity (Hassan et al., 2014). Furthermore, Wang et al. (2016) recently reported that the biological effect of Se on metabolic function of mice high-fat diet-induced insulin resistance was contradictory: post-treatment with Se promoted lipolysis in adipose tissue, whereas pre-treatment with Se increased adipocyte differentiation and fat deposits in adipose tissue. These authors explained that activation of GPx1 was in part responsible for Se-exhibited bi-directional significance. These activation differences may also be responsible of differences in Se form effects of the present study; however, more investigations are needed.

It is also of interest to observe the combined effect of organic Se and vitamin E (SeY-E) on FFA and, indirectly, on lipolysis of muscle. This dietary treatment resulted in the highest concentration of FFA when compared to the other groups. Conversely to the effects described above, Koshkenbaev et al. (1985) reported that protein and vitamin insufficiency led to increase the FFA levels. However, other studies reported that dietary vitamin E enrichment might enhance lipase activity (Kenari and Naderi, 2016). The results of the present study would indicate the possible potential lipolytic effect of dietary vitamin E, which combined with organic Se in diets, might enhance the observed Se effects on muscle post-mortem lipolysis. Differences in lipase activity, and consequently in lipid fractionation, would result in

different concentration of flavor precursors and differences in flavor development (Toldrá and Flores, 1998).

At this point, it is necessary to indicate that the observed increase in FFA concentration could improve the generation of flavor changes and then, the production of meat products with different sensory characteristics. During thermal lipid degradation, not all lipids contribute the same to aroma formation. Unsaturated fatty acids are more reactive during heating, thus producing large quantities of volatiles (Wood et al., 2003). In addition, the contribution of individual fatty acids (C18:3n-3, C18:2n-6 and C18:1n-9) to odor in cooked meat was shown to produce different cooked meat aroma profiles although fishy notes were related to the presence of C18:3n-3 and exacerbated by the presence of ferrous iron used to catalyze the oxidative reactions (Campo et al., 2003).

Tables 3, 4 and 5 show the fatty acid profile of NL, AGL and PL fractions of lipids of LT muscle from pigs fed the experimental diets. Little information and some controversy exist about the effect of Se on fatty acid profile of pork. Nuenberg et al. (2002) established lower C18:3n-3 concentration in muscle microsomes and higher C18:0 and C18:2n-6 concentrations in muscle mitochondria from pigs fed Se-enriched diets than those fed a control diet. Sang-Keun et al. (2009) found lower C18:3n-3, C18:0 and C16:0 and higher C16:1n-7 and C18:1n-9 concentrations in loin from

pigs fed a diet enriched with 0.3% chrysanthemum powder, 0.1% probiotics and 0.1% Se. These results agree with those reported by Korniluk et al. (2008) in lambs who depicted a possible increase of  $\Delta 9$ -desaturase when 0.2 ppm of inorganic Se were added, whereas Czauderna et al. (2010) showed the opposite effect when the dose was increased to 0.5 ppm. In the present study, lower C18:0 concentration was found in the fatty acid profile of the three fatty acid fractions (NL, FFA and PL, Tables 3, 4 and 5) in SeY and SeY-E groups compared to SeS. Moreover, NL and FFA of SeY groups also showed higher  $\Delta 9$ -desaturase index than group SeS ( $P = 0.003$  and  $P = 0.042$ , respectively) that resulted in a higher proportion of C18:1n-9 ( $P = 0.029$ ) and MUFA ( $P = 0.043$ ) in NL fraction in group SeY (Tables 3 and 4). However, in PL, the behavior in  $\Delta 9$ -desaturase index was opposite and the proportion of C18:2n-6 was higher ( $P = 0.029$ ) in groups fed SeY. It is also of interest to observe that elongase index value in FFA increased when the SeY diet was used. However, the combination of dietary high dose-vitamin E supplementation and SeY did not result in different monounsaturated or saturated fatty acid profile, whereas the proportion of PUFA, C18:2n-6 and C20:3n-6 increased when compared to the other groups. Infante (1986) proposed that vitamin E and Se play a role in the desaturation of n-3 and n-6 PUFAs by participating in the microsomal electron transport chain and in a proposed peroxidase moiety

Table 3. Fatty acid profile (g fatty acid per 100 g of quantified fatty acid) of neutral lipids fraction of *Longissimus thoracis* muscle from pigs fed the experimental diets: : 0.4 ppm of inorganic Selenium (Se) and 21.6 ppm of vitamin E (SeS), 0.4 ppm of organic Se and 22.4 ppm of vitamin E (SeY) and 0.4 ppm of organic Se and 121.1 ppm of vitamin E (SeY-E).

	SeS	SeY	SeY-E	RMSE	P
C16:0	25.4	24.7	24.9	1.156	0.3858
C16:1n-7	3.89	4.29	3.88	0.397	0.1656
C18:0	14.8 <sup>a</sup>	13.4 <sup>ab</sup>	12.5 <sup>b</sup>	0.689	0.0012
C18:1n-9	48.1 <sup>b</sup>	50.5 <sup>a</sup>	50.0 <sup>a</sup>	1.315	0.0297
C18:2n-6	5.54 <sup>b</sup>	4.88 <sup>b</sup>	6.27 <sup>a</sup>	0.653	0.0016
C18:3n-3	0.45	0.45	0.51	0.088	0.3156
C20:0	0.24	0.25	0.24	0.029	0.9319
C20:1n-9	0.92	0.92	0.94	0.082	0.8481
C20:3n-6	0.62 <sup>b</sup>	0.59 <sup>b</sup>	0.83 <sup>a</sup>	0.144	0.0072
C20:4n-6	0.06	0.06	0.06	0.013	0.7844
ΣSAFA	40.4 <sup>a</sup>	38.4 <sup>b</sup>	37.6 <sup>b</sup>	1.546	0.0212
ΣMUFA	52.9 <sup>b</sup>	55.7 <sup>a</sup>	54.8 <sup>a</sup>	0.897	0.0439
ΣPUFA	6.66 <sup>b</sup>	5.97 <sup>b</sup>	7.68 <sup>a</sup>	0.738	0.0008
UI	67.4 <sup>b</sup>	68.8 <sup>ab</sup>	71.6 <sup>a</sup>	1.483	0.0031
ACL	17.5	17.5	17.5	0.143	0.1696
Σn-6/Σn-3	14.0	12.2	14.1	3.808	0.1186
Δ <sup>5</sup> -desaturase	0.09	0.09	0.07	0.032	0.3614
Δ <sup>9</sup> -desaturase	0.56 <sup>b</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.021	0.0033
Elongase	0.18	0.16	0.15	0.081	0.6527

RMSE: root of the mean squares error from the main effect; ΣSAFA: total of saturated fatty acids; ΣMUFA: total of monounsaturated fatty acids; ΣPUFA: total of polyunsaturated fatty acids; UI: unsaturation index; ACL: average chain length; Σn-6/Σn-3: (C18:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6) / C18:3n-3; Δ<sup>5</sup>-desaturase: C20:4n-6 / (C20:3n-6 + C20:4n-6); Δ<sup>9</sup>-desaturase: (C16:1n-7 + C18:1n-9) / (C16:0 + C16:1n-7 + C18:0 + C18:1n-9); Elongase: (C18:0 + C20:1n-9) / (C16:0 + C18:0 + C18:1n-9 + C20:1n-9). Different letter indicates statistical difference (P < 0.05) dietary groups.

of the desaturase complex, respectively. On the contrary, other authors explained that these positive effects on desaturase and elongase enzyme activities were due to its antioxidant properties (Rey et al., 2014).

## CONCLUSIONS

The inclusion of 0.4 ppm of organic Se in pig diets enhances the tissue accumulation of Se in muscle and thus, the WHC (measured as drip loss

and lyophilization losses) and lipid stability against oxidation are improved.

Postmortem lipase activity increases when organic Se is included in the diet and most FFA came from the lipolysis of NL. The combination of the natural form of Se with vitamin E in the diet seems to increase this effect. Organic Se also enhances the activity of Δ<sup>9</sup>-desaturase enzymes thus increasing the concentration of C18:1n-9 with a concomitant

decrease of C18:0 concentration. Consequently, Differences in the lipid fraction composition meat from pigs fed organic Se could be considered might also result in products of different sensory of higher quality from the nutritional point of view and characteristics; however, more research is needed. it has more beneficial for the health of consumers.

Table 4. Fatty acid profile (g fatty acid per 100 g of quantified fatty acid) of free fatty acid fraction of *Longissimus thoracis* muscle from pigs fed the experimental diets: : 0.4 ppm of inorganic Selenium and 21.6 ppm of vitamin E (SeS), 0.4 ppm of organic Selenium and 22.4 ppm of vitamin E (SeY) and 0.4 ppm of organic Selenium and 121.1 ppm of vitamin E (SeY-E).

	SeS	SeY	SeY-E	RMSE	P
C16:0	21.4	22.1	21.4	1.865	0.4829
C16:1n-7	2.89	3.12	2.74	0.585	0.2203
C18:0	19.4 <sup>a</sup>	16.6 <sup>b</sup>	16.8 <sup>b</sup>	2.727	0.0143
C18:1n-9	32.0	33.4	34.4	2.988	0.0943
C18:2n-6	15.9	16.8	16.7	1.087	0.1027
C18:3n-3	0.71	0.77	0.74	0.160	0.7622
C20:1n-9	0.81	1.20	0.95	0.611	0.3705
C20:3n-6	0.83	0.86	1.15	0.568	0.2649
C20:4n-6	5.22	5.14	5.33	1.235	0.9158
ΣSAFA	41.4	39.9	39.6	4.435	0.4925
ΣMUFA	37.9	37.3	35.5	3.529	0.1785
ΣPUFA	20.7 <sup>b</sup>	22.9 <sup>ab</sup>	24.9 <sup>a</sup>	3.818	0.0181
UI	92.4	93.9	95.4	10.55	0.7526
ACL	17.6	17.6	17.6	0.084	0.4829
Σn-6/Σn-3	30.9	29.9	30.3	4.631	0.8892
Δ <sup>5</sup> -desaturase	0.87	0.85	0.87	0.043	0.3557
Δ <sup>9</sup> -desaturase	0.46 <sup>b</sup>	0.49 <sup>a</sup>	0.49 <sup>a</sup>	0.022	0.042
Elongase	0.45 <sup>b</sup>	0.49 <sup>a</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.038	0.0113

RMSE: root of the mean squares error from the main effect; ΣSAFA: total of saturated fatty acids; ΣMUFA: total of monounsaturated fatty acids; ΣPUFA: total of polyunsaturated fatty acids; UI: unsaturation index; ACL: average chain length; Σn-6/Σn-3: (C18:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6) / C18:3n-3; Δ<sup>5</sup>-desaturase: C20:4n-6 / (C20:3n-6 + C20:4n-6); Δ<sup>9</sup>-desaturase: (C16:1n-7 + C18:1n-9) / (C16:0 + C16:1n-7 + C18:0 + C18:1n-9); Elongase: (C18:0 + C20:1n-9) / (C16:0 + C18:0 + C18:1n-9 + C20:1n-9). Different letter indicates statistical difference (P < 0.05) between dietary groups.

Table 5. Fatty acid profile (g fatty acid per 100 g of quantified fatty acid) of polar lipid fraction of *Longissimus thoracis* muscle of pigs fed with the experimental diets: : 0.4 ppm of inorganic Selenium and 21.6 ppm of vitamin E (SeS), 0.4 ppm of organic Selenium and 22.4 ppm of vitamin E (SeY) and 0.4 ppm of organic Selenium and 121.1 ppm of vitamin E (SeY-E).

	SeS	SeY	SeY-E	RMSE	P
C16:0	22.5	22.5	22.2	1.118	0.6792
C16:1n-7	1.69 <sup>a</sup>	1.50 <sup>ab</sup>	1.44 <sup>b</sup>	0.121	0.0532
C18:0	8.78 <sup>a</sup>	8.12 <sup>b</sup>	8.05 <sup>b</sup>	0.786	0.0387
C18:1n-9	21.2	20.2	20.7	2.251	0.5947
C18:2n-6	29.8 <sup>b</sup>	31.4 <sup>a</sup>	31.3 <sup>a</sup>	1.928	0.0292
C18:3n-3	0.78 <sup>a</sup>	0.60 <sup>b</sup>	0.60 <sup>b</sup>	0.093	0.0721
C20:3n-6	0.50	0.50	0.58	0.124	0.1001
C20:4n-6	10.3	10.8	10.7	1.359	0.4847
C20:5n-3	0.48	0.49	0.52	0.072	0.2561
C22:4n-6	1.72	1.62	1.56	0.229	0.1889
C22:5n-3	1.60	1.56	1.70	0.202	0.1450
C22:6n-3	0.70	0.64	0.66	0.155	0.6152
ΣSAFA	31.3 <sup>a</sup>	30.7 <sup>b</sup>	30.2 <sup>b</sup>	1.176	0.0370
ΣMUFA	22.9	21.7	22.1	2.419	0.3742
ΣPUFA	45.9	47.6	47.7	2.864	0.1061
UI	159	161	162	5.535	0.2240
ACL	17.9	17.9	17.9	0.052	0.4314
Σn-6/Σn-3	11.9 <sup>b</sup>	13.5 <sup>a</sup>	12.7 <sup>ab</sup>	1.198	0.0077
Δ <sup>4</sup> -desaturase	0.30	0.29	0.28	0.038	0.2406
Δ <sup>5</sup> -desaturase	0.95	0.96	0.95	0.012	0.1758
Δ <sup>9</sup> -desaturase	3.16 <sup>a</sup>	2.82 <sup>b</sup>	2.81 <sup>b</sup>	0.338	0.0088
Elongase	0.31	0.30	0.30	0.020	0.2731

RMSE: root of the mean squares error from the main effect; ΣSAFA: total of saturated fatty acids; ΣMUFA: total of monounsaturated fatty acids; ΣPUFA: total of polyunsaturated fatty acids; UI: unsaturation index; ACL: average chain length; Σn-6/Σn-3: (C18:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6 + C22:4n-6) / (C18:3n-3 + C20:5n-3 + C22:5n-3 + C22:6n-3); Δ<sup>4</sup>-desaturase: C22:6n-3 / (C22:5n-3 + C22:6n-3); Δ<sup>5</sup>-desaturase: C20:4n-6 / (C20:3n-6 + C20:4n-6); Δ<sup>9</sup>-desaturase: (C16:1n-7 + C18:1n-9) / (C16:0 + C16:1n-7 + C18:0 + C18:1n-9); Elongase: (C18:0 + C20:5n-3) / (C16:0 + C18:0 + C20:5n-3 + C22:5n-3). Different letter indicates statistical difference (P < 0.05) between dietary groups

#### Acknowledgements.

This research was supported by projects CDTI  
IDI-20111017 and S2013/ABI-2913-MEDGAN-CAM.

We hereby acknowledge the cooperation Incarlopsa  
and COPISO staff for the aid throughout the project

and Isabel Martín for the technical assistance in  
laboratory analysis.

## REFERENCES

- Apple JK. (2007). Effects of nutritional modifications on the water-holding capacity of fresh pork: A review. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 124 (suppl.1): 43–58.
- Ashgar A, Gray JI, Miller ER, Ku PK, Booren AM and Buckley DJ. (1991). Influence of supranutritional vitamin E supplementation in the feed on swine growth, performance and deposition in different tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 57: 31-41.
- Bobček B, Lahučky R, Mrázová J, Bobček R, Novotná K and Vašíček D. (2004). Effects of dietary organic selenium supplementation on selenium content, antioxidative status of muscles and meat quality of pigs. *Czech Journal of Animal Science* 49: 9, 411–417.
- BOE (2013). RD 53/2013, de 21 de octubre por la que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Spain. *Boletín Oficial del Estado* 252: 34367-34391.
- Calvo L, Toldrá F, Aristoy MC, López-Bote CJ and Rey AI. (2016a). Effect of dietary organic selenium on muscle proteolytic activity and water-holding capacity in pork, *Meat Science* 121: 1-11.
- Calvo L, Toldrá F, Rodríguez AI, López-Bote CJ and Rey AI. (2016b). Effect of dietary selenium source (organic vs. Mineral) and muscle pH on meat quality characteristics of pigs. *Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1002/fsn3.368.
- Campo MM, Nute GR, Wood JD, Elmore SJ, Mottram DS and Enser M. (2003). Modelling the effect of fatty acids in odour development of cooked meat in vitro: Part I - Sensory perception. *Meat Science* 63: 367-375.
- Castro-Ríos K and Narváez-Solarte W. (2013). Sensory quality and cooking loss in pork meat: Effect of sex and source of selenium. *Biotechnología en el sector agropecuario y agroindustrial* 11(1): 130–135.
- Chen G, Wu J and Li C. (2014). Effect of different selenium sources on production performance and biochemical parameters of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98: 747-754.
- CIE. (1976). Recommendations on uniform colour spaces-color difference equations psychometric colour terms. Commission Internationale de l'Eclairage, Suppl. 2 to CIE. Publication n° 15 (E-1.31) 197/ (TC-1.3). Bureau de la CIE, Paris.
- Czauderna M, Kowalczyk J, Krajewska K.A and Michalski JP. (2010). The dietary level of selenite and selenized yeast influences the concentrations of selected fatty acids in the abdominal fat and brain of rats. *Journal of Animal and Feed Sciences* 19: 113-129.

Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE and Hurst R. (2011). Selenium in human health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling* 14(7): 1337–1383.

Farouk MM, Mustafa NM, Wu G and Krsinic G. (2012). The “sponge effect” hypothesis: An alternative explanation of the improvement in the waterholding capacity of meat with ageing. *Meat Science* 90: 670-677.

Faustman C and Wang F. (2000). Potential mechanisms by which vitamin E improves oxidative stability of myoglobin. In: Decker EA, Faustman C and López-Bote CJ (Eds.) *Antioxidants in muscle foods-nutritional strategies to improve quality*. Toronto: John Wiley and Sons Inc, pp. 135-152.

Finkel T and Holbrook NJ. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.

Finley JW. (2006). Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition Reviews* 64: 146-151.

Garcés R and Mancha M. (1993). One-step lipid extraction and fatty acid methyl-esters preparation from fresh plant-tissues. *Analytical Biochemistry* 211: 139–143.

Grant CM, Collinson LP, Roe JH and Dawes IW. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress

and is a target gene for yap-1 transcriptional regulation. *Molecular Microbiology* 21: 171–179.

Hassan A, Ahn J, Suh Y, Choi YM, Chen P and Lee K. (2014). Selenium promotes adipogenic determination and differentiation of chicken embryonic fibroblasts with regulation of genes involved in fatty acid uptake, triacylglycerol synthesis and lipolysis. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25: 858-867.

Honikel KO. (1997). Reference methods supported by the OECD and their use in Mediterranean meat products. *Food Chemistry* 59: 573-582.

Huff-Lonergan E and Lonergan SM. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science* 71: 194-204.

Infante JP. (1986). Vitamin E and selenium participation in fatty acid desaturation. A proposal for an enzymatic function of these nutrients. *Molecular Cell Biochemistry* 69(2): 93-108.

Jang YD, Choi HB, Durosoy S, Schlegel P, Choie BR and Kim YY. (2010). Comparison of bioavailability of organic selenium sources in finishing pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 23: 931-936.

Kenari AA and Naderi M. (2016). Effects of enriched *Artemia* by fish and soybean oils supplemented with vitamin E on growth performance, lipid peroxidation, lipase activity

and fatty acid composition of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. *Aquaculture nutrition* 22: 382-391.

Kim YY and Mahan DC. (2001). Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science* 79: 942-948.

Korniluk K, Gabryszuk M, Kowalczyk J and Czauderna M. (2008). Effect of diet supplementation with selenium, zinc and  $\alpha$ -tocopherol on fatty acid composition in the liver and loin muscle of lambs. *Animal Science Papers and Reports* 26(1): 59-70.

Koshkenbaev BKh, Tazhibaev ShS, Maksimenko VB and Sisemaliev ZhS. 1985. Effect of protein-vitamin deficiency on the enzyme activity of lipolysis and the synthesis of cholesterol esters during hypokinesia. *Voprosy pitaniia* 6: 53-57.

Krajewska KA, Rozbicka-Wieczorek AJ, Kowalezyk J and Czauderna M. (2012). Dietary linseed oil and selenite affect the concentration of fatty acids and selenium in the spleen, pancreas, and kidneys of lambs. *Journal of Animal and Feed Sciences* 21: 285-301.

Lener M, Jaworska K, Muszyńska M, Sukiennicki G, Durda K, Gupta S, Złowocka-Perłowska E, Kładny J, Wiechowska-Kozłowska A, Grodzki T, Jaworowska E, Lubiński J,

Górecka-Szyld B, Wilk G, Sulikowski M, Huzarski T, Byrski T, Cybulski C, Gronwald J, Dębniak T, Ashuryk O, Tołoczko-Grabarek A, Jakubowska A, Morawski A and Lubiński J. (2012). Selenium as marker for cancer risk and prevention. *Polish Journal of Surgery* 84(9): 470-475.

Li J, Zhou J, Zhao H, Lei X, Xia Z, Gao G and Wang K. (2011). Enhanced water holding capacity of meat was associated with increased *Sepw1* gene expression in pigs fed selenium-enriched yeast. *Meat Science* 87: 95-100.

Lisiak D, Janiszewski P, Blicharski T, Borzuta K, Grzesłowiak E, Lisiak B, Powalowsky K, Samardakiewicz L, Batorska M, Skrzymowska K and Hammermeister A. (2014). Effect of selenium supplementation in pig feed on slaughter value and physicochemical and sensory characteristics of meat. *Annals of Animal Science* 14: 213-222.

Mahan DC, Azain M, Crenshaw TD, Cromwell GL, Dove CR, Kim SW, Lindemann MD, Miller PS, Petigrew JE, Stein HH and Wan Heugten E. (2014). Supplementation of organic and inorganic selenium to diets using grains grown in various regions of the United States with differing natural Se concentrations and fed to grower-finisher swine. *Journal of Animal Science* 92: 4991-4997.

Mahan DC, Cline TR and Richert B. (1999). Effects of dietary levels of selenium-enriched

yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing- finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality. *Journal of Animal Science* 77: 2172–2179.

Mateo RD, Spallholz JE, Elder R, Yoon I and Kim SW. (2007). Efficacy of dietary selenium sources on growth and carcass characteristics of growing-finishing pigs fed diets containing high endogenous. *Journal of Animal Science* 85(1): 1177–1183.

Mikulski D, Jankowski J, Zdunczyk Z, Wroblewska M, Sartowska K and Majewska T. (2009). The effect of selenium source on performance, carcass traits, oxidative status of the organism and meat quality of turkeys. *Journal of Animal and Feed Sciences* 18: 518-530.

Monahan FJ, Buckley DJ, Morrissey PA, Lynch PB and Gray JI. (1992). Influence of dietary fat and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. *Meat Science* 31: 229-241.

National Research Council, NRC. (2012). *Nutrient Requirement of Swine*, eleventh ed. NRC, National Academy Press, Washington DC, USA.

Nuernberg K, Kuechenmeister U, Kuhn G, Muernberg G, Winnefeld K, Ender K, Cogan U and Mokady S. (2002). Influence of dietary vitamin E and selenium on muscle fatty acid

composition in pigs. *Food Research International* 35: 505-510.

Padmaja S, Squadrito GL, Lemercier JN, Cueto R and Pryor WA. (1996). Rapid oxidation of DL-selenomethionine by peroxynitrite. *Free radical Biology and Medicine* 21: 317-322.

Rey AI, Amazan D, Cordero G, Olivares A and López-Bote CJ. (2014). Lower oral doses of micellized  $\alpha$ -tocopherol compared to  $\alpha$ -tocopheryl acetate in feed modify fatty acid profiles and improve oxidative status in pigs. *International Journal for vitamin and nutrition research* 84(5-6): 229-243.

Rey AI, Daza A, López-Carrasco C and López-Bote CJ. (2006). Quantitative study of the alpha- and gamma-tocopherols accumulation in muscle and backfat from Iberian pigs kept free-range as affected by time of free-range feeding or weight gain. *Animal Science* 82: 901-908.

Rey AI and López-Bote CJ. (2014). Alpha-tocopherol stereoisomer analysis as discriminant method for distinguishing Iberian pig feed intake during the fattening phase. *Food Chemistry* 142: 342-348.

Rey AI, López-Bote CJ, Kerry JP, Lynch PB, Buckley DJ and Morrissey, PA. (2004). Modification of lipid composition and oxidation in porcine muscle and muscle microsomes as affected by dietary supplementation of n-3 with either n-9 or n-6 fatty acids and alpha-tocopheryl

acetate. *Animal Feed Science and Technology* 113(1-4): 223-238.

Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM and Huff-Lonergan E. (2004). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of calpain. *Journal of Animal Science* 82: 3254-3266.

Ruiz J, Antequera T Andrés AI, Petró MJ and Muriel E. (2004). Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta* 520: 201-205.

Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K and Niki E. (2003). Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *Journal of Biological Chemistry* 278: 39428 - 39434.

Salih M, Smith DM, Price JF and Dawson LE. (1987). Modified extraction 2- thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry Science* 66: 1483-1488.

Sang-Keun J, Il-Suk K, In-Chul H, Seung-Youn Ch, Ki-Ok Y, Jin-Gun K and Suk-Nam K. (2009). Effect of feeding complex of wild chrysanthemum powder, probiotics and selenium on meat quality in finishing porks. *Korean Journal of Food Science and Animal Resources* 29(1): 114-120.

SAS. (2009). SAS user's guide statistics. Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC, USA.

Schrauzer GN. (2000). Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *The Journal of Nutrition*, 130, 1653-1656.

Segura J and López-Bote CJ. (2014). A laboratory efficient method for intramuscular fat analysis, *Food Chemistry* 145: 821-825.

Seko Y, Saito Y, Kitahara J and Imura N. (1989). Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: Wendel A (ed) *Selenium in Biology and Medicine*. Berlin: Springer-Verlag, pp 33-70.

Spallholz JE. (1994). On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine* 17: 45-64.

Stapleton SR. (2000). Selenium: an insulin-mimetic. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 1874-1879.

Surai PF. (2002). Selenium in poultry nutrition 2. Reproduction, egg and meat quality and practical applications. *World's Poultry Science Journal* 58: 431-450.

Suzuki KT and Ogra Y. (2002). Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC708 ICP MS with enriched Se. *Food Additives and Contaminants* 19(10): 974-983.

Toldrá F and Flores M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38: 331-352.

Zhan X, Wang M, Zhao R, Li W and Zu Z. (2007). Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 132: 202-211.

Wang X, Wu H, Long Z, Sun QG, Liu JZ, Liu Y and Hai CX. (2016). Differential effect of Se on insulin resistance, regulation of adipogenesis and lipolysis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 415: 89-102.

Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, Sheard PR and Enser M. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Science* 66: 21-32.

### 5.3. Trabajo Experimental 3

Effect of dietary organic selenium on muscle proteolytic activity and waterholding capacity in pork.

Los resultados del presente ensayo se recogen en el siguiente artículo ya publicado:

Effect of dietary organic selenium on muscle proteolytic activity and water-holding capacity in pork

L. Calvo, F. Toldrá, M.C. Aristoy, C.J. López-Bote, A.I. Rey

Meat Science, 121, 2016, 1-11.





## Effect of dietary organic selenium on muscle proteolytic activity and water-holding capacity in pork



L. Calvo<sup>b</sup>, F. Toldrá<sup>c</sup>, M.C. Aristoy<sup>c</sup>, C.J. López-Bote<sup>a</sup>, A.I. Rey<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n., 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Incarlopsa, Ctra. N-400 km. 95400, 16400 Tarancón, Cuenca, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Av Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 November 2015

Received in revised form 2 May 2016

Accepted 3 May 2016

Available online 7 May 2016

#### Keywords:

Organic selenium

Vitamin E

Drip loss

TBARS

Myofibrillar proteins

Free-amino acids

### ABSTRACT

This study evaluates the effect of dietary selenium (Se) supplementation source (organic, Se-enriched yeast; SY vs. inorganic, sodium selenite; SS), dose (0.2: L vs. 0.4: H mg/kg) and the combination of Se and vitamin E (VITE + SS) for 26 days on drip loss, TBARS, colour changes, myofibrillar protein pattern and proteolysis in pork. The lowest water losses were observed in the SY-H group when compared to the others. SY-H and VITE + SS groups presented lower myofibrillar protein hydrolysis/oxidation. VITE + SS supplementation also resulted in higher PRO, TRP and PHE content at days 2 and 7, whereas the SY group showed increased GLY and CAR and tended to have higher TAU and ANS at day 2. The myofibrillar fragmentation index was not modified by the dietary treatment; however, at day 8, it tended to be higher in groups supplemented with SeY and VITE + SS. The results of the present study might indicate a possible relation between muscle proteolysis and water loss.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pork quality depends on important attributes such as water-holding capacity, colour and oxidative stability, which are decisive in terms of suitability for processing and storage. Unacceptable colour, water retention or stability of the fresh product are mainly important for their influence on consumer behaviour, but can also cause high economic losses in the processing industry.

Feeding strategies are widely used in animals to improve meat quality (Andersen, Oksbjerg, Young & Therkildsen, 2005). Many interventions have focused on dietary supplementation with antioxidants such as selenium (Se) and/or vitamin E. Hence, vitamin E fed above dietary requirements has been reported to protect against lipid oxidation (Buckley, Morrissey & Gray, 1995) and to successfully improve the colour stability of fresh meat (Faustman & Wang, 2000) and other meat quality characteristics such as water-holding capacity (Ashgar et al., 1991). This reduction in meat drip losses has been attributed to the antioxidant activity of vitamin E, which may stabilise membrane integrity post-mortem, thus retaining sarcoplasmic protein in cells (Ashgar et al., 1991).

Dietary Se supplementation has also been reported to have antioxidant activities and to be effective in delaying post-mortem oxidation reactions, especially the organic form (Mahan et al., 2014). It has been

suggested that organic selenium is more effective because it reaches tissues more efficiently (Mahan, Cline & Richert, 1999; Jang et al., 2010; Mahan et al., 2014) and consequently pork shows improved water-holding capacity and colour (Mahan et al., 1999; Zhan, Wang, Zhao, Li & Zu, 2007). However, there are no evident effects of selenium on membrane stability, and the mechanism by which Se acts, especially the organic form, remains unclear. Furthermore, selenite at high doses has been reported to act as a pro-oxidant (Shen, Yang, Liu & Ong, 2000). Organic Se (in the form of Se-enriched yeast) is taken up via methionine transporter mechanisms and can be incorporated into selenoenzymes or in place of methionine in general body proteins (Suzuki & Ogra, 2002). The incorporation of selenomethionine (Se-Met) into proteins is non-specific and directly related to the dietary intake of selenium/Se-Met, whereas the incorporation of selenium into selenocysteine is specific and mediated at the ribosomal level (Schrauzer, 2000). As a rule, the replacement of Met by Se-Met does not significantly alter protein structure but may influence the activity of enzymes if Se-Met replaces Met in the vicinity of the active site (Schrauzer, 2000). Hence, it has been described that the Se-Met-substituted thymidylate synthase of *Escherichia coli* exhibited a 40% higher specific activity than the normal enzyme (Boles et al., 1991).

In contrast to the general belief that drip loss is reduced by the protective effect of some antioxidants on the muscle membrane, Lonergan and Lonergan (2005) have proposed that proteolysis and even protein oxidation are keys in influencing the moisture retention capacity of meat. Differences between animals and/or muscles in the oxidation of

\* Corresponding author.

E-mail address: [anarey@vet.ucm.es](mailto:anarey@vet.ucm.es) (A.I. Rey).

myofibrillar proteins and hence in the antioxidant defence system would influence calpain activity post-mortem (Lonergan & Lonergan, 2005; Rowe, Maddock, Lonergan & Huff-Lonergan, 2004). Since calpain enzymes contain histidine and SH-containing cysteine residues at their active sites, they are particularly susceptible to inactivation by oxidation (Lonergan & Lonergan, 2005). Calpain activation produces a rapid fragmentation of intermediate protein filaments in meat (such as desmin, which links myofibrils to the cell membrane), preventing shrinking of the overall muscle cell membrane (Lonergan & Lonergan, 2005), and consequently reducing drip loss (Melody et al., 2004). Moreover, desmin not only links myofibrils to cell membrane but it also connects the adjacent myofibrils which are keys to transfer the shrinkage of myofibrils and maintain the integral structure of muscles (Lonergan & Lonergan, 2005). However, protein degradation not always increases water holding capacity of pork (Lawson, 2004; Zhang et al., 2006).

Some previous studies have shown that dietary supplementation with antioxidants such as vitamin E influences proteolysis in meat (Rowe et al., 2004); however, to the best of our knowledge no information exists on the possible effects of dietary Se on post-mortem protein degradation.

We hypothesise that in pigs, dietary organic Se may exert a different effect on myofibrillar protein hydrolysis/oxidation and proteolysis than the inorganic form or vitamin E dietary enrichment. The objectives of the present research were to study the effect of the selenium source (organic as Se-enriched yeast vs. mineral as sodium selenite in feed) and dose (0.2 vs. 0.4 mg/kg) on muscle proteolysis, myofibrillar proteins and other meat quality characteristics such as drip loss, TBARS, colour changes and pigment oxidation.

## 2. Material and methods

All experimental procedures performed in this study complied with Spanish guidelines for the care and use of animals in research (BOE, 2013) and were in accordance with the protocols approved by the Complutense University of Madrid.

### 2.1. Animals, experimental diets and sample collection

One hundred and eighty halothane-negative Large white × Landrace female pigs (Topigs 20 × L337) were randomly selected at an average live weight of  $61.3 \pm 0.5$  kg, distributed into six groups and housed in an environmentally controlled, slatted-floor facility (Centenera del Campo, Soria, Spain). Pigs ( $n = 10$ ) were housed in an individual box during the experimental period; hence, each treatment was replicated three times. Diets were formulated to provide a nutrient composition above NRC (2012) recommendations (Table 1) and were identical in composition except for the selenium source: sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (SS) or selenomethionine from a Se-enriched yeast diet (*Saccharomyces cerevisiae*, Sel-Plex; Alltech, Spain; Commission Regulation (EC) No 1750/2006) (SY). In all cases, Se was added to the vitamin mineral mix to achieve a final concentration of either 0.2 mg/kg (SY-L or SS-L) or 0.4 mg/kg (SY-H or SS-H) (Table 1). In addition, a positive control group was supplemented with vitamin E in the diet (100 mg dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate/kg) (VITE-SS) and a negative control group received a basal level of vitamin E (15 mg/kg) but no selenium supplementation (CONTROL). Pigs were fed the experimental diets until the end of the experiment (26 days in total), with  $120.4 \pm 2.5$  kg. Food and water were provided ad libitum for the duration of the study.

At the end of the experimental period, pigs were sent to a commercial slaughterhouse (Incarlopsa, Tarancón, Cuenca, Spain) stunned with  $\text{CO}_2$  and slaughtered after a fasting period of 24 h. Then, carcasses were eviscerated and split down the centre of the vertebral column before being suspended in the air and chilled at  $4^\circ\text{C}$  (1 m/s; 90% relative humidity) for 2 h. Next, 24 h after slaughter, electrical conductivity and pH were measured by means of a LFStar conductivity meter (Mattahäus Ingenieurbüro, Klaus, DE) and a portable pH meter pH\*K21 (NWK

**Table 1**  
Ingredients, major nutrients and analysed composition of the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE
<i>Ingredients<sup>a</sup></i>						
$\alpha$ -Tocopherol, mg/kg	15	15	15	15	15	100
Selenium (sodium selenite), mg/kg	0	0.2	0.4	0	0	0.2
Selenium (Sel-Plex), mg/kg	0	0	0	0.2	0.4	0
<i>Major nutrients</i>						
Dry matter, %	89.8	89.8	89.8	89.8	89.8	89.8
Crude protein, %	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2
Fat, %	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
Crude fiber, %	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
Ash, %	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
Starch, %	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3
Lysine dig, %	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Met dig, %	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Met + Cis dig, %	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Thr dig, %	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
EN, kcal/kg	2449	2449	2449	2449	2449	2449
<i>Analysed composition</i>						
$\alpha$ -Tocopherol, $\mu\text{g/g}$	47.62	41.53	51.74	40.95	42.81	175.09
Selenium, mg/kg	0.0004	0.19	0.42	0.22	0.39	0.21

<sup>a</sup> Ingredients (g/kg): barley, 484.4; wheat, 25.0; corn, 8.00; soya cake 47, 6.00; sunflower oil, 5.00; mixed fats, 4.50; calcium carbonate, 1.03; L-lysine, 0.54; sodium bicarbonate, 0.50; bicalcium phosphate, 0.37; salt, 0.26; premix\*, 0.20; L-threonine, 0.08; bactericide, 0.05; fungicide, 0.03. \*Premix (per Tn of finished diet): vitamin A: 8,000,000 IU; vitamin D<sub>3</sub>: 1,800,000 IU; vitamin E (all rac  $\alpha$ -tocopheryl-acetate)\*\*: 15,000 mg; vitamin B<sub>1</sub>: 0.5 g; vitamin B<sub>2</sub>: 1.5 g; vitamin B<sub>12</sub>: 12 mg; vitamin B<sub>6</sub>: 1 g; nicotinic acid: 15 g; calcium pantothenate: 10 g; vitamin K<sub>3</sub>: 0.5 g; choline chloride: 100 g; Fe (ferrous carbonate): 70 g; Cu (pentahydrated sulphate): 15 g; Co (hydrate carbonate): 0.05 g; Zn (oxide): 100 g; Mn (oxide): 40 g; I (potassium iodure): 0.5 g; Se (sodium selenite)\*\*\*: 0.2 g (SS-L) or 0.4 g (SS-H); 6-fitase EC 4–12: 500,000 FTU; xylanase 4–8: 24,000,000 BXU; BHT E321: 2 g; citric acid E330: 6.9 g; sodium citrate E331: 0.2 g; sepiolite: 150 g.

Binar, Puergen, DE), respectively. Before pH measurement, the instrument was calibrated with pH  $7.0 \pm 0.02$  and  $4.0 \pm 0.02$  buffers. Once carcasses had been jointed, the untrimmed hams, shoulders and loins were kept in a chilled room at  $4^\circ\text{C}$  for 24 h and then weighed. Samples of approximately 15 cm in size were taken from the *longissimus lumborum* muscle at the level of the last rib and were stored in individual, vacuum-packed plastic bags at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis.

### 2.2. Laboratory analysis

#### 2.2.1. Moisture determination in muscle samples (standard ISO-1442)

Muscle samples (5 g) were maintained in a dry heater at  $100$ – $105^\circ\text{C}$  until constant weight. Humidity was determined gravimetrically at day 0 and after 8 days of refrigerated storage.

#### 2.2.2. Drip loss in muscle samples

To determine weight loss during storage, approximately  $1\text{ cm}^3$  of sample (weighing approximately 10 g) was taken from the *longissimus lumborum* muscle. After cutting, samples were weighed, and put inside of a mesh and a plastic bag that was closed and placed under refrigerated conditions at  $4^\circ\text{C}$  in a saturated atmosphere. Samples were weighed again after 72 h of storage. The difference between initial and final weights was used to calculate drip loss, which was expressed as a percentage of the initial weight (Honikel, 1997). Frozen samples were previously thawed before following the same procedure as described above.

Weight loss was also gravimetrically quantified by sequenced weights of  $2\text{ cm}^3$  samples at 20, 40 and 60 h during the lyophilisation process.

### 2.2.3. Tocopherol quantification in muscle samples

The  $\alpha$ -tocopherol concentration in muscle samples was quantified by direct extraction as described by Rey, Daza, López-Carrasco and López-Bote (2006). Briefly, muscle samples were mixed with 0.054 M dibasic sodium phosphate buffer adjusted to pH 7.0 with HCl and absolute ethanol. After mixing, the tocopherol was extracted with hexane by centrifugation. The upper layer was evaporated to dryness and dissolved in ethanol prior to analysis. Tocopherols were analysed by reverse phase HPLC (HP 1100, equipped with a diode array detector; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) as described elsewhere (Rey & López-Bote, 2014). Identification and quantification were carried out using a standard curve ( $R^2 = 0.999$ ) of the pure compound (Sigma, Alcobendas, Madrid). All samples were analysed in duplicate. The  $\alpha$ -tocopherol concentration in muscle was assessed on days 0 and 8 of refrigerated storage at 4 °C.

### 2.2.4. TBARS analysis of muscle samples

The susceptibility of muscle homogenates to lipid oxidation induced by iron-ascorbate was determined by a modification of the method described by Kronburst and Mavis (1980). Muscle homogenates in 1.15% KCl (0.1 g/ml) were incubated at 37 °C in 40 nM Tris-maleate buffer (pH 7.4) with 1 mM FeSO<sub>4</sub> and 2 mM ascorbic acid in a total volume of 10 ml. At fixed time intervals (0, 30, 60, 90 and 120 min), aliquots were removed for measurement of TBARS. Absorbance was measured at 532 nm. TBARS were expressed as mM malondialdehyde (MDA)/g sample.

### 2.2.5. Glutathione quantification

Reduced glutathione (GSH) and oxidised glutathione (GSSH) were quantified spectrophotometrically at 405 nm in deproteinised muscle using the corresponding diagnostic colourimetric kit (Arbor assays, USA). The concentration of oxidised glutathione was determined from the 2-vinylpyridine-treated samples read off 2-vinylpyridine-treated standard curve. Free glutathione (GSH) concentrations were obtained by subtracting the oxidised glutathione (GSSH) levels obtained from the 2-vinylpyridine-treated standard from non-treated standards and samples (total GSH). The concentrations obtained were expressed as  $\mu$ M of glutathione.

### 2.2.6. Instrumental colour analysis

Two-cm-thick samples were placed on trays and kept at 4 °C for colour measurement. Muscle colour was evaluated on days 1 and 7 after slaughter by means of a Chroma Meter (CM 2002, Minolta, Camera, Osaka, Japan) previously calibrated against a white tile in accordance with the manufacturer's recommendations (CIE, 1976). The average of five random readings was used to measure lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ) and yellowness ( $b^*$ ). Meat pigments (oxymyoglobin, deoxymyoglobin and metmyoglobin) were calculated by the isobestic wavelengths measured by means of the Chroma Meter. Hence, oxymyoglobin was calculated by the isobestic wavelengths of deoxymyoglobin and metmyoglobin (610 nm/525 nm); deoxymyoglobin by the isobestic wavelengths of oxymyoglobin and metmyoglobin (as the ratio of measurement at 474 nm/525 nm) and metmyoglobin by the isobestic wavelengths of deoxymyoglobin and oxymyoglobin (572 nm/52 nm) (Tang, Faustman, & Hoagland, 2004). Colour measurement and pigment concentrations in muscle were assessed on days 0, 4 and 8 of refrigerated storage at 4 °C.

### 2.2.7. Separation of myofibrillar proteins by SDS-PAGE

Extraction of sarcoplasmic and myofibrillar proteins was performed as described by Molina and Toldrá (1992). Meat samples were homogenised with 30 mM phosphate buffer, pH 7.4 (dilution 1:10, w/v), using a masticator (IUL Instruments, Barcelona, Spain) for 4 min. After centrifugation at 10,000 g for 20 min at 4 °C, the supernatant containing the sarcoplasmic proteins was passed through glass wool and collected. The procedure was repeated twice in order to wash the pellet

that was then resuspended in 9 volumes of 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.7 M potassium iodide. The mixture was homogenised in the masticator for 8 min and then centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected for analysis of myofibrillar proteins. The protein concentration of both supernatants containing sarcoplasmic and myofibrillar proteins was calculated by using bicinchoninic acid (Sigma-Aldrich) as reagent and bovine serum albumin as standard.

Proteins were separated by 10% SDS-PAGE as described by Toldrá, Miralles and Flores (1992). The sarcoplasmic and myofibrillar extracts were mixed in a ratio of 1:1 with 50 mM Tris buffer, pH 6.8, containing 8 M urea, 2 M thiourea, 75 mM dithiothreitol, 3% (w/v) SDS and 0.05% bromophenol blue, heated at 100 °C for 4 min and immediately chilled in ice and used for electrophoresis. The amount of protein injected into the gels was 12  $\mu$ g per lane. Once proteins had been separated, gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Laemmly, 1970). Standard proteins (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) were run simultaneously for molecular mass identification. Stained bands in each gel were relatively quantified by densitometry, using the ImageJ Program (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 2.2.8. Determination of free amino acids

Free amino acids were determined following the procedure described by Aristoy and Toldrá (1991). Meat samples (*longissimus lumborum* muscle) were cut and minced, and 5 g were homogenised with 0.01 M HCl 1:5 (w/v) in a masticator (IUL Instruments) for 8 min at 4 °C. After centrifugation at 10,000  $\times$ g for 20 min at 4 °C, the supernatant was filtered through glass wool and stored at -20 °C until required. Once samples had thawed, 250  $\mu$ l plus 50  $\mu$ l of an internal standard solution (1 mM norleucine in 0.01 M HCl) was deproteinised using 2.5 volumes of acetonitrile and then centrifuged at 10,000  $\times$ g for 5 min. Amino acid derivatisation was carried out with phenyl isothiocyanate (PITC) according to Bidlingmeyer, Cohen, Tarvin and Frost (1987). Supernatant (500  $\mu$ l) was vacuum dried, mixed with 15  $\mu$ l of methanol: 1 M sodium acetate: triethylamine (2:2:1) (v:v:v) and dried again. Then, 15  $\mu$ l of methanol:water:triethylamine:PITC (7:1:1:1, v:v:v:v) was added, held for 20 min and then dried. Derivatised amino acids were dissolved in 300  $\mu$ l of 0.005 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 5% acetonitrile, and analysed by reversed-phase HPLC in a 1200 Series Agilent chromatograph (Agilent, Palo Alto, CA, USA) using a Pico Tag® column (3.9  $\times$  300 mm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Separation was achieved in 55 min at 52 °C using a gradient between two solvents: 70 mM sodium acetate at pH 6.55 containing 2.5% of acetonitrile (solvent A) and water:acetonitrile:methanol (40:45:15) (solvent B), as described by Armenteros, Aristoy, Barat and Toldrá (2012). Separated amino acids were detected at 254 nm.

### 2.2.9. Myofibrillar fragmentation index (MFI)

The myofibrillar fragmentation index was performed in duplicate as described by Culler et al. (1978). 40 ml cold MFI buffer (100 mM KCl, 20 mM potassium phosphate at pH 7, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM NaN<sub>3</sub> in distilled deionised water) was added to a blender containing the sample (4 g) and homogenised for 30 s. The homogenate was then centrifuged at 1000  $\times$ g for 15 min at 2 °C and afterwards the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 40 ml cold MFI buffer and centrifuged at 1000  $\times$ g for 15 min. The pellet was again resuspended in 10 ml cold MFI buffer and vortexed until well mixed. Finally, the sample was poured through a polyethylene strainer to remove the connective tissue and the centrifuge tube was rinsed with an additional 10 ml cold MFI buffer. The protein content in each suspension was also measured by Biuret reaction. The extract (0.25 ml) was mixed with 0.75 ml of MFI buffer and 4 ml of Biuret reagent (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid). The mixture was vortexed and placed in the dark for 30 min. Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) was used as standard at concentrations of 0, 2.5, 5, 7.5 and 10 mg/ml. Once that the sample protein was determined, the amount of solution taken for MFI measurement contained approximately 0.5 mg protein/ml

solution. MFI was measured spectrophotometrically using a Thermo Scientific Multiskan GO (Thermo Fisher, Alcobendas, Madrid) UV–Vis spectrophotometer at 540 nm, and it was expressed as absorbance of a myofibrillar protein solution (concentration 0.5 mg/ml) multiplied by 200.

### 2.2.10. Statistical analysis

The experimental unit for analysis of all data was the yard. Data were analysed following a completely randomised design using the general linear model (GLM) procedure contained in SAS (version 9; SAS Inst. Inc., Cary, NC). A comparative analysis between means was conducted using the following orthogonal contrasts: (1) Control vs. others; (2) Vitamin E vs. others; (3) Se source effect; (4) Se dose effect (5) Source  $\times$  dose interaction; (6) Control vs. Se; (7) Vitamin E vs. Se; and (8) Control vs. vitamin E. Data were presented as the mean of each group and root mean square error (RMSE) together with significance levels (P value). Differences between means were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Carcass characteristics

Carcass characteristics are presented in Table 2. Carcass, *psoas major*, *longissimus thoracis et lumborum*, ham and shoulder weights were not statistically affected by dietary treatments. Total lean percentage was also unaffected; however, the percentage of dorsal fat was lower ( $P = 0.031$ ) in those pigs supplemented with organic Se at high doses (SY-H) or vitamin E + Se. Kim et al. (2012) reported that Se (in the form of sodium selenite) inhibits adipocyte hypertrophy and abdominal fat accumulation in rats. Other authors found that a combination of Se and vitamin E supplements partially modulated fatty acid distribution (Douillet, Bost, Accominotti, Borson-Chazot & Ciavatti, 1998). In addition, Podszun et al. (2014) found that dietary  $\alpha$ -tocopherol reduced high-fat-induced lipid accumulation in the liver. These effects were recently related to the potential increase in cell resistance to insulin (Pinto et al., 2012). The lack of effect observed in groups SS-L, SS-H and SY-L in the present study may have been due to an insufficient dose or administration time for observing these effects, and SY-H and vitamin E + Se were the most effective treatments to reduce fat percentage.

### 3.2. Electrical conductivity, pH, drip loss and meat composition

The electrical conductivity (EC), pH and drip loss of muscle samples were unaffected by either selenium source or dietary vitamin E supplementation (Tables 2 and 3). However, a marked effect was observed of organic selenium on total water losses and evolution during the

lyophilisation process. Hence, meat samples from groups supplemented with the organic source of Se showed lower water losses after 20 h ( $P = 0.009$ ), 40 h ( $P = 0.037$ ) and 60 h ( $P = 0.045$ ) when compared to the mineral source of Se. This effect resulted in lower water losses during the initial water loss process during lyophilisation (lower percentage at 20 h,  $P = 0.027$ ). It is interesting to note that the lowest water losses were observed in the SY-H group. Organic Se has been reported to increase water-holding capacity (Mahan et al., 1999; Zhan et al., 2007; Li et al., 2011; Lisiak et al., 2014), although other authors have not found any effect in pork (Castro-Ríos & Narváez-Solarte, 2013; Bobcek et al., 2004). However, these latter authors used doses of 0.3 mg/kg or lower. In contrast, Li et al. (2011) used three different doses of selenium-enriched yeast (0, 0.3, and 3.0 mg Se/kg) and found a clearly lower drip loss in meat samples from pigs supplemented with 3.0 mg/kg, whereas the use of 0.3 mg/kg resulted in intermediate drip loss values that were no different from those obtained from the samples from non-supplemented pigs. Other authors who have observed an effect on drip loss used between 0.4–0.5 mg/kg in the form of organic Se (Lisiak et al., 2014) or a supplementation time of 40 days using doses of 0.3 mg/kg (Zhan et al., 2007). Mahan et al. (1999) fed pigs from 55 to 105 kg with organic selenium and found lower drip losses with a dose of 0.3 mg/kg when compared with the inorganic form. In the present research it was observed that differences were not statistically significant in drip loss of frozen muscle. The vitamin E + SS-supplemented group showed intermediate water loss values that were the same as in the other groups, and a lower percentage of water loss at 60 h ( $P = 0.0013$ ) when compared to the control group. According to the results of the present study, vitamin E plus a low dose of SS seems to have a more limited effect as regards reducing water loss in muscle samples when compared to organic Se at higher doses. Several authors have found that high levels of vitamin E reduce the amount of drip loss in pork (Ashgar et al., 1991; Cheah, Cheah & Krausgrill, 1995) in the samples from pigs carrying the halothane gene (Cheah et al., 1995) or in pigs of unknown halothane status. These effects have been attributed to the antioxidant capacity of vitamin E, which protects membrane integrity and thus reduces water loss (Ashgar et al., 1991). Conversely, other studies have shown no effect or contradictory results (Dirinck, Winne, Casteels & Frigg, 1996; Jensen et al., 1997). Moreover, other authors have reported no beneficial effect on meat quality when using a combination of dietary vitamin E (60 mg/kg) and Se at low doses (0.2 mg) (Kawecka, Jacyno, Matysiak, Kolodziej-Skalska & Pietruszka, 2013).

### 3.3. Tocopherol accumulation

The vitamin E concentration as affected by dietary treatment is presented in Table 4. As expected, muscle  $\alpha$ -tocopherol content was

**Table 2**  
Effect of selenium source (organic, SY vs. mineral, SS), dose (low, L vs. high, H) and vitamin E supplementation on electric conductivity (EC) and pH after slaughter in muscle samples from pigs fed the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE + SS	RMSE <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
<i>Carcass characteristics</i>								
Carcass weight, kg	95.23	94.48	94.37	96.01	91.85	91.74	5.942	0.2761
<i>Psoas major</i> weight, kg	0.59	0.58	0.59	0.59	0.60	0.58	0.035	0.5435
<i>Longissimus thoracis et lumborum</i> weight, kg	4.18	ba 4.11	ba 4.26	a 4.21	ba 4.14	ba 4.03	b 0.249	0.1941
Ham weight, kg	12.64	12.55	12.56	12.99	12.33	12.43	0.881	0.3362
Shoulder weight, kg	8.06	ba 7.93	ba 8.01	ba 8.07	a 7.95	ba 7.86	b 0.252	0.1984
Total lean meat, %	57.00	56.24	56.46	56.59	57.86	57.80	2.728	0.4502
Dorsal fat, %	24.81	ba 26.12	a 25.00	ba 24.93	ba 22.47	b 22.91	b 3.323	0.0310
<i>Meat characteristics</i>								
pH at 3 h	6.40	6.37	6.39	6.48	6.45	6.44	0.253	0.8561
pH at 20 h	5.69	5.75	5.67	5.68	5.66	5.67	0.158	0.6404
pH at 36 h	5.71	5.76	5.68	5.68	5.68	5.69	0.154	0.6436
EC at 20 h	2.47	2.75	2.41	2.22	2.30	2.11	1.214	0.7884
EC at 36 h	3.83	4.19	3.78	3.47	4.47	3.59	1.412	0.4053

<sup>1</sup> RMSE: root of the mean square error.

<sup>2</sup> P: differences were statistically significant when  $P < 0.05$ .

**Table 3**

Effect of selenium source (organic, SY vs. mineral, SS), dose (low, L vs. high, H) and vitamin E supplementation on moisture, drip loss and water loss during lyophilisation in muscle samples from pigs fed the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE + SS	RMSE <sup>1</sup>	Probability of contrast <sup>2</sup>							
								1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Moisture (%)</i>															
Day 0	73.90	73.76	73.58	73.48	73.45	73.04	1.37	NS <sup>4</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Day 7	73.63	73.37	73.22	72.95	72.42	73.35	1.16	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Drip loss (g drip loss/100 g samples)</i>															
Fresh	6.83	7.47	6.74	6.61	6.67	7.46	1.53	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Frozen	16.05	16.11	14.77	15>03	13.98	14.76	2.41	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Water loss during lyophilization (g water/100 samples)</i>															
20 h	71.87	71.65	70.62	68.98	68.15	69.28	2.87	0.0470	NS	0.0090	NS	NS	0.0600	NS	NS
40 h	72.84	73.18	72.35	72.09	71.81	72.41	1.15	NS	NS	0.0371	NS	NS	NS	NS	NS
80 h	73.34	73.55	72.78	72.46	72.26	72.75	1.18	NS	NS	0.0450	NS	NS	NS	NS	NS
pc_20 h <sup>3</sup>	97.99	97.40	97.03	95.20	94.27	95.19	3.26	0.0700	NS	0.0270	NS	NS	NS	NS	0.0750
pc_40 h	1.33	2.09	2.39	4.29	5.11	4.32	3.32	0.0630	NS	0.0310	NS	NS	0.0909	NS	0.0619
pc_60 h	0.68	0.51	0.58	0.51	0.62	0.48	0.14	0.0100	0.0538	NS	0.0550	NS	0.0244	NS	0.0013

<sup>1</sup> RMSE: root of the mean square error.

<sup>2</sup> Probability of contrast: (1): CONTROL vs. others; (2): VITE + SS vs. others; (3): SeY vs. SS; (4) S-L vs. S-H; (5): Se source × Se dose interaction; (6) CONTROL vs. Se; (7) VITE + SS vs. Se; (8) CONTROL vs. VITE + SS. Differences were statistically significant when  $P < 0.05$ .

<sup>3</sup> Percentage of drip losses at 20 h.

<sup>4</sup> NS: not statistically significant.

affected by dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate concentration, and groups supplemented with 100 mg/kg thus showed a higher concentration in meat samples ( $P = 0.0001$ ) than the other groups. Vitamin E was also affected by sample storage time, with all experimental groups showing a decrease. This is because vitamin E plays an important role in lipid antioxidant defence in the cell membrane (Buckley et al., 1995). Moreover, it is interesting to observe that control samples presented the lowest content of vitamin E, even though these had been supplemented with the same vitamin E dose as the Se-supplemented groups; however, differences between these groups were not statistically significant.

### 3.4. Lipid oxidation and antioxidant status

To evaluate the oxidative stability of pork according to selenium source or dose when compared to a control or a vitamin E + SS-supplemented group, ferrous-induced oxidation was measured in muscle samples (Table 4). Muscle samples from pigs supplemented with dietary vitamin E at 100 mg/kg plus 0.2 mg SS/kg showed the lowest malondialdehyde (MDA) concentration at 0 min ( $P = 0.0004$ ), 30 min ( $P = 0.0001$ ), 60 min ( $P = 0.0010$ ), 90 min ( $P = 0.0001$ ) and 120 min ( $P = 0.0001$ ) of incubation when compared to the other groups. Moreover, samples from pigs supplemented with vitamin

**Table 4**

Effect of selenium source (organic, SY vs. mineral, SS), dose (low, L vs. high, H) and vitamin E supplementation on  $\alpha$ -tocopherol ( $\mu\text{g/g}$ ), ferrous-induced oxidation (mg MDA/g meat) and muscle glutathione ( $\mu\text{M/g}$ ) in muscle samples from pigs fed the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE + SS	RMSE <sup>1</sup>	Probability of contrast <sup>2</sup>							
								1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Vitamin E (<math>\mu\text{g/g}</math>)</i>															
Day 0	1.88	2.11	2.12	2.00	1.97	3.28	0.54	0.0384	0.0001	NS	NS	NS	NS	0.0001	0.0001
Day 7	1.51	1.68	1.43	1.65	1.47	2.71	0.40	0.0666	0.0001	NS	NS	NS	NS	0.0001	0.0001
Day 0–7	0.37	0.42	0.69	0.35	0.50	0.57	0.38	NS <sup>3</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>TBARS (mg MDA/g)</i>															
0 min	1.65	1.26	1.28	1.46	1.29	0.87	0.37		0.0004	NS	NS	NS	0.0229	0.0022	0.0001
30 min	1.62	1.23	1.34	1.44	1.27	0.83	0.33	0.0036	0.0001	NS	NS	NS	0.0201	0.0002	0.0001
60 min	1.71	1.53	1.44	1.58	1.46	1.03	0.40	0.0020	0.0010	NS	NS	NS	NS	0.0028	0.0007
90 min	1.93	1.65	1.55	1.81	1.53	1.14	0.35	0.0401	0.0001	NS	NS	NS	0.0304	0.0004	0.0001
120 min	1.91	1.81	1.77	1.98	1.82	1.17	0.41	0.0036	0.0001	NS	NS	NS	NS	0.0001	0.0003
<i>Muscle glutathione (<math>\mu\text{M/g}</math>)</i>															
GSSH	1.47	1.03	0.86	1.25	0.51	0.41	0.99	0.075	0.094	NS	NS	NS	NS	NS	0.027
GSHfree	34.00	35.51	37.02	29.09	33.29	32.11	8.04	NS	NS	0.064	NS	NS	NS	NS	NS
GSSH/GSH	4.22	2.80	2.63	5.02	1.54	1.29	0.006	NS	0.096	NS	0.089	NS	NS	NS	0.054

<sup>1</sup> RMSE: root of the mean square error.

<sup>2</sup> Probability of contrast: (1): CONTROL vs. others; (2): VITE + SS vs. others; (3): SeY vs. SS; (4) S-L vs. S-H; (5): Se source × Se dose interaction; (6) CONTROL vs. Se; (7) VITE + SS vs. Se; (8) CONTROL vs. VITE + SS. Differences were statistically significant when  $P < 0.05$ .

<sup>3</sup> NS: not statistically significant.

E + SS had higher lipid stability ( $P < 0.05$ ) than those supplemented with Se alone. Thus, MDA concentration in muscle was reduced by about 43% in vitamin E + SS-supplemented pigs and by 14% in animals fed with a selenium-enriched diet when compared to control group. In addition, MDA production in the vitamin E + SS group was also reduced by 34% when compared to Se-supplemented pigs ( $P < 0.005$ ).  $\alpha$ -Tocopherol which is mainly located in muscle membrane (Buckley et al., 1995) has been reported to be an effective antioxidant, capturing free radicals and other reactive substances (Dirinck, De Winne, Casyteels & Frigg, 1996). Selenium is also recognised as an essential trace element that plays an important role in antioxidant defences as a component of Se-dependent glutathione peroxidase (GSH-Px). This enzyme protects cells against damage caused by free radicals and lipoperoxides (Finkel & Holbrook, 2000). The effect of both compounds has also been studied and a synergistic action has been reported between vitamin E and Se to protect the cell (Saito, Yoshida, Akazawa, Takahashi & Niki, 2003). Harsini, Habibiyan, Moeini and Abdolmohammadi (2012) compared vitamin E (125 and 250 mg/kg) and Se (0.5 and 1 mg/kg) supplementation both separately and in combination (125 mg vitamin E/kg and 0.5 mg Se/kg), and found a higher reduction in MDA production in broilers fed with both compounds when compared to the control. However, they did not find differences between vitamin E or selenium when supplemented separately. Ebeid, Zeweil, Basyony, Dosoky and Badry (2013) also reported a similar antioxidant effect of organic selenium (0.3 mg/kg) and vitamin E (250 mg/kg) in rabbits, and the combination of both was the most effective treatment to reduce TBARS. In contrast, other authors have not found any positive effect of organic Se at low doses (0.3 mg/kg) on the oxidative stability of pork muscle (Krska et al., 2001).

In the present research, no differences were detected in TBARS production according to Se source or dose. In contrast, Zhan et al. (2007) reported a higher stability of muscle samples against lipid oxidation following supplementation with the organic form at a dose of 0.3 mg Se/kg administered for 40 days. Bobcek et al. (2004) also found an effect on TBARS production, but these authors used 0.3 mg of organic Se in pigs from 35 to 100 kg.

To confirm these results, antioxidant status was measured as the oxidised to reduced glutathione rate (GSSH/GSH). Glutathione reductase (GR) plays an important role in maintaining redox homeostasis by reducing GSSH (oxidised GSH) to GSH, and the increased GR activity produces more GSH under oxidative stress (Grant, Collinson, Roe & Dawes, 1996). As observed before in TBARS content, meat from pigs supplemented with vitamin E + SS presented the lowest GSSH content ( $P = 0.027$ ) and the lowest GSSH/GSH ratio ( $P = 0.054$ ). Li et al. (2011) found a high correlation coefficient for TBARS content and glutathione peroxidase (GPX) activity. The results of the present study confirm that the vitamin E + SS group had the highest antioxidant capacity and that the different Se doses and sources had no effect on antioxidant capacity. Li et al. (2011) attributed the improvement in meat oxidative stability induced by Se to the protective effect of GPX against oxidative damage. In a proposed hierarchy of selenium usage, GSH-Px is one of the first needs to be satisfied (Brigelius-Flohe & Flohé, 2003). Mahan and Parret (1996) reported that although Se deposition in pig tissue was higher when the organic form of Se was fed, sodium selenite was more effective in attaining maximum GPX activity, particularly after feeding a diet with a low Se content over an extended period. Moreover, despite differences in GPX activity in organic selenium-supplemented animals, some studies have reported little or no potential effect of organic Se on improving the oxidative stability of meat (Juniper, Phipps, Ramos-Morales & Bertin, 2008; Juniper, Phipps & Bertin, 2011).

### 3.5. Colour and pigment stability of muscle

Colour changes, measured as  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (red colour),  $b^*$  (yellow-green colour), chroma (colour intensity or saturation) and hue (tone) after 1, 4 and 8 days of refrigerated storage, are presented in Table 5. The main changes in colour were observed in the group supplemented with vitamin E + SS, which showed higher  $a^*$  ( $P = 0.032$ ),  $b^*$  ( $P = 0.048$ ) and colour intensity ( $P = 0.037$ ), whereas colour tone was lower ( $P = 0.044$ ) at day 4 of storage when compared to the other groups. Hence, the use of both compounds (vitamin E + SS) yielded meat samples with 25% higher redness and 8% more colour

**Table 5**  
Effect of selenium source (organic, SY vs. mineral, SS), dose (low, L vs. high, H) and vitamin E supplementation on colour (CIELAB  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , chroma and hue values) of muscle samples from pigs fed the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE + SS	RMSE <sup>1</sup>	Probability of contrast <sup>2</sup>							
								1	2	3	4	5	6	7	8
<i>L*</i>															
Day 0	55.22	53.82	54.81	54.59	54.92	54.34	2.31	NS <sup>3</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Day 4	55.36	54.87	55.86	55.28	55.58	54.63	2.50	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Day 8	56.07	55.20	56.22	55.29	56.18	55.78	2.83	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>a*</i>															
Day 0	0.60	0.93	0.11	0.66	0.55	1.32	1.17	NS	0.0858	NS	NS	NS	NS	0.0894	NS
Day 4	3.40	3.35	2.84	2.94	2.90	4.02	1.17	NS	0.0326	NS	NS	NS	NS	0.0236	NS
Day 8	2.03	1.43	1.09	1.64	1.78	2.45	1.21	NS	0.0597	NS	NS	NS	NS	0.0385	NS
<i>b*</i>															
Day 0	12.10	11.45	11.43	11.74	11.83	12.21	0.91	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0854	NS
Day 4	12.02	11.81	11.63	11.39	11.59	12.42	0.98	NS	0.0484	NS	NS	NS	NS	0.0317	NS
Day 8	11.88	11.31	11.38	11.46	11.20	11.27	1.07	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Chroma</i>															
Day 0	12.21	11.53	11.53	11.84	11.87	12.31	0.95	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0875	NS
Day 4	12.57	12.31	12.02	11.82	11.98	13.09	1.21	NS	0.0372	NS	NS	NS	NS	0.0235	NS
Day 8	12.09	11.45	11.51	11.68	11.36	11.57	1.21	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Hue</i>															
Day 0	87.74	85.60	89.89	87.13	87.38	83.98	5.45	NS	0.0792	NS	NS	NS	NS	0.0894	NS
Day 4	74.94	74.42	76.73	76.05	76.03	72.30	4.45	NS	0.0455	NS	NS	NS	NS	0.0395	NS
Day 8	80.66	83.23	84.91	82.42	81.05	78.13	5.16	NS	0.0262	NS	NS	NS	NS	0.0166	NS

<sup>1</sup> RMSE: root of the mean square error.

<sup>2</sup> Probability of contrast: (1): CONTROL vs. others; (2): VITE + SS vs. others; (3): SeY vs. SS; (4) S-L vs. S-H; (5): Se source  $\times$  Se dose interaction; (6) CONTROL vs. Se; (7) VITE + SS vs. Se;

(8) CONTROL vs. VITE + SS. Differences were statistically significant when  $P < 0.05$ .

<sup>3</sup> NS: not statistically significant.

intensity than the use of organic or inorganic Se at high or low dose without vitamin E supplementation. The positive effects of dietary vitamin E have previously been reported by others (Monahan, Buckley, Morrissey, Lynch & Gray, 1992). Monahan et al. (1992) found higher redness in pork chops from animals fed with a vitamin E-enriched diet when compared to a control. Furthermore, the combination of vitamin E and Se has also yielded colour improvements (Krska et al., 2001). However, neither Se source nor dose was observed to exert an effect in the present study, which is consistent with the results found for the TBARS numbers and may possibly be explained by the short supplementation period. Other authors have not found any effect of selenium on meat colour (Lisiak et al., 2014). Juniper et al. (2011) have suggested that once the Se content of tissue exceeds the requirements of antioxidant enzymes, further increases in tissue Se do not result in any noticeable improvement in meat quality. However, others found a favourable effect of the organic form on colour parameters when compared with the inorganic form (Zhan et al., 2007; Bobcek et al., 2004; Mahan et al., 1999).

The concentration of myoglobin was also quantified because it is the main heme protein responsible for meat colour (Table 6). As explained before, the main effect observed on meat pigments was found when pigs were supplemented with vitamin E at 100 mg/kg and low doses of inorganic Se. Thus, pigs from the vitamin E + SS group presented higher DeoxyMb ( $P = 0.04$ ) and OxyMb (0.04) at day 4 and a lower MetMb to DeoxyMb ratio ( $P = 0.04$ ) when compared with the other groups. The vitamin E + SS group also showed higher DeoxyMb ( $P = 0.02$ ) and OxyMb ( $P = 0.025$ ) at day 4 and DeoxyMb at day 8 ( $P = 0.05$ ) when compared with those groups supplemented with Se. These results are consistent with those observed for colour parameters and TBARS numbers. Furthermore, a Se source effect was observed whereby pigs fed SY had a lower MetMb to DeoxyMb ratio ( $P = 0.03$ ) than those supplemented with SS.

### 3.6. Myofibrillar proteins and free amino acids

The myofibrillar protein pattern is presented in Fig. 1. Electrophoresis profiles were affected by the dietary treatment and the storage time. Meat storage essentially affected the troponin T, tropomyosin and 150 kDa bands, which partially disappeared after 7 days of storage. Other authors found similar results for storage time (Martinaud et al., 1997; Santé-Lhoutellier, Engel, Aubry & Gatellier, 2008) in bovine and lamb muscle. Martinaud et al. (1997) also found a concomitant appearance of a 30 kDa band which was considered as a proteolysis index.

However, as with Santé-Lhoutellier et al. (2008), we did not detect this compound.

The main effect observed between treatments was the greater decrease in MLC2, Tn-I, tropomyosin and Tn-T bands in control and SS-L treatments after 7 days of refrigerated storage when compared to the others. In addition, the 150 kDa band disappeared to a lesser extent in SS-H, SY-L, SY-H and VITE + SS after 7 days of storage. The disappearance of the myosin, troponin and tropomyosin bands could correspond to oxidation processes. Hence, dietary enrichment with organic selenium, synthetic selenium at high doses and vitamin E + SS exerted a strong effect on myofibrillar proteins in the present study. On the other hand, bands 98 and 105, which were already observed at day 2 of storage, were more marked after day 7 of storage in treatments SY-L, SY-H and VITE-SS. The effect of dietary vitamin E supplementation on myosin and tropomyosin bands has previously been reported (Aksu, Aktas, Kaya & Macit, 2005); however, no studies have investigated the effect of selenium.

Also noteworthy was the presence of a higher number of bands between tropomyosin and Tn-I bands in the VITE + SS group, which may be the result of tropomyosin fragmentation or may be an indicator of lower losses or myofibrillar oxidation, bearing in mind the high antioxidant power of this diet. Aksu, Aktas, Kaya and Macit (2003) also found a similar effect of vitamin E supplementation on myofibrillar proteins when using 45 mg/day for 75 days in lambs. Servais, Letexier, Favier, Duchamp and Desplanches (2007) reported that vitamin E supplementation decreases the rate of muscle proteolysis by reducing the expression of calpains, caspases-3, -9 and -12, and E3 ubiquitin ligases. Calpains are non-lysosomal  $Ca^{2+}$ -activated cysteine proteases that cleave titin and nebulin at sites near the Z-disc (Goll, Thompson, Li, Wei & Cong, 2003). Thus, the calpain system plays an important role in regulating proteolysis of muscle proteins under post-mortem conditions (Lonergan, Huff-Lonergan, Wiegand & Kriese-Anderson, 2001). Additional new bands between MLC-1 and Tn-C and between MLC2 and MLC3 appeared in the SeY-H group after 7 days of storage, but not in the other groups. These new compounds may arise from the decomposition of myosin and troponin chains and may be indicators of a higher proteolysis activity in this group.

The free amino acid content of pork samples is shown in Tables 7 and 8. As expected, free amino acid content increased with meat ageing and was due to the action of muscle aminopeptidases (Moya et al., 2001). The group supplemented with vitamin E + SS had the lowest content of serine (SER) ( $P = 0.011$ ) and anserine (ANS) ( $P = 0.006$ ) at day 2 of storage and of SER ( $P = 0.035$ ), ANS ( $P = 0.018$ ) and carnosine

**Table 6**

Effect of selenium source (organic, SY vs. mineral, SS), dose (low, L vs. high, H) and vitamin E supplementation on pigment stability of muscle samples from pigs fed the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE + SS	RMSE <sup>1</sup>	Probability of contrast <sup>2</sup>								
								1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Oxymyoglobin (OxyMb)</i>																
Day 0	60.18	59.73	62.82	60.55	60.23	57.93	4.34	NS <sup>3</sup>	0.0861	NS	NS	NS	NS	NS	0.0786	NS
Day 4	54.17	54.36	56.48	56.44	56.04	51.97	4.50	NS	0.0368	NS	NS	NS	NS	NS	0.0257	NS
Day 8	59.14	61.66	64.61	63.26	62.22	60.51	5.34	0.096	NS	NS	NS	NS	NS	0.0625	NS	NS
<i>Deoxymyoglobin (DeoxyMb)</i>																
Day 0	69.86	69.83	69.17	71.03	69.78	71.48	1.98	NS	0.0378	NS	NS	NS	NS	NS	0.0439	0.0899
Day 4	91.15	90.33	90.86	90.80	90.28	91.63	1.22	NS	0.0394	NS	NS	NS	NS	NS	0.0239	NS
Day 8	83.66	80.33	81.46	84.07	84.63	86.70	5.41	NS	0.0562	0.0611	NS	NS	NS	NS	0.0490	NS
<i>Metmyoglobin (MetMb)</i>																
Day 0	135.87	135.84	135.04	135.49	135.95	135.77	2.14	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Day 4	118.48	117.98	115.74	116.63	116.61	117.63	3.97	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Day 8	114.38	117.70	108.70	107.07	107.63	105.08	9.38	0.140	0.0853	0.0673	NS	0.133	NS	NS	NS	0.0407
<i>MetMb/DeoxyMb</i>																
Day 8	1.37	1.47	1.33	1.27	1.27	1.21	0.18	NS	0.0434	0.0288	NS	NS	NS	NS	0.0585	0.0625

<sup>1</sup> RMSE: root of the mean square error.

<sup>2</sup> Probability of contrast: (1): CONTROL vs. others; (2): VITE + SS vs. others; (3): SeY vs. SS; (4) S-L vs. S-H; (5): Se source × Se dose interaction; (6) CONTROL vs. Se; (7) VITE + SS vs. Se; (8) CONTROL vs. VITE + SS. Differences were statistically significant when  $P < 0.05$ .

<sup>3</sup> NS: not statistically significant.

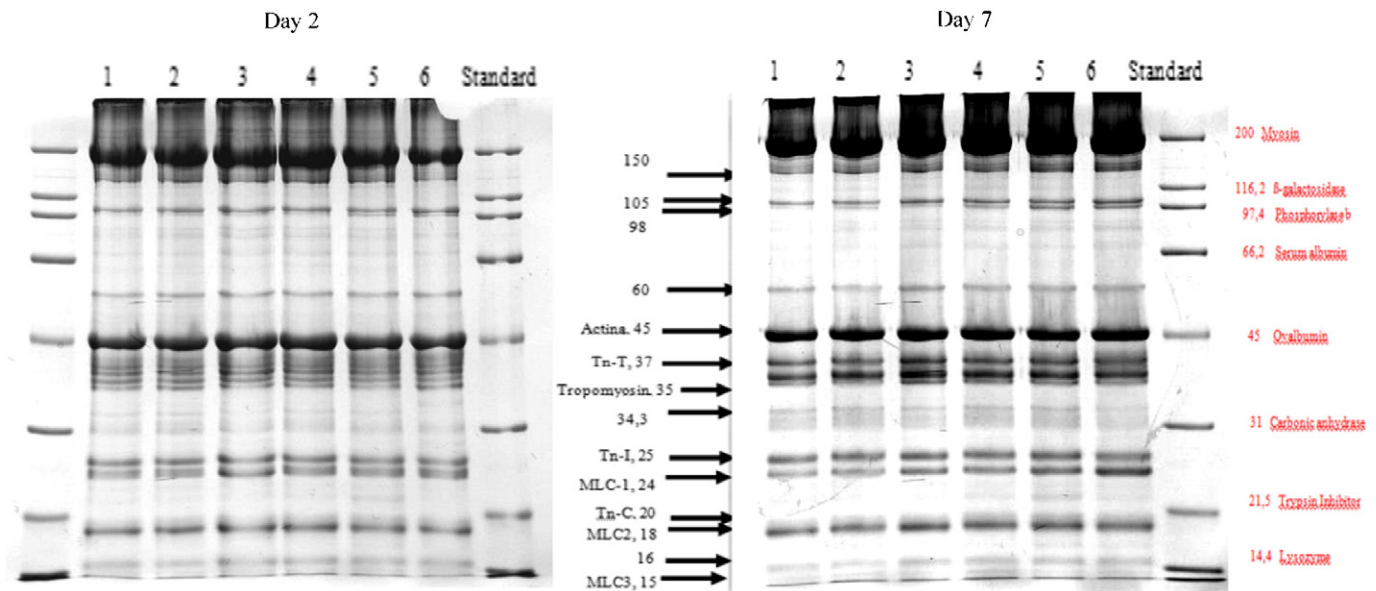


Fig. 1. Myofibrillar proteins of muscle samples as affected by dietary treatments (1: CONTROL; 2: SS-L; 3: SS-H; 4: SY-L; 5: SY-H; 6: VITE-SS).

(CAR) ( $P = 0.009$ ) at day 7 when compared to the other groups. In contrast, it is also of interest to observe that essential amino acids were higher in the group supplemented with VITE + SS when compared with the others. Hence, PRO ( $P = 0.0001$ ), TRP ( $P = 0.0063$ ), and PHE ( $P = 0.0062$ ) at day 2 and day 7 ( $P = 0.0001$ ;  $P = 0.0001$  and  $P = 0.0004$ , respectively) were higher in meat from pigs supplemented with the VITE + SS-enriched diet when compared with the other groups. These free amino acid contents (PRO, PHE, and TRP) were also lower in Se-enriched groups when compared with the group supplemented with VITE + SS, and no effects of the Se source or dose were found, which would indicate that the increase in the concentration of these essential amino acids was mainly due to vitamin E supplementation. This phenomenon has not been observed before. Taking into account the higher antioxidant power of the VITE + SS supplement found in the present study for MDA production, colour changes and

myofibrillar protein, this result might be explained by a higher protective effect of vitamin E against protein and amino acid oxidation (Mercier, Gatellier & Renerre, 2004). This protective effect of vitamin E would also maintain calpain activation post-mortem, which would increase proteolysis of filament proteins in meat.

The Se source also affected the free amino acid content of meat. Meat from pigs supplemented with organic Se had higher content of glycine (GLY) and carnosine (CAR) at day 2 and also tended to have higher taurine (TAU) ( $P = 0.098$ ) and anserine (ANS) ( $P = 0.051$ ) at day 2 and alanine (ALA) ( $P = 0.078$ ) at day 7 when compared with the inorganic form. The dose effect was only observed in ALA content, which increased with the Se supplementation dose ( $P = 0.036$ ). Moreover, dietary Se supplementation resulted in higher SER ( $P = 0.027$  and  $P = 0.026$  at days 2 and 7, respectively), ANS ( $P = 0.0005$  and  $P = 0.012$  at days 2 and 7, respectively) and CAR ( $P = 0.016$  at day

Table 7  
Effect of selenium source (organic, SY vs. mineral, SS), dose (low, L vs. high, H) and vitamin E supplementation on free non-essential amino acids (mg/100 g muscle) at 2 or 8 days of meat storage from pigs fed the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE + SS	RMSE <sup>1</sup>	Probability of contrast <sup>2</sup>								
								1	2	3	4	5	6	7	8	
SER day 2	5.75	4.73	5.16	5.00	5.68	4.25	0.99	0.0453	0.0112	NS	NS	NS	NS	NS	0.0273	0.0040
SER day 7	9.04	9.29	9.81	9.43	10.48	7.91	2.02	NS <sup>3</sup>	0.0355	NS	NS	NS	NS	NS	0.0260	NS
ASN day 2	2.41	2.14	2.36	2.20	2.54	2.15	0.43	NS	NS	NS	0.0709	NS	NS	NS	NS	NS
ASN day 7	3.77	3.88	4.16	3.93	4.34	3.47	0.78	NS	0.0778	NS	NS	NS	NS	NS	0.0554	NS
GLY day 2	8.72	7.78	7.93	8.25	9.34	7.86	1.32	NS	NS	0.0509	NS	NS	NS	NS	NS	NS
GLY day 7	8.86	9.04	9.76	9.57	10.09	8.91	1.47	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
GLN day 2	42.11	41.12	40.75	42.49	46.70	37.06	8.95	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
GLN day 7	41.04	43.94	45.15	45.94	47.78	41.46	7.89	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
β-ALA day 2	6.87	6.90	6.67	8.46	7.46	5.98	2.23	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
β-ALA day 7	5.15	5.69	5.83	6.02	5.16	4.66	1.74	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TAU day 2	29.63	30.75	28.98	33.45	35.67	30.24	7.86	NS	NS	0.0989	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TAU day 7	25.03	25.98	26.79	30.74	28.58	27.66	6.65	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ALA day 2	19.95	16.92	18.20	18.09	19.66	17.53	3.32	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ALA day 7	20.17	19.71	22.43	22.04	23.92	22.01	3.00	NS	NS	0.0789	0.0358	NS	NS	NS	NS	NS
CAR day 2	628.03	560.63	550.53	581.16	688.65	501.58	94.60	NS	0.0091	0.0224	NS	0.0860	NS	NS	0.0162	0.0106
CAR day 7	515.03	543.24	569.80	551.60	567.67	481.03	105.89	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0727	NS
ANS day 2	26.57	26.85	25.53	28.69	30.25	20.93	4.62	NS	0.0006	0.0512	NS	NS	NS	NS	0.0005	0.0190
ANS day 7	22.41	24.51	23.81	25.11	24.30	19.76	4.50	NS	0.0185	NS	NS	NS	NS	NS	0.0119	NS
ORN day 2	0.52	0.53	0.47	0.36	0.40	0.42	0.13	NS	NS	0.017	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ORN day 7	0.46	0.42	0.39	0.29	0.38	0.45	0.13	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0867	NS	NS

<sup>1</sup> RMSE: root of the mean square error.

<sup>2</sup> Probability of contrast: (1): CONTROL vs. others; (2): VITE + SS vs. others; (3): SeY vs. SS; (4) S-L vs. S-H; (5): Se source × Se dose interaction; (6) CONTROL vs. Se; (7) VITE + SS vs. Se;

(8) CONTROL vs. VITE + SS. Differences were statistically significant when  $P < 0.05$ .

<sup>3</sup> NS: not statistically significant.

**Table 8**

Effect of selenium source (organic, SY vs. mineral, SS), dose (low, L vs. high, H) and vitamin E supplementation on free essential amino acids (mg/100 g muscle) at 2 or 8 days of meat storage from pigs fed the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE + SS	RMSE <sup>1</sup>	Probability of contrast <sup>2</sup>								
								1	2	3	4	5	6	7	8	
HIS day 2	2.45	2.57	2.28	2.44	2.72	2.18	0.69	NS <sup>3</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HIS day 7	3.64	3.52	3.38	3.78	3.81	3.17	0.73	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
THR day 2	3.86	3.48	3.99	3.42	4.34	4.03	0.95	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
THR day 7	6.08	6.16	6.20	6.50	7.15	6.26	1.36	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PRO day 2	3.49	3.13	3.49	2.88	3.25	4.82	0.85	NS	0.0001	NS	NS	NS	NS	0.0001	0.0032	
PRO day 7	3.70	3.57	4.06	3.55	3.94	5.64	0.97	NS	0.0001	NS	NS	NS	NS	0.0001	0.0003	
TYR day 2	4.41	3.77	4.04	3.42	3.89	4.47	0.96	NS	NS	NS	NS	NS	0.164	0.0764	NS	
TYR day 7	6.85	6.79	7.04	6.54	6.62	7.67	1.30	NS	0.0819	NS	NS	NS	NS	0.0815	NS	
VAL day 2	4.17	3.52	4.03	3.43	3.63	3.71	0.73	0.0830	NS	NS	NS	NS	0.0819	NS	NS	
VAL day 7	5.50	5.49	6.12	5.60	5.91	5.74	0.88	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
MET day 2	2.36	1.96	2.42	1.99	2.03	2.11	0.55	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
MET day 7	4.48	4.48	4.97	4.59	4.78	4.61	0.85	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
ILE day 2	3.67	2.88	3.67	2.88	3.08	2.88	0.60	0.0139	NS	NS	0.025	NS	0.0260	NS	0.0115	
ILE day 7	5.22	4.91	5.49	4.92	5.03	4.69	0.87	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
LEU day 2	4.98	4.24	5.15	4.08	4.05	4.25	1.17	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
LEU day 7	7.77	7.76	8.53	7.75	8.13	8.25	1.54	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
PHE day 2	3.78	3.38	3.92	3.21	3.35	4.54	0.91	NS	0.0062	NS	NS	NS	NS	0.0045	NS	
PHE day 7	5.70	5.64	6.07	5.48	5.60	7.52	1.23	NS	0.0004	NS	NS	NS	NS	0.0006	0.0052	
TRP day 2	1.05	1.00	1.02	0.86	0.93	1.29	0.28	NS	0.0063	NS	NS	NS	NS	0.0046	NS	
TRP day 7	1.29	1.35	1.37	1.22	1.22	1.89	0.36	NS	0.0001	NS	NS	NS	NS	0.0001	0.0018	
LYS day 2	3.60	3.21	3.56	2.65	3.14	3.03	0.86	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
LYS day 7	5.39	5.43	5.64	4.25	4.78	5.72	1.50	NS	NS	0.061	NS	NS	NS	NS	NS	

<sup>1</sup> RMSE: root of the mean square error.

<sup>2</sup> Probability of contrast: (1): CONTROL vs. others; (2): VITE + SS vs. others; (3): SeY vs. SS; (4) S-L vs. S-H; (5): Se source × Se dose interaction; (6) CONTROL vs. Se; (7) VITE + SS vs. Se; (8) CONTROL vs. VITE + SS. Differences were statistically significant when  $P < 0.05$ .

<sup>3</sup> NS: not statistically significant.

2) when compared to vitamin E supplementation. As indicated before, no previous information exists on the effect of Se source or dose on muscle proteolysis. Carnosine is an important natural water-soluble muscle dipeptide that can contribute to the inactivation of lipid oxidation catalysts and free radicals in the sarcoplasm (Decker & Crum, 1993). The different proteolytic effect of the Se sources should be highlighted since a higher proteolysis may be partially responsible for the increased water-holding capacity (WHC) observed in groups supplemented with organic Se when compared to the inorganic Se. Hence, Kristensen and Purslow (2001) hypothesised that the increase in meat WHC during storage time was due to post-mortem degradation of cytoskeletal proteins. They further postulated that the elution water flow rate is inversely related to the quantity of proteolysed cytoskeletal proteins with time post-mortem. In turn, Lonergan and Lonergan (2005) reported that the degradation of proteins such as desmin, talin or vinculin in the early post-mortem period allows water that is expelled from intramyofibrillar spaces to remain in the cell for a longer period of time. Consequently, the results of the present study would support the hypothesis that early post-mortem proteolysis of intermediate filament proteins can minimise the flow of water from within the cell to the drip channels. However, other studies showed that not always protein degradation could increase water holding capacity of pork (Lawson, 2004; Zhang et al., 2006).

However, given that these proteins are substrates of calpains, which are directly involved in regulating proteolysis, and that it has been reported that calpain expression is reduced by vitamin E supplementation (Servais et al., 2007), higher drip loss would be expected in pigs that received a vitamin E-enriched diet. Conversely, it has also been reported that protein oxidation may reduce the functionality of calpains; thus, vitamin E might also protect muscle enzymes. This possible double effect described for vitamin E in inhibiting calpain oxidation and expression could be responsible for the intermediate effects observed for water loss in the present study. The possible effect of higher free-essential amino acid content is unknown. These differences in muscle proteolysis by dietary vitamin E enrichment might in part explain the controversial effects of dietary vitamin E supplementation on drip loss reported in many studies in the literature. However, numerous other factors that could affect the calpain system must be taken into consideration, and further research is required to confirm these effects.

### 3.7. Myofibril fragmentation index (MFI)

In order to confirm the effect of Se on meat proteolysis, the myofibrillar fragmentation index (MFI) was measured (Table 9). At day 2 of storage, MFI was not modified by the dietary treatment. At day 8, the MFI was neither statistically affected. However, SeY and VITE + SS

**Table 9**

Effect of selenium source (organic, SY vs. mineral, SS), dose (low, L vs. high, H) and vitamin E supplementation on myofibrillar fragmentation index (MFI) from pigs fed the experimental diets.

	CONTROL	SS-L	SS-H	SY-L	SY-H	VITE + SS	RMSE <sup>1</sup>	Probability of contrast <sup>2</sup>								
								1	2	3	4	5	6	7	8	
MFI																
Day 0	28.41	26.44	25.34	30.51	29.42	29.33	10.55	NS <sup>3</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Day 8	64.16	57.86	55.93	61.89	78.52	78.76	21.21	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

<sup>1</sup> RMSE: root of the mean square error.

<sup>2</sup> Probability of contrast: (1): CONTROL vs. others; (2): VITE + SS vs. others; (3): SeY vs. SS; (4) S-L vs. S-H; (5): Se source × Se dose interaction; (6) CONTROL vs. Se; (7) VITE + SS vs. Se; (8) CONTROL vs. VITE + SS. Differences were statistically significant when  $P < 0.05$ .

<sup>3</sup> NS: not statistically significant.

groups had the highest MFI values at day 8, even though differences were not statistically different ( $P = 0.147$  and  $P = 0.125$ , respectively). The increase in MFI values with meat ageing has been reported by others (Dosler, Polak, Zlender, & Gasperlin, 2007), since there is a relationship between muscle proteolysis and MFI values (Kristensen et al., 2002; Koohmaraie, Whipple, Kretchmar, Crouse & Mersmann, 1991). These results would be in accordance with the myofibrillar protein oxidation and free amino acid content described above. Hence, meat from groups supplemented with SeY and VITE + SS presented higher muscle proteolysis, which would explain the lower or intermediate water losses observed for these groups.

In conclusion, dietary selenium source at 0.2 or 0.4 mg/kg administered for 26 days did not modify MDA production, GSSH concentration or colour parameters of meat. However, organic Se effectively increased WHC and post-mortem muscle proteolytic activity. The administration of 0.2 mg/kg SS plus 100 mg VITE/kg was the most efficient treatment for stabilising colour, reducing MDA and GSSH production and decreasing myofibrillar protein hydrolysis/oxidation; however, this dietary supplementation was not as effective as organic Se administration in improving WHC. This result would confirm the relation between muscle proteolysis and WHC.

### Acknowledgements

This research was supported by projects CDTI IDI-20111017 and S2013/ABI-2913-MEDGAN-CAM. We hereby acknowledge the cooperation of Ana I. Rodriguez, Incarlopsa and COPISO staff for the aid throughout the project.

### References

- Aksu, M. I., Aktas, N., Kaya, M., & Macit, M. (2003). The effects of vitamin E supplementation on the myofibrillar protein of male Morkaraman lambs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 987–990.
- Aksu, M. I., Aktas, N., Kaya, M., & Macit, M. (2005). Effects of vitamin E supplementation on myofibrillar proteins of fat-tailed awassi male lambs. *Journal of Muscle Foods*, 16, 177–183.
- Andersen, H. J., Oksbjerg, N., Young, J. F., & Therkildsen, M. (2005). Feeding and meat quality—A future approach. *Meat Science*, 70, 543–554.
- Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (1991). Deproteinization techniques for HPLC amino acids analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1792–1795.
- Armenteros, M., Aristoy, M. C., Barat, J. M., & Toldrá, F. (2012). Biochemical and sensory changes in dry-cured ham salted with partial replacements of NaCl by other chloride salts. *Meat Science*, 90, 361–367.
- Ashgar, A., Gray, J. I., Miller, E. R., Ku, P. K., Booren, A. M., & Buckley, D. J. (1991). Influence of supranutritional vitamin E supplementation in the feed on swine growth, performance and deposition in different tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57, 31–41.
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., Tarvin, T. L., & Frost, B. A. (1987). New rapid high sensitivity analysis of amino acids in food type samples. *Journal of Association of Analytical Chemistry*, 70, 241–247.
- Bobcek, B., Lahucky, R., Mrazova, J., Bobcek, R., Novotna, K., & Vasicek, D. (2004). Effects of dietary organic selenium supplementation on selenium content, antioxidative status of muscles and meat quality of pigs. *Czech Journal of Animal Science*, 49, 411–417.
- BOE (2013). RD 53/2013, de 21 de octubre por la que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Spain. Boletín Oficial del Estado*, 252, 34367–34391.
- Boles, J. O., Cisneros, R. J., Weir, M. S., Odom, J. D., Villafranca, J. E., & Dunlap, R. B. (1991). Purification and characterization of selenomethionyl thymidylate synthase from *Escherichia coli*: Comparison with the wild-type enzyme. *Biochemistry*, 30, 11073–11080.
- Brigelius-Flohé, & Flohé, L. (2003). Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *Biofactors*, 17, 93–102.
- Buckley, D. J., Morrissey, P. A., & Gray, J. I. (1995). Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science*, 73, 3122–3313.
- Castro-Ríos, K., & Narváez-Solarte, W. (2013). Sensory quality and cooking loss in pork meat: Effect of sex and source of selenium. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 11(1), 130–135.
- Cheah, K. S., Cheah, A. M., & Krausgrill, D. I. (1995). Effect of dietary supplementation of vitamin E on pig meat quality. *Meat Science*, 39, 255–264.
- CIE (1976). *Recommendations on uniform colour spaces-colour difference equations-psychometric colour terms. Commission Internationale de l'Eclairage, Suppl. 2 to CIE. Publication no 15 (E-1.31) 197/(TC-1.3)* Paris: Bureau de la CIE.
- Culler, R. D., Parrish, F. C., Jr, F. C., Smith, G. C., & Cross, H. R. (1978). Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical, and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. *Journal of Food Science*, 43, 1177.
- Decker, E. A., & Crum, A. D. (1993). Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat Science*, 34, 245–253.
- Dirinck, P., De Winne, A., Casytees, M., & Frigg, M. (1996). Studies on vitamin E and meat quality. 1. Effect of feeding high vitamin E levels on time related pork quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 65–68.
- Dosler, D., Polak, T., Zlender, B., Gasperlin, L. & (2007). Relation of myofibril fragmentation to textural and chemical parameters of aged pork longissimus dorsi. *Acta agriculturae Slovenica*, 90 (1), 5–16
- Douillet, C., Bost, M., Accominotti, M., Borson-Chazot, F., & Ciavatti, M. (1998). Effect of selenium and vitamin E supplementation on lipid abnormalities in plasma, aorta, and adipose tissue of Zucker rats. *Biological Trace Element Research*, 1998, 221–236.
- Ebeid, T. A., Zeweil, H. S., Basyony, M. M., Dosoky, W. M., & Badry, H. (2013). Fortification of rabbit diets with vitamin E or selenium affects growth performance, lipid peroxidation, oxidative status and immune response in growing rabbits. *Livestock Science*, 155, 323–331.
- Faustman, C., & Wang, F. (2000). Potential mechanisms by which vitamin E improves oxidative stability of myoglobin. In E. A. Decker, C. Faustman, & C. J. López-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods-nutritional strategies to improve quality* (pp. 135–152). Toronto: John Wiley & Sons, Inc.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Review*, 83, 731–801.
- Grant, C. M., Collinson, L. P., Roe, J. H., & Dawes, I. W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yap-1 transcriptional regulation. *Molecular Microbiology*, 21, 171–179.
- Harsini, S. G., Habibiyan, M., Moeini, M. M., & Abdolmohammadi, A. R. (2012). Effects of dietary selenium, vitamin E, and their combination on growth, serum metabolites, and antioxidant defense system in skeletal muscle of broilers under heat stress. *Biological Trace Element Research*, 148, 322–330.
- Honikel, K. O. (1997). Reference methods supported by the OECD and their use in Mediterranean meat products. *Food Chemistry*, 59, 573–582.
- Jang, Y. D., Choi, H. B., Durosos, S., Schlegel, P., Choie, B. R., & Kim, Y. Y. (2010). Comparison of bioavailability of organic selenium sources in finishing pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 23, 931–936.
- Jensen, C., Guidera, J., Skovgaard, I. M., Staun, H., Skibsted, L. H., Jensen, S. K., ... Bertelsen, G. (1997). Effects of dietary alpha-tocopheryl acetate supplementation on alpha-tocopherol deposition in porcine m. psoas major and m. longissimus dorsi and on drip loss, color stability and oxidative stability of pork meat. *Meat Science*, 45, 491–500.
- Juniper, D. T., Phipps, R. H., Ramos-Morales, E., & Bertin, G. (2008). Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 86, 3100–3109.
- Juniper, D. T., Phipps, R. H., & Bertin, G. (2011). Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in commercial-line turkeys. *Animal*, 5, 1751–1760.
- Kawecka, M., Jacyno, E., Matysiak, B., Kolodziej-Skalska, A., & Pietruszka, A. (2013). Effects of selenium and vitamin E supplementation on selenium distributions and meat quality of pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A-Animal Science*, 63, 194–200.
- Kim, J. E., Choi, S. I., Lee, H. R., Hwang, I. S., Lee, Y. L., An, B. S., ... Hwang, D. Y. (2012). Selenium significantly inhibits adipocyte hypertrophy and abdominal fat accumulation in OLETF rats via induction of fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Biological Trace Element Research*, 150, 360–370.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D. H., Crouse, J. D., & Mersmann, H. J. (1991). Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 69, 617–624.
- Kristensen, L., Therkildsen, M., Riis, B., Sorensen, M. T., Oksbjerg, N., Purslow, P. P., & Ertbjerg, P. (2002). Dietary-induced changes of muscle growth rate in pigs: Effects on in vivo and post-mortem muscle proteolysis and meat quality. *Journal of Animal Science*, 80, 2862–2871.
- Kristensen, L., & Purslow, P. P. (2001). The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: Role of cytoskeletal proteins. *Meat Science*, 58, 17–23.
- Kronbrust, D. J., & Mavis, R. D. (1980). Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: Correlation with vitamin E content. *Lipids*, 15, 315–322.
- Krska, P., Lahucky, R., Kuchenmeister, U., Nurnberg, K., Palanska, O., Bahelka, I., ... Ender, K. (2001). Effects of dietary organic selenium and vitamin E supplementation on post mortem oxidative deterioration in muscles of pigs. *Archives of Animal Breeding*, 44, 193–201.
- Laemmly, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lawson, M. A. (2004). The role of integrin degradation in post-mortem drip loss in pork. *Meat Science*, 68, 559–566.
- Li, J., Zhou, J., Zhao, H., Lei, X., Xia, Z., Gao, G., & Wang, K. (2011). Enhanced water-holding capacity of meat was associated with increased Sepw1 gene expression in pigs fed selenium-enriched yeast. *Meat Science*, 87, 95–100.
- Lisiak, D., Janiszewski, P., Blicharski, T., Borzuta, K., Grzeslowski, E., Lisiak, B., ... Batorska, M. (2014). Effect of selenium supplementation in pig feed on slaughter value and physicochemical and sensory characteristics of meat. *Annals of Animal Science*, 14, 213–222.
- Loneragan, S. M., Huff-Loneragan, E., Wiegand, B. R., & Kriese-Anderson, L. A. (2001). Post-mortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from brangus cattle. *Journal of Muscle Foods*, 12, 121–136.

- Loneragan, E., & Loneragan, S. T. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of post-mortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194–204.
- Mahan, D. C., & Parret, N. A. (1996). Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. *Journal of Animal Science*, 74, 2967–2974.
- Mahan, D. C., Cline, T. R., & Richert, B. (1999). Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality. *Journal of Animal Science*, 77, 2172–2179.
- Mahan, D. C., Azain, M., Crenshaw, T. D., Cromwell, G. L., Dove, C. R., Kim, S. W., ... Wan Heugten, E. (2014). Supplementation of organic and inorganic selenium to diets using grains grown in various regions of the United States with differing natural Se concentrations and fed to grower-finisher swine. *Journal of Animal Science*, 92, 4991–4997.
- Martinaud, A., Mercier, Y., Marinova, P., Tassy, C., Gatellier, P., & Renner, M. (1997). Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2481–2487.
- Melody, J. L., Loneragan, S. M., Rowe, L. J., Huiatt, T. W., Mayes, M. S., & Huff-Loneragan, E. (2004). Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *Journal of Animal Science*, 82, 1195–1205.
- Mercier, Y., Gatellier, P., & Renner, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, 66, 467–473.
- Molina, I., & Toldrá, F. (1992). Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 57, 1308–1310.
- Monahan, F. J., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., Lynch, P. B., & Gray, J. I. (1992). Influence of dietary fat and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. *Meat Science*, 31, 229–241.
- Moya, V. J., Flores, M., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2001). Pork meat quality affects peptide and amino acid profiles during the ageing process. *Meat Science*, 58, 197–206.
- National Research Council, NRC (2012). *Nutrient requirement of swine* (eleventh ed.). Washington DC, USA: NRC, National Academy Press.
- Pinto, A., Juniper, D. T., Sanil, M., Morgan, L., Clark, L., Sies, H., & Steinbrenner, H. (2012). Supranutritional selenium induces alterations in molecular targets related to energy metabolism in skeletal muscle and visceral adipose tissue of pigs. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 114, 47–54.
- Podszun, M., Grebenstein, N., Spruss, A., Schlueter, T., Kremoser, C., Bergheim, I., & Frank, J. (2014). Dietary  $\alpha$ -tocopherol and atorvastatin reduce high-fat-induced lipid accumulation and down-regulate CD36 protein in the liver of guinea pigs. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 573–579.
- Rey, A. I., Daza, A., López-Carrasco, C., & López-Bote, C. J. (2006). Quantitative study of the alpha- and gamma-tocopherols accumulation in muscle and backfat from Iberian pigs kept free-range as affected by time of free-range feeding or weight gain. *Animal Science*, 82, 901–908.
- Rey, A. I., & López-Bote, C. J. (2014). Alpha-tocopherol stereoisomer analysis as discriminant method for distinguishing Iberian pig feed intake during the fattening phase. *Food Chemistry*, 142, 342–348.
- Rowe, L. J., Maddock, K. R., Loneragan, S. M., & Huff-Loneragan, E. (2004). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of calpain. *Journal of Animal Science*, 82, 3254–3266.
- Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K., & Niki, E. (2003). Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 39428–39434.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Aubry, L., & Gatellier, P. (2008). Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat Science*, 79, 777–783.
- Schrauzer, G. N. (2000). Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *The Journal of Nutrition*, 130, 1653–1656.
- Servais, S., Letexier, D., Favier, R., Duchamp, D., & Desplanches, D. (2007). Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation. Links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radical Biology and Medicine*, 42, 627–635.
- Shen, H. M., Yang, C. F., Liu, J., & Ong, C. N. (2000). Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1115–1124.
- Suzuki, K. T., & Ogra, Y. (2002). Metabolic pathway for selenium in the body: Speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Additives and Contaminants*, 19(10), 974–983.
- Tang, J., Faustman, C., & Hoagland, T. A. (2004). Krzywicki revisited: Equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts. *Journal of Food Science*, 69, 717–720.
- Toldrá, F., Miralles, M. C., & Flores, J. (1992). Protein extractability in dry-cured ham. *Food Chemistry*, 44, 391–399.
- Zhan, X., Wang, M., Zhao, R., Li, W., & Zu, Z. (2007). Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 132, 202–211.
- Zhang, W. G., Loneragan, S. M., Gardner, M. A., & Huff-Loneragan, E. (2006). Contribution of post-mortem changes of integrin, desmin and u-calpain to variation in water holding capacity of pork. *Meat Science*, 74, 578–585.



## 6. Discusión General

Comenzamos la discusión con un breve resumen de los trabajos que sirven de fundamento a la Tesis. Se trata de 3 trabajos de investigación en cerdos que han dado lugar a publicaciones en revistas científicas que numeramos 1º, 2º, y 3º por orden cronológico de realización de aquellos según se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Resumen de condiciones testadas en los ensayos de la tesis.

Ensayo	Animales	Sin Suplemento	Selenito sódico (ppm)/vitamina E (ppm)	Selenio orgánico (ppm)/vitamina E (ppm)	Días
1 <sup>1</sup>	30		SeS. 0.30/15	SeY 0.30/15	65
2 <sup>2</sup>	30		SeS. 0.40/15	SeY 0.40/15; SeY E 0.40/100	65
3 <sup>3</sup>	180	Control 0.004 /48	SSL 0.20/15; SSH 0.40/15; VitE 0.20/100	SeYL 0.20/15; SeYH 0.40/15	26

<sup>1</sup>.- (456); <sup>2</sup>.- PENDIENTE ACEPTACIÓN; <sup>3</sup>.- (457)

### 6.1. Características de la canal

No se han observado diferencias en características de la canal y composición de la carne en los dos primeros ensayos. En el tercer ensayo tampoco se han observado diferencias peso de la canal y cortes comerciales entre tratamientos. Sin embargo, el porcentaje de grasa dorsal fue menor en los cerdos que recibieron selenio orgánico a dosis más altas ( $P= 0.031$ ). No es un efecto muy marcado ni puede por tanto extraerse una conclusión sólida, pero es interesante señalar que Kim y colaboradores (458) observaron que el selenio puede inhibir la hipertrofia de adipocitos y por tanto el engrasamiento en ratas (350). Otros autores han señalado el papel protector de la vitamina E en la acumulación de grasa en el hígado (459), lo que puede aumentar la resistencia a la insulina (389).

### 6.2. Concentración de selenio y otros minerales en tejido muscular del cerdo

En el experimento 2 se ha medido la concentración de selenio en tejido muscular, observándose un contenido superior en los grupos que recibieron selenio orgánico (Art 2-Tabla 2), lo que está de acuerdo con la bibliografía existente (351, 460, 461).

También se ha observado una mayor concentración de Ca, Zn y P en los cerdos que recibieron un pienso con selenio orgánico ( $P=0.008$ ,  $P=0.018$  y  $P=0.0007$ , respectivamente), lo que coincide con lo encontrado por Krajewska y colaboradores (462).

### 6.3. Concentración $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) en la carne

Debido a la relación sinérgica del selenio y la vitamina E en la protección frente a procesos de oxidación, cabe esperar un posible efecto protector del deterioro del  $\alpha$ -tocoferol tisular, permitiendo que llegue y se acumule más en los tejidos. Pese a la trascendencia económica e

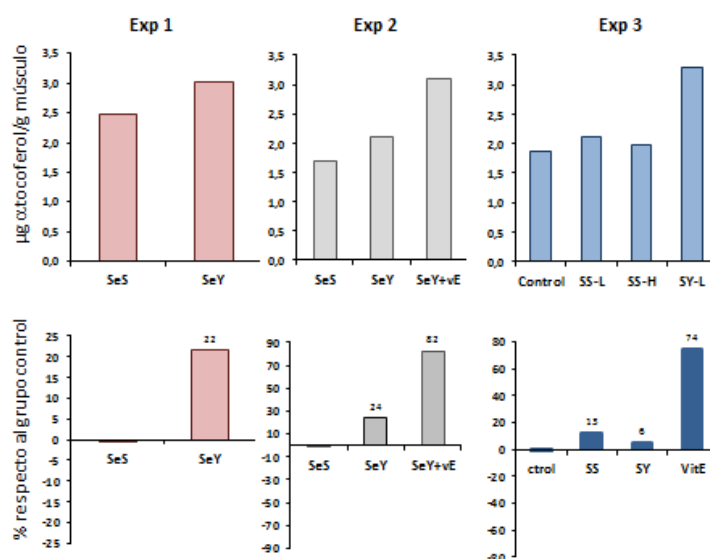
importancia científica de este posible efecto sinérgico, no existe hasta ahora información sobre este fenómeno.

En el experimento 1º se observó un tendencia hacia valores un 6 % más altos de tocoferol en el grupo de animales que recibieron selenio orgánico ( $P=0.13$  y  $P=0.11$ , al principio y final del periodo de almacenamiento refrigerado). Sin embargo, en el ensayo 2º sí se observa ya un efecto significativo, con un aumento del 24 % (1.7 vs 2.1 mg/kg de tejido) en la concentración de tocoferol en el grupo que recibió selenio orgánico respecto al que recibió selenio mineral, pese a que se les había suministrado idéntica cantidad de vitamina E en el pienso.

Finkel & Holbrook observaron una disminución en la absorción de vitamina E en animales con deficiencia de selenio y una mejora de este problema al aportar una cantidad mayor de este mineral (463).

En el experimento 3º se observa una concentración un 6-13 % mayor de vitamina E en los grupos que reciben selenio en cualquiera de sus formas respecto al grupo control. No obstante, no se encuentran diferencias entre la forma orgánica y la forma mineral de selenio. Por otra parte, el grupo que recibió suplementación de vitamina E alcanzó una concentración de tocoferol muy superior en la carne ( $P=0.0001$ ).

Existen diferencias notables entre los 3 experimentos realizados en esta Tesis doctoral respecto al tiempo de administración, dosis, época del año, dieta, etc (Tabla 10). No obstante, en conjunto puede concluirse que el selenio, especialmente en su forma orgánica, potencia la acumulación vitamina E en el tejido muscular en una cantidad próxima al 20 %. No se trata de un hecho irrelevante, ya que conseguir aumentar los niveles de vitamina E resulta muy caro y dificultoso en alimentación animal (Figura 43).

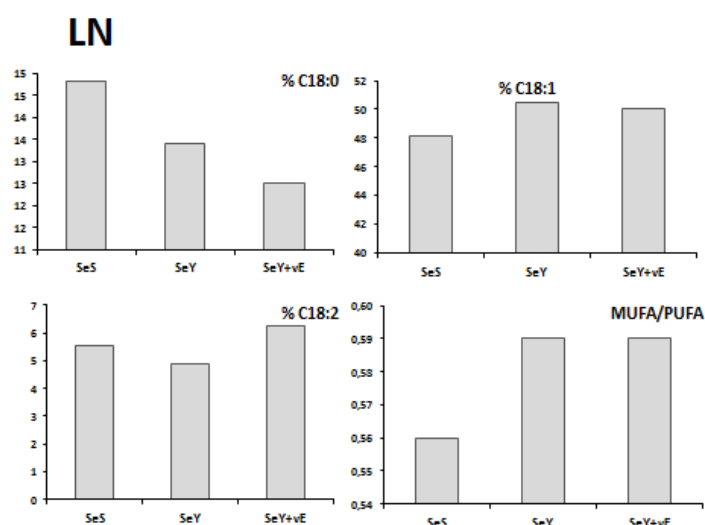


**Figura 43.** Efecto comparado del aporte de selenio orgánico en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el músculo en los distintos ensayos de esta Tesis doctoral.

Por otra parte, tal como se esperaba, la concentración de vitamina E descendió a lo largo del almacenamiento en refrigeración (Ensayo 1º y 3º Tablas 2 y 4 respectivamente). Como se señaló en la introducción de esta tesis, el tocoferol retrasa la oxidación de otros compuestos al oxidarse con mayor velocidad (464). Rey y colaboradores también observaron un descenso en la concentración de tocoferol en lonchas de jamón almacenadas durante 7 días (465). No se han observado interacciones entre el selenio y el descenso de tocoferol durante el almacenamiento.

#### 6.4. Composición de ácidos grasos y procesos lipolíticos *post-mortem*

En el ensayo 2º se ha estudiado la composición de ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros (triglicéridos), polar (fosfolípidos) y ácidos grasos libres (Artículo 2, Tablas 3, 4 y 5 respectivamente). Es interesante observar que la concentración de C18:0 (ácido esteárico) es menor en los grupos que reciben selenio orgánico respecto a los que reciben selenio mineral. Además, en la fracción de lípidos neutros y ácidos grasos libres, los grupos que reciben selenio orgánico tienen una mayor actividad  $\Delta 9$ -desaturasa ( $P < 0.05$ ) y una mayor concentración de ácido oleico (C18:1 n-9) ( $P=0.029$ ) y MUFA ( $P=0.043$ ). En la Figura 44 se puede observar la concentración de C18:0, C18:1 y C18:2, así como la relación MUFA/PUFA en los lípidos neutros de la grasa intramuscular.



**Figura 44.** Efecto del aporte de selenio orgánico en la concentración de algunos ácidos grasos mayoritarios en la fracción de los lípidos neutros de la grasa intramuscular (experimento 2º).

En la bibliografía consultada existe controversia sobre el papel que juegan la vitamina E y el selenio en la composición de ácidos grasos. Un buen número de autores no han descrito efecto alguno. Sang-Keun y colaboradores (2009) encontraron una menor concentración de C18:3n-3, C18:0 y C16:0 y mayor concentración de C16:1n-7 y C18:1n-9 en la grasa intramuscular del lomo de cerdos que consumieron un pienso enriquecido en selenio (466). En este mismo sentido, Korniluk y colaboradores (2008) señalaron que, en corderos, el aporte de un pienso con 0.2 ppm de selenio mineral produce un aumento de la actividad  $\Delta 9$  desaturasa (467). Por otra parte, Czauderna y colaboradores (2010) observaron el efecto contrario con dosis más altas de selenio (0.5 ppm) (468). Este efecto también se manifiesta en la población humana diabética con incrementos por lo que no es descartable una posible interacción como la postulada con la insulina.

En la fracción de lípidos polares no hemos observado este fenómeno, probablemente debido a la mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados y al diferente mecanismo de regulación de los lípidos de membrana. Existe poca información en la bibliografía para comparar estos resultados en los lípidos polares. Infante y colaboradores (1986) han propuesto que la vitamina E y el selenio juegan un papel regulador en la desaturación de ácidos grasos poliinsaturados del tipo n-3 y n-6 por su participación en la cadena microsomal de transporte de electrones (469). Nuenberg y colaboradores (2002) encontraron menor concentración de C18:3n-3 en formaciones membranosas celulares y una mayor concentración de C18:0 y C18:2n-6 en cerdos que consumían pienso enriquecido en selenio (470).

Además, después del sacrificio, en la carne continúan teniendo lugar una serie de procesos enzimáticos derivados de la presencia de enzimas endógenas que continúan siendo activas. Dada su relación con la estabilidad oxidativa de la carne, se decidió estudiar la producción de ácidos grasos libres. En la Figura 45 se puede observar una mayor concentración de ácidos grasos libres en los grupos que recibieron formas orgánicas de selenio respecto al que recibió forma mineral.

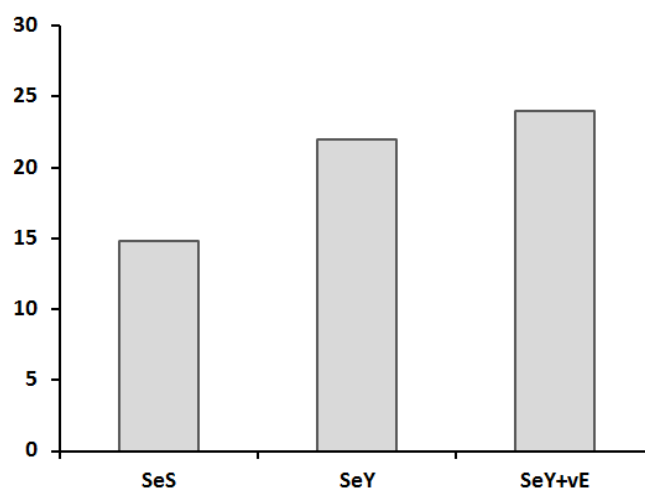
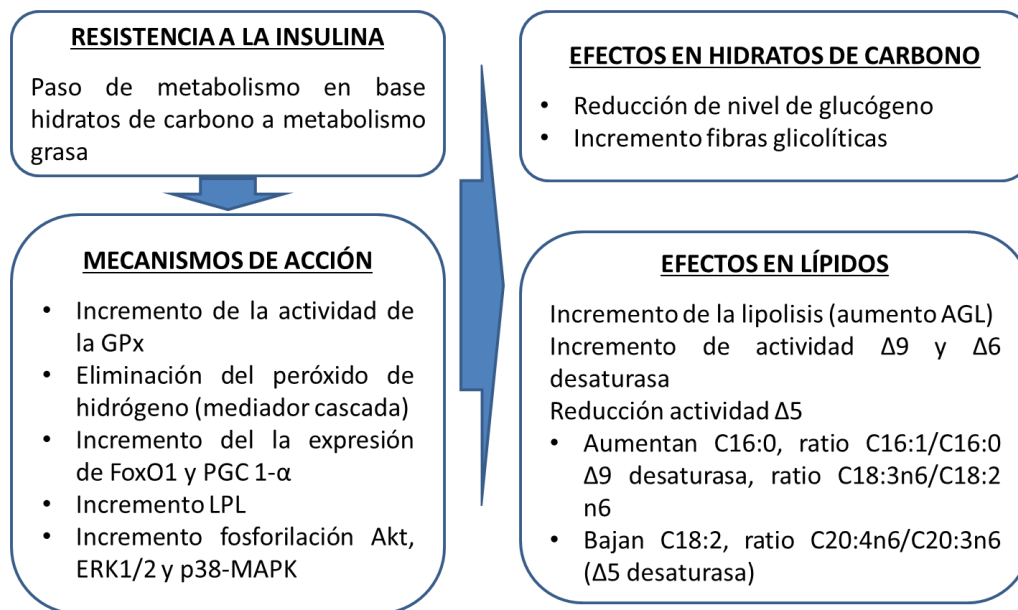


Figura 45. Efecto del aporte de selenio orgánico en la concentración de ácidos grasos libres en la grasa intramuscular (experimento 2<sup>o</sup>).

Este incremento de ácidos grasos libres parece estar relacionado con la disminución de la concentración de lípidos neutros, lo que podría indicar que la administración de selenio orgánico provoca una mayor lipólisis *post-mortem* en la carne de cerdo. Este hecho puede constituir un factor de importancia en la elaboración de productos cárnicos madurados, ya que los ácidos grasos libres son precursores de compuestos aromáticos (471). No existen evidencias científicas de este hecho hasta el momento y podría deberse a una mayor estabilidad de enzimas con actividad lipasa (posiblemente asociado al descenso de pH *post-mortem* y la posibilidad de que sufra deterioro oxidativo).

Otro posible efecto podría estar relacionado con la acción del selenio sobre la sensibilidad a la insulina (389, 472), lo que podría provocar una menor incorporación de glucosa a la célula y por tanto afectar de un modo directo a la glicólisis y gluconeogénesis, así como a otros fenómenos relacionados con el metabolismo energético tales como la lipogénesis y lipólisis.

Algunas evidencias recientes sugieren que los elementos traza, y en concreto el selenio pueden influenciar el control hormonal del metabolismo energético, afectando el estado de activación de los componentes de la cascada de activación de la insulina, imitando, potenciando e interfiriendo el metabolismo de los hidratos de carbono y lípidos (389). Las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas presentan niveles muy bajos de antioxidantes que se ven afectados por la suplementación de antioxidantes. Más aún, los niveles elevados de selenoproteínas en el músculo modulan el efecto de la insulina al estar en una fase mediado por peróxido de hidrógeno en la cadena (389). El efecto resultante de la resistencia a la insulina es un estado anterior al síndrome metabólico y a la diabetes tipo 2 con un cambio de la fuente principal energética de los glúcidos a los ácidos grasos (473, 474) (Figura 46).



**Figura 46.** Mecanismos de acción y efectos de la resistencia a la insulina (389, 475-477).

Estudios en cerdo han evidenciado efectos similares y producen una imagen próxima a los resultados encontrados en esta Tesis (389). Concretamente, se ha demostrado experimentalmente que el selenio puede modificar la expresión de genes involucrados en procesos de lipólisis (478). Más recientemente, Wang y colaboradores (2016) trabajando en ratones han puesto en evidencia que cuando se aporta una dieta rica en grasa con el objetivo de inducir resistencia a la insulina, el selenio incrementa la lipólisis *post-mortem*, mediante la activación del gen GPx1 (479).

También es interesante destacar que la combinación de selenio orgánico y dosis elevadas de vitamina E aportada en el experimento 2º produce mayor concentración de ácidos grasos libres. Koshkenbaev y colaboradores (1985) encontraron que la concentración de ácidos grasos libres de la carne se ve afectada por desequilibrios nutricionales (480). En su caso, estudiaron de modo global y sin especificar nutrientes concretos, el efecto de deficiencias de proteína y vitaminas. Otros estudios han demostrado que la suplementación con vitamina E estimula la actividad lipasa *post-mortem* (481).

## 6.5. Estatus oxidativo

En los tres ensayos realizados se ha observado una menor oxidación de la carne durante el almacenamiento. En el ensayo 1º (Artículo 1 Tabla 3) el grupo que recibió selenio orgánico alcanzó una menor concentración de malonaldehído (MDA) tras 7 días de almacenamiento que el que recibió selenio mineral ( $P = 0.0087$ ). En el ensayo 2º el grupo que recibió selenio mineral tuvo una tendencia hacia una mayor concentración de MDA a los tres días de almacenamiento ( $P = 0.0713$ ). A los 6 días existían diferencias numéricas, pero no fueron significativas (Artículo 2 Tabla 2).

Zhan y colaboradores y Li y colaboradores observaron una mayor estabilidad frente a la oxidación en la carne de cerdos que recibieron selenio orgánico (394, 412). Resultados similares se han descrito en carne de pollo (482) y de pavo (483). La selenometionina es un secuestrador de peroxinitrito, que es un producto peroxidado del óxido nítrico con gran potencial para oxidar biomoléculas (484).

En el ensayo 2º estos resultados se confirmaron también por la medida de la concentración de glutatión oxidado respecto al reducido (GSSH/GSH). La glutatión reductasa es una enzima

antioxidante selenio dependiente que mantiene el equilibrio de óxido-reducción (485). Grant, Collinson, Roe & Dawes (1996) observaron que la actividad de esta enzima en situaciones de estrés oxidativo produce un aumento en la concentración de GSH (486). En el ensayo 2 (Artículo 2 Tabla 2), puede observarse que los grupos que recibieron selenio orgánico presentaron la menor concentración de GSSH (0.4 y 0.6  $\mu\text{M/g}$ ) mientras que el grupo que recibió selenio mineral tuvo la mayor (0.9  $\mu\text{M/g}$ ).

En conjunto, estos resultados confirman que existe una mayor protección frente a la oxidación en grupos que reciben selenio orgánico.

En el ensayo 3º se determinó el estatus oxidativo mediante un procedimiento de oxidación inducida (Artículo 3 Tabla 4). Las muestras de los cerdos suplementados con vitamina E tuvieron una concentración más baja de MDA que los otros grupos experimentales en el momento inicial ( $P=0.0004$ ) y tras un periodo de incubación de 30 min ( $P=0.0001$ ), 60 min ( $P=0.0010$ ), 90 min ( $P=0.0001$ ) y 120 min ( $P=0.0001$ ). La concentración de MDA fue un 43% inferior en este grupo respecto al grupo control. En el caso de los cerdos que recibieron selenio en el pienso, la concentración de MDA se redujo un 14% respecto al grupo control. Es posible que la diferencia en la respuesta respecto a los ensayos 1º y 2º se deba al diferente procedimiento de medida utilizado (oxidación inducida). No obstante, la medida de la estabilidad oxidativa es muy variable y no es infrecuente que existan diferencias entre ensayos.

## 6.6. Color

La medida del color y el cambio durante el almacenamiento se ha llevado a cabo mediante un registro de los valores  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (color rojo),  $b^*$  (color amarillo-verdoso) y saturación cromática (chroma o intensidad de color). En el ensayo 1º el grupo de selenio orgánico tuvo valores  $a^*$  más altos en los días 1 y 7 de almacenamiento que el grupo de selenio mineral ( $P=0.006$  y  $0.011$ , respectivamente). Un resultado similar se observa en el caso del valor  $b^*$  y en la saturación cromática (Artículo 1 Tablas 4 y 5). En el experimento 2º no se observaron efectos de la dieta en los valores  $L^*$  y  $b^*$ , pero el valor  $a^*$  fue menor en los cerdos que recibieron selenio mineral (Artículo 2 Tabla 2).

Zhan y colaboradores y Bobcek y colaboradores han señalado también un efecto del selenio orgánico estabilizador del color durante el almacenamiento (394, 414). Además, es posible que el selenio mineral pueda tener cierto efecto oxidativo sobre el color (487).

En el ensayo 3º los principales efectos del color se observaron en el grupo suplementado con vitamina E (Artículo 3 Tabla 5), que mostró el valor mayor de  $a^*$  ( $P=0.032$ ),  $b^*$  ( $P=0.048$ ) e intensidad de color ( $P=0.037$ ), produciendo carne con valores de color rojo un 25 % superior y una intensidad de color un 8 % superior. Existe abundante información sobre el efecto de la vitamina E en el color, particularmente en animales rumiantes (488, 489). Sin embargo, en el ensayo 3º ni el tipo de selenio ni la dosis ejercieron efecto alguno en parámetros de color, lo que es consistente con los efectos descritos sobre el estatus oxidativo. Es posible que el tiempo de suministro pueda ser responsable en parte de este efecto. Además, es importante señalar que en general los datos disponibles en la literatura sobre el efecto del selenio en el color son poco consistentes y se pueden encontrar respuestas muy variables en la literatura. Lisiak y colaboradores no observaron efecto sobre el color (383). Juniper y colaboradores propusieron que una vez alcanzado el umbral necesario de selenio tisular, la suplementación adicional no produce ningún efecto apreciable (490). Por otra parte, la forma orgánica de selenio puede ser incorporada bien en selenoenzimas o en el lugar de metionina en otras proteínas tisulares (351). Consecuentemente, los 0.3 mg/kg de selenio orgánico que se usaron en el presente estudio, dieron una mayor intensidad de color y valores de  $a^*$  que la forma inorgánica.

## 6.7. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua es uno de los principales problemas tecnológicos de la industria de la carne y presenta distintos efectos negativos. Estos son: en primer lugar la pérdida del peso que puede ser comercial (anterior venta) o posterior durante la vida útil en bandeja (una bandeja típica pierde entre el 2 y el 3% del peso inicial), en segundo, la pérdida nutricional que se genera por el no consumo, y, finalmente el rechazo que genera en el consumidor el exudado (426, 491, 492). A parte de estos importantes efectos, la CRA, medida como pérdidas por exudado presenta una serie de efectos sobre otros caracteres de la carne como la textura, jugosidad etc. y presenta colinealidad con otros factores de calidad de la carne (Tabla 11). Su baja heredabilidad (entorno a 0.1-0.3) (493), y su correlación negativa con caracteres deseados de calidad de carne como el porcentaje magro (494) ha generado una pérdida de la CRA indirecta. Así, la mayor parte de las acciones para su control se realizan perimortem o con la alimentación. Es por esto que el mayor interés de esta tesis se ha centrado en la influencia de la alimentación con antioxidantes en el producto final.

**Tabla 11.** Correlación de variables con la pérdida por exudado

Variable	relación media revisión	Fuentes bibliográficas	Correlación máxima	Correlación mínima
Color subjetivo	-0.43	2	-0.39	-0.46
Minolta L*	0.50	3	0.74	0.33
Minolta a*	0.12	2	0.14	0.11
Minolta b*	0.44	2	0.54	0.34
Perdida cocinado	0.24	1	0.24	0.24
T <sub>45</sub> <sup>a</sup>	0.22	1	-0.52	-0.52
pH <sub>45</sub>	-0.52	1	-0.52	-0.52
pH <sub>u</sub>	-0.45	5	-0.31	-0.66
Conductividad 24 h	0.42	1	0.42	0.42
Índice glicólico in vivo	0.34	1	0.34	0.34
Índice glicolítico PM	0.43	1	0.43	0.43
Glucosa libre	0.55	1	0.55	0.55
GIM	0.17	1	0.17	0.17
WBSF	0.31	1	0.31	0.31
Terneza panel	-0.47	2	-0.3	-0.64
Jugosidad panel	-0.05	1	-0.05	-0.05
Aromas anómalos panel	0.35	1	0.35	0.35
Sabor a cerdo panel	-0.24	1	-0.24	-0.24

(495-502)

Como se puede observar en la Tabla 11 la CRA se encuentra fuertemente influida por el pH final y por el modo por el que se alcanza ese pH, viéndose por tanto fuertemente afectada por factores genéticos (índices glicolíticos), factores perimortem como el bienestar, bajada de pH, temperaturas, nutrición, sistema de aturrido etc, siendo estos frecuentemente ignorados los trabajos científicos. Los animales empleados en esta Tesis han presentado una velocidad de

descenso de pH que puede calificarse como óptima (pH a las 3 horas entre 6.4 y 6.5), una pH final adecuado, con un promedio entre 5.6-5.7. Ello supondría la clasificación de carne RFN según el protocolo propuesto por Kauffman y Cassens (57). Esto puede haber condicionado los resultados posteriores.

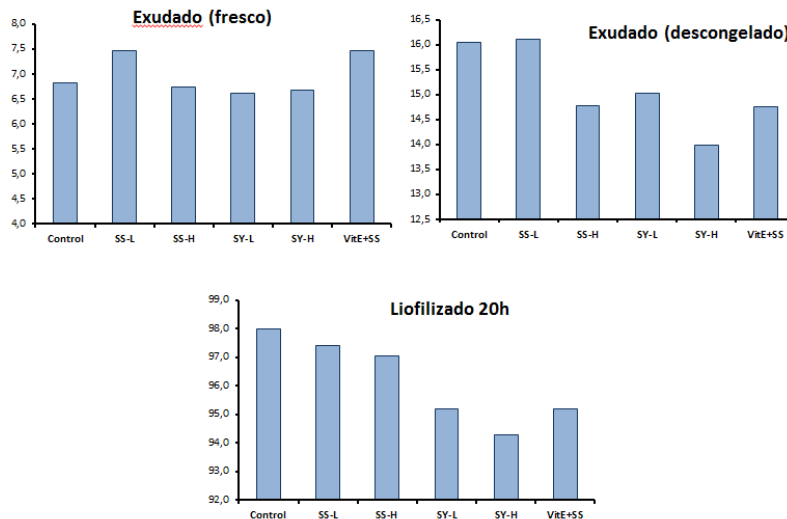
En el experimento 1º no se han observado diferencias en capacidad de retención de agua estimada mediante el método de suspensión en atmósfera saturada de agua (Artículo 1 Tabla 2). La falta de efecto del selenio orgánico contrasta con la información existente respecto a la administración de dosis elevadas de vitamina E en el pienso, que se ha mostrado efectiva para aumentar la retención de agua con claridad y de un modo generalizado. El reducido número de muestras empleado en este estudio puede ser una de las principales causas, no obstante una posible explicación de esta diferencia puede ser debida al hecho de que el tocoferol se acumula específicamente en las membranas celulares, lo que podría mejorar la integridad de las mismas en la etapa *post-mortem* y por tanto evitar la extravasación de líquidos (421). De acuerdo con este planteamiento, el selenio sería poco efectivo en la retención de agua al no ejercer su efecto antioxidante en las membranas celulares.

En este mismo ensayo se ha observado una interacción entre pH final de la carne y el tipo de selenio en el pienso en la CRA, lo que permite pensar que puede haber un efecto mediado por los procesos metabólicos que tiene lugar durante el establecimiento del rigor mortis. La capacidad de retención de agua depende del estado de acortamiento de los sarcómeros, y este a su vez de las interacciones entre la temperatura del músculo y el desarrollo del rigor (2) así como del agua y la proteína, que se ve afectada a su vez por la proteólisis que tiene lugar en el músculo *post-mortem*. En consecuencia, la velocidad de caída de pH y el descenso total del mismo, se consideran esenciales para que la carne pueda retener agua. Un pH en la proximidad del punto isoeléctrico (5.5) reduce la repulsión electrostática y minimiza por tanto el espacio entre ellos, produciendo una menor retención de líquidos (106).

Es interesante señalar que en nuestro laboratorio se ha desarrollado durante los meses en que se realizó este estudio un procedimiento de extracción de grasa intramuscular que implica extraer la mayor parte del contenido de agua por liofilización, para lo cual previamente deben congelarse las muestras (503). En el proceso de puesta a punto y contrastación se trabajó con muestras de los análisis de este experimento y se observó de modo casual que las muestras de cerdos que habían consumido selenio orgánico tenían una pérdida de agua diferente a los que habían consumido selenio mineral. No fue posible hacer un estudio sistemático de todas las muestras y por ello los resultados no se han incluido en el trabajo, pero ello sí condicionó los futuros desarrollos experimentales de esta tesis.

En el experimento 2º, cuando se analizaron las muestras por el procedimiento de suspensión en atmósfera saturada, se observó una tendencia del grupo que recibió selenio mineral hacia una menor capacidad de retención de agua. Sin embargo, en este caso además se analizaron todas las muestras por liofilización durante 72 horas y sí se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales en la cantidad de agua liberada ( $P=0.0001$ ) (Artículo 2 Tabla 2). El proceso de liofilización permite un ajuste y seguimiento mucho más preciso de los procesos de pérdida de agua, observando una menor variabilidad entre muestras, lo que permite establecer con mayor precisión diferentes respuestas entre grupos. El proceso se basa en el paso de agua desde el estado sólido al gaseoso, produciéndose éste con diferente velocidad según la estructura muscular y el grado de vinculación del agua.

En el experimento 3º, nuevamente se observa un efecto marcado del selenio orgánico en la evolución de la pérdida de agua durante la liofilización. Durante el proceso de liofilización se encontraron diferencias entre grupos tras 20 ( $P=0.009$ ), 40 ( $P=0.037$ ) y 60 ( $P=0.045$ ) horas de liofilizado. Se puede observar que en los momento iniciales los grupos que recibieron selenio orgánico perdían menos agua (menor proporción a las 20 horas,  $P=0.027$ ). La menor pérdida se produjo en el grupo que recibió selenio orgánico a la dosis más alta (Figura 47).



**Figura 47.** Efecto del aporte de dos dosis (L, baja; H alta) de selenio mineral (selenito sódico, SS) o orgánico en base levadura (SY) y de vitamina E en la pérdida de exudado de la carne en fresco, tras descongelación o tras 20 horas de liofilización (experimento 3º).

La información disponible sobre el efecto del selenio orgánico en la capacidad de retención de agua es heterogénea. Algunos autores han descrito un aumento en la capacidad de retención de agua respecto a la forma mineral (380, 383, 394, 412), aunque otros no han encontrado efecto alguno (414, 504). Castro-Rios y colaboradores emplearon 0.3 ppm de selenio analizando únicamente las pérdidas en cocinado (504). Bobcek empleó únicamente SeY en concentración media (0.18) y alta (0.48) observando también tendencia a menor merma (414). Por otro lado, Li y colaboradores utilizaron tres dosis de selenio orgánico (0, 0.3, and 3.0 mg Se/kg) y encontraron menor pérdida de exudado en carne de cerdos que recibieron pienso suplementado con 3.0 mg/kg, mientras que el grupo que recibió 0.3 mg/kg obtuvo resultados intermedios que no llegaron a ser significativamente diferentes a la de los cerdos no suplementados (412). Otros experimentos que también observaron efecto en la capacidad de retención de agua usaron concentraciones de formas orgánicas de selenio entre 0.4-0.5 mg/kg (383) o de 0.3 mg/kg con un tiempo de suplementación de al menos 40 días (394). Mahan y colaboradores alimentaron a cerdos desde los 55 hasta los 105 kg con pienso enriquecido en selenio orgánico (0.3 mg/kg) y observaron menor pérdida de líquidos que cuando se administraron formas minerales (380).

Los datos disponibles parecen indicar que se puede descartar un efecto del selenio en la capacidad de retención de agua. En este sentido, la hipótesis que relaciona el papel protector de la integridad de las membranas celulares en la capacidad de retención de agua ha sido cuestionada recientemente, proponiéndose que el efecto clave de actuación se relaciona con la preservación de la actividad proteolítica, al proteger a la calpaína de la oxidación (54, 149). Así la calpaína no oxidada proteoliza proteínas citoesqueléticas clave, como la desmina, relacionadas con la CRA (54). Estas proteínas se ven lisadas en fases tempranas de 45 min a 6 horas tras el sacrificio. La degradación de las mismas permite al agua que se expele del espacio intramiofibrillar se quede dentro del sarcolema por un período mayor. La rotura de estas proteínas está mediada por la actividad de la calpaína. Así pues si la actividad de la calpaína o su activación se ven incrementadas, los filamentos intermedios serán degradados en una mayor proporción y menos sarcoplasma se extravasará. Esta hipótesis coincide con los resultados expuestos en el experimento 3º en el que se asoció una mayor capacidad de retención de agua con una mayor proteólisis con la suplementación de selenio orgánico (457). Por otra parte, teniendo en cuenta el potencial incremento de la resistencia a la insulina que puede ejercer el selenio orgánico, se ha revisado la bibliografía existente y nuestros propios

datos experimentales, con el objetivo de encontrar evidencias que permitan suponer que existe un efecto del selenio en el pH muscular. En la Figura 48 se muestran datos de algunos trabajos que describieron un descenso más moderado en la carne de cerdos que recibieron selenio orgánico en el pienso. No obstante, es preciso indicar que este efecto no ha sido significativo en ninguno de estos estudios, aunque también es necesario enfatizar que el número de animales experimentales y el diseño experimental no permitían establecer diferencias en un parámetro tan variable como es el pH en los momentos iniciales tras el sacrificio (Figura 48). En el estudio 3º se realizó la medida del pH encontrándose valores más altos de pH a las tres horas del sacrificio en los animales suplementados con selenio orgánico y antioxidantes (Figura 49) (457).

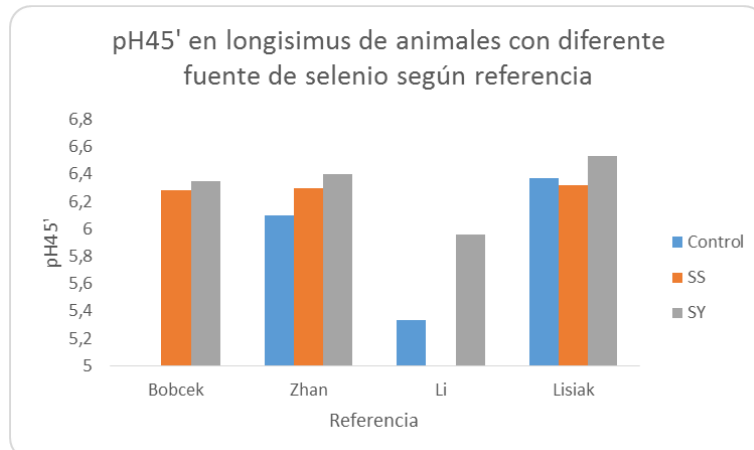


Figura 48. pH<sub>45'</sub> en distintas referencias de cerdos suplementados con SeY (383, 394, 412, 414).

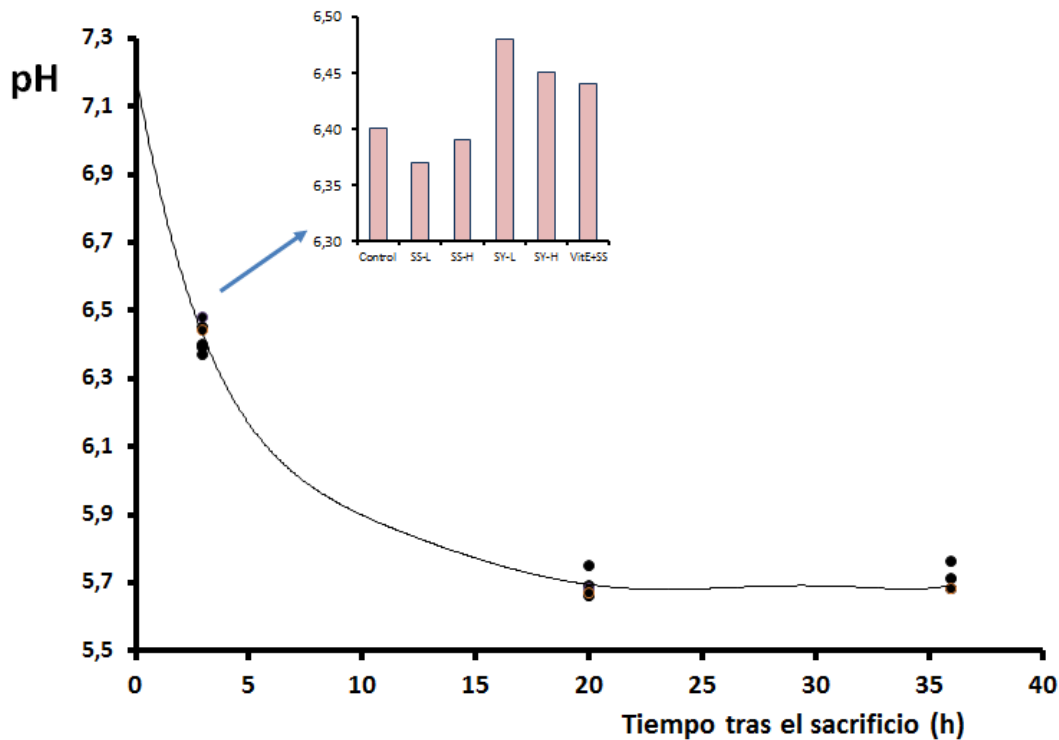
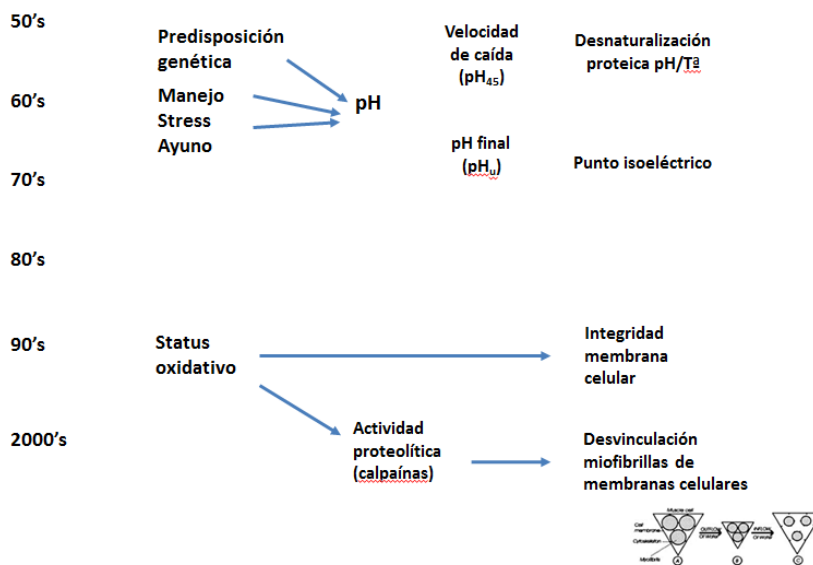


Figura 49. Curva de caída de pH tras el sacrificio en los animales del ensayo 3º y representación gráfica de los grupos experimentales que permite observar un pH más elevado en los grupos que recibieron selenio en forma orgánica respecto a las formas minerales (457)

## 6.8. Proteólisis

En la Figura 50 se muestra una visión global de los principales factores que condicionan la CRA de la carne y la evolución temporal de las hipótesis formuladas para explicar los posibles mecanismos de actuación. Aunque resulta incuestionable la importancia del pH final y la velocidad de descenso tras el sacrificio, es evidente que existen otras variables que provocan cambios marcados en la CRA, entre los que destaca el estatus oxidativo del músculo *post-mortem*. Aunque el mecanismo de acción de la vitamina E se relacionó inicialmente con la integridad de las membranas celulares, otros factores como el mantenimiento de la actividad proteolítica de algunas enzimas claves en los procesos iniciales pueden jugar un papel esencial.



**Figura 50.** Diferentes hipótesis planteadas a lo largo de los años para explicar los factores de variación en la capacidad de retención del agua de la carne.

El patrón de las proteínas miofibrilares se presenta en el Artículo 3 Figura 1. Los perfiles electroforéticos se ven afectados por la dieta suplementada y el tiempo de almacenamiento. Éste afecta principalmente a la troponina T, tropomiosina y la banda de 150kDa que desaparecen parcialmente a los 7 días de almacenamiento. Otros autores encuentran efectos similares para el tiempo de almacenamiento en carne de vacuno y ovino (505, 506). Martinaud y colaboradores (505) también encontraron un efecto concomitante con la aparición de una banda a 30kDa que se considera vinculada al índice de proteólisis. No obstante, al igual que Santé-Lhoutellier y colaboradores, no detectamos esta banda (506).

El principal efecto observado entre tratamientos fue un mayor decrecimiento en las bandas de MLC2 (cadena ligera de la miosina 2), Tn-I (troponina I), tropomiosina y Tn-T (troponina T) en los grupos control y SS-L tras 7 días de almacenamiento refrigerado comparado con los otros grupos. Esto se acompañó con una disminución menor de la banda a 150kDa comparada con los grupos SS-H, SY-L, SY-H y VITE + SS tras los mismos días de almacenamiento. La desaparición de las bandas de miosina, troponina y tropomiosina puede corresponderse con procesos oxidativos. Así pues, tanto el enriquecimiento de la dieta con selenio orgánico, como con selenito en alta concentración y con vitamina E con selenito ejerció un efecto importante en las proteínas miofibrilares en este estudio. También es evidente la presencia de bandas a 98 y 105 kDa, a los 2 días de almacenamiento en los tratamientos SY-L, SY-H y VITE-SS.

El efecto de la suplementación con vitamina E en las bandas de miosina y tropomiosina ha sido previamente descrito (507); no obstante, no existen estudios que hayan investigado este efecto con selenio.

También se presentan un número mayor de bandas entre las bandas de tropomiosina y Tn-I (troponina I) en el grupo VITE+SS, que puede ser el resultado de la fragmentación de la tropomiosina o puede ser un indicador de menores pérdidas debidas a la oxidación, dado el carácter antioxidante de esta dieta. Aksu, Aktas, Kaya & Macit también encontraron un efecto similar sobre las proteínas miofibrilares con la suplementación de vitamina E a 45mg/día durante 75 días en cordero (507). Servais, Letexier, Favier, Duchamp & Desplanches encontraron una menor tasa de proteólisis, mediante la reducción de la expresión de calpaínas, las caspasas -3 -9 y -12 y ligandos de la ubiquitina (508). Las calpaínas son cistein proteasas que fragmentan la titina y nebulina cerca del disco Z (132). Así, el sistema de la calpaína juega un papel importante regulando la proteólisis de proteínas en condiciones *post-mortem* (133). En el grupo SeY-H se generaron nuevas bandas adicionales entre la MLC-1 (cadena ligera de la miosina 1) y la Tn-C (troponina C) y entre la MLC2 y MLC3 (cadena ligera de la miosina 2 y 3) tras 7 días de almacenamiento, pero no en el resto de grupos. Estos compuestos pueden generarse de la descomposición de las cadenas de miosina y troponina y pueden ser indicadores de una mayor actividad proteolítica en este grupo.

El contenido en amino ácidos libres en carne de cerdo puede verse en el artículo 3 Tablas 7 y 8. Como era esperable, el contenido en amino ácidos libres se incrementó con la maduración de la carne y fue debido a la acción de aminopeptidasas (130). El grupo suplementado con vitamina E y SS tuvo el menor contenido de serina (SER) ( $P=0.011$ ) y anserina (ANS) ( $P=0.009$ ) a los 7 días comparado con los otros grupos. El grupo suplementado con VITE+SS presentaba una mayor cantidad de aminoácidos esenciales comparado con los restantes. Así, la prolina (PRO) ( $P=0.0001$ ), triptófano (TRP) ( $P=0.0063$ ) y fenilalanina (PHE) ( $P=0.0062$ ) a los 2 y 7 días ( $P=0.0001$ ;  $P=0.0001$  y  $P=0.0004$  respectivamente) fueron superiores en cerdos suplementados con VITE +SS comparado con las restantes alimentaciones. Estos amino ácidos libres (PRO, PHE y TRP) también se mantuvieron más bajos independientemente de la fuente de selenio o dosis, indicando su posible origen en la suplementación con vitamina E. Este fenómeno no ha sido descrito anteriormente. Dado el mayor poder antioxidante del grupo VITE+SS encontrado en el presente estudio en la menor producción de MDA, cambios en el color y cambios en las proteínas miofibrilares, este efecto puede deberse a la mayor protección de la vitamina E frente a la oxidación proteica (509). Esta actividad antioxidante también permitiría mantener la actividad de la calpaína *post-mortem* incrementando la proteólisis de los filamentos en la carne.

La fuente de selenio también afectó el perfil de amino ácidos libres de la carne. Así, la carne de animales suplementados con selenio orgánico presentó mayores niveles de glicina (GLY) y carnosina (CAR) en el día 2 y alanina (ALA) ( $P=0.078$ ), taurina (TAU) ( $P=0.098$ ) y anserina (ANS) ( $P=0.051$ ) a los 7 días de madurado, comparado con el selenito sódico. Niveles superiores de CAR en carne se han asociado con mayor calidad de carne (510), encontrándose más concentración en músculos glicolíticos (511).

El efecto de la dosis se observó únicamente en el contenido en ALA que se incrementó con la misma ( $P=0.036$ ). Más aún, incrementos en la dosis de Se resultan en mayores niveles de SER ( $P=0.027$  y  $P=0.026$  a los 2 y 7 días respectivamente), ANS ( $P=0.0005$  y  $P=0.012$  a los 2 y 7 días respectivamente) y CAR ( $P=0.016$  a los 2 días) comparados con la suplementación con vitamina E. Como se ha informado anteriormente, no existe información sobre el efecto de la fuente de Selenio o dosis en la proteólisis. La carnosina es un importante dipéptido natural soluble en agua que puede contribuir a la inactivación de los catalizadores de oxidación lipídica y radicales libres en el sarcoplasma (512), regulando también el mecanismo de liberación del calcio y la homeostasis (513).

El diferente efecto en la proteólisis según la fuente utilizada del selenio debe ser destacado en la medida que una mayor proteólisis puede ser en parte responsable del incremento de la CRA. De esta manera Kristensen y Purslow (329) propusieron que el aumento de la CRA durante el almacenamiento de la carne se debía a la degradación de las proteínas citoesqueléticas. Más aún encontraron que la salida de exudado está inversamente relacionado con la rotura de

proteínas citoesqueléticas con el tiempo. En esta línea Lonergan & Lonergan (54) reportaron que la degradación de proteínas como la desmina, talina y vinculina en las primeras horas *post-mortem* permite al agua expelida del espacio intramiofibrilar quedarse dentro del sarcolema al librar a este de la reducción concomitante a la formación de la actomiosina. Los resultados de nuestro estudio concuerdan con esta hipótesis que otorga a la carne con mayor degradación de filamentos intermedios una reducción del agua expelida a los canales de merma así como una menor formación de estos mismos. Otros estudios, no obstante han mostrado que la degradación de proteínas no está siempre asociada con incrementos de la CRA del cerdo (89, 319).

Por otro lado, dado que estas proteínas son sustratos de las calpaínas, que se encuentran directamente relacionadas en la regulación de la proteólisis y dado que se ha reportado que se produce una menor expresión de calpaínas en grupos suplementados con vitamina E (508), una mayor pérdida por exudado podría esperarse de cerdos que reciben dieta suplementada con vitamina E. Sin embargo, también hay referencias de que la oxidación proteica reduce la funcionalidad de las calpaínas, aspecto por lo que esta resultaría protectora del estado de las enzimas. Este posible doble efecto descrito para la vitamina E inhibiendo la oxidación y la calpaína y su expresión, puede ser la causa del efecto intermedio observado para la pérdida de agua en este estudio. El efecto de mayor nivel de amino ácidos esenciales libres es desconocido. Estas diferencias en la proteólisis que se encuentra en las referencias de suplementación puede justificar la controversia encontrada. De cualquier manera existen numerosos factores que pueden afectar al sistema calpaína que deben ser tomados en consideración, debiendo incrementarse la investigación para confirmar los efectos expuestos. Para confirmar el efecto del selenio en la proteólisis, empleamos el índice de fragmentación miofibrilar (MFI) (Artículo 3 Tabla 9). En el día 2 de almacenamiento el MFI no se vio modificado por el tratamiento nutricional. A los 8 días tampoco se vio afectado estadísticamente, no obstante SeY y VITE+SS presentaban los mayores niveles de MFI ( $P=0.147$  y  $P=0.125$  respectivamente). El incremento del MFI con el tiempo ha sido previamente descrito (514), ya que existe una relación entre proteólisis y valor MFI (102, 176). Estos resultados confirmarían los resultados de oxidación de proteínas miofibrilares y contenido en amino ácidos libres descrito anteriormente. Así pues, la carne de grupos suplementados con SeY y VitE+SS presenta una mayor proteólisis que justificaría las pérdidas de agua menores o intermedias encontradas en estos grupos.



## 7. Conclusiones

La incorporación de selenio orgánico a dosis de 0.3-0.4 mg/kg en el pienso de cerdos en finalizado durante 9-10 semanas:

1. Mejora el estatus oxidativo de la carne y por tanto la vida útil, respecto a la carne de cerdos que reciben iguales dosis de formas minerales.
2. Produce cambios en el color de la carne, con especial relevancia en el valor  $a^*$  (color rojo), que ofrece valores más altos.
3. Produce una mayor concentración de este mineral en la carne que el aporte de formas inorgánicas.
4. Aumenta la actividad de la enzima  $\Delta 9$ -desaturasa de ácidos grasos, por lo que la concentración de C18:1n-9 y C16:1 n-7 es mayor en los tejidos y en consecuencia la concentración de C18:0 es menor.
5. Produce una mayor actividad lipolítica *post-mortem* y aumenta la concentración de ácidos grasos libres en los tejidos. La combinación de selenio orgánico y altas dosis de vitamina E incrementa este efecto.

La administración de selenio orgánico a dosis de 0.2 o 0.4 mg/kg durante 4 semanas:

6. No produce efecto en el estatus oxidativo o parámetros del color en la carne.
7. Aumenta la capacidad de retención de agua y la actividad proteolítica muscular *post-mortem*.
8. Estos resultados confirman la relación entre los fenómenos proteolíticos *post-mortem* y la capacidad de retención de agua de la carne.

La pérdida de agua durante el proceso de liofilización permite seguir los procesos en pocas horas o minutos tras el sacrificio, obteniendo datos con precisión y con menos variabilidad que los procedimientos convencionales (pérdida de peso de la canal, pérdida de peso de la carne almacenada en atmósfera saturada, etc), lo que puede ser un método de utilidad práctica en estudios de calidad de la carne.



## 8. Referencias

1. Apple JK. Effects of nutritional modifications on the water-holding capacity of fresh pork: a review. *J Anim Breed Genet.* 2007;124:43-58.
2. Fischer K. Drip loss in pork: influencing factors and relation to further meat quality traits. *J Anim Breed Genet.* 2007;124:12-8.
3. Scanga J, McKeith F, Savell J, Belk K, Griffin D, Wright L, et al. Benchmarking value in the pork supply chain: quantitative strategies and opportunities to improve quality. Final report to the National Pork Board by Colorado State University, University of Illinois at Urbana, Texas A&M University, and Iowa State University to the American Meat Science Association, Savoy, IL. 2003.
4. Stetzer A, McKeith F. Benchmarking value in the pork supply chain: Quantitative strategies and opportunities to improve quality Phase 1. American Meat Science Association, Savoy. 2003.
5. Savage AWJ, Warriss PD, Jolley PD. The amount and composition of the proteins in drip from stored pig meat. *Meat Science.* 1990;27(4):289-303.
6. Who. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases - Introduction. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Who Technical Report Series. 916. Geneva: World Health Organization; 2003. p. 1-149.
7. Rodríguez Negre L, Ben Kaabia M. Análisis del comportamiento de consumo de carnes en los hogares españoles.
8. Aiello LC. Brains and guts in human evolution: the expensive tissue hypothesis. *Brazilian Journal of Genetics.* 1997;20.
9. Abitbol MM. Lateral view of *Australopithecus-afarensis* - primitive aspects of bipedal positional behavior in the earliest hominids. *J Hum Evol.* 1995;28(3):211-29.
10. Wang WJ, Crompton R. The role of load-carrying in the evolution of modern body proportions. *Journal of Anatomy.* 2004;204(5):417-30.
11. Mann N. Meat in the human diet: An anthropological perspective. *Nutrition & Dietetics.* 2007;64(s4):S102-S7.
12. Foodagri C, Session F. *codex alimentarius* commission. 2005.
13. de Castro Cardoso Pereira PM, dos Reis Baltazar Vicente AF. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science.* 2013;93(3):586-92.
14. DE CAPA B. La carne de cerdo.
15. Organization WH. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control: a guide for programme managers. 2001.
16. Lombardi-Boccia G, Martinez-Dominguez B, Aguzzi A, Rincon-Leon F. Optimization of heme iron analysis in raw and cooked red meat. *Food Chemistry.* 2002;78(4):505-10.
17. Geissler C, Singh M. Iron, Meat and Health. *Nutrients.* 2011;3(3):283-316.
18. Surai PF. Selenium in nutrition and health: Nottingham University Press Nottingham; 2006.
19. Allen LH. Causes of vitamin B-12 and folate deficiency. *Food Nutr Bull.* 2008;29(2):S20-S34.
20. Qiao L, Feng Y. Intakes of heme iron and zinc and colorectal cancer incidence: a meta-analysis of prospective studies. *Cancer Causes & Control.* 2013;24(6):1175-83.
21. Balder HF, de Vogel J, Jansen M, Weijenberg MP, van den Brandt PA, Westenbrink S, et al. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2006;15(4):717-25.

22. Olivares A, Daza A, Rey A, Lopez-Bote C. Interactions between genotype, dietary fat saturation and vitamin A concentration on intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. *Meat Science*. 2009;82(1):6-12.
23. Rey A, Daza A, López-Carrasco C, López-Bote C. Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in *Longissimus dorsi* muscle and backfat. *Meat science*. 2006;73(1):66-74.
24. Jimenez-Colmenero F, Pintado T, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Bastida S. Production variations of nutritional composition of commercial meat products. *Food Res Int*. 2010;43(10):2378-84.
25. FAO. Consumo de carne. 2016.
26. Ambiente MdAAyM. Informe del consumo de alimentación en España. 2015.
27. Cancer IAfRo. IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. World Health Organization Retrieved ([https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf)). 2015.
28. Mili S, Mahlau M, Furitsch H. Meat products consumption habits and demand in Spain. *Revista Espanola de Economia Agraria (Espana)*. 1998.
29. Patterson KY, Trainer D, Holden JM, Howe JC, Buege DR, Williams JR, et al. USDA nutrient data set for fresh pork (from SR), Release 2.0. Beltsville (MD): Agricultural Research Service/USDA. 2009.
30. Reid J, editor Food and nutrition guidelines for healthy adolescents. PROCEEDINGS-NUTRITION SOCIETY OF NEW ZEALAND; 1993: NUTRITION SOCIETY OF NEW ZEALAND.
31. Health NZMo, McIntyre L, Dutton M. Eating and Activity Guidelines for New Zealand Adults: New Zealand Government - Ministry of Health; 2015.
32. Higgs JD. The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. *Trends in Food Science & Technology*. 2000;11(3):85-95.
33. Forero Vizcaíno JMB, Rafael; Fernández Batanero, Juan Ángel; Guerra González, Manuel; Domínguez Sánchez, Gilberto; Pavón Domínguez, José Antonio. *El Jabugo*. 2009.
34. MAGRAMA SGG. El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales indicadores económicos en 2015. 2015.
35. (JRCIPTS) D-GfAaRDatJRCsIfPTS. EU agricultural outlook. Prospects for EU agricultural markets and income 2015-2025. 2015.
36. Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*. 2006;74(1):44-58.
37. Bendall JR. The shortening of rabbit muscles during rigor mortis - its relation to the breakdown of adenosine triphosphate and creatine phosphate and to muscular contraction. *J Physiol-London*. 1951;114(1-2):71-88.
38. Batesmith EC, Bendall JR. Factors determining the time course of rigor mortis. *J Physiol-London*. 1949;110(1-2):47-65.
39. Hansen BF, Derave W, Jensen P, Richter EA. No limiting role for glycogenin in determining maximal attainable glycogen levels in rat skeletal muscle. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2000;278(3):E398-E404.
40. Rosenvold K, Laerke HN, Jensen SK, Karlsson AH, Lundstrom K, Andersen HJ. Manipulation of critical quality indicators and attributes in pork through vitamin E supplementation, muscle glycogen reducing finishing feeding and pre-slaughter stress. *Meat Science*. 2002;62(4):485-96.
41. Graham T, Adamo K, Shearer J, Marchand I, Saltin B. Pro-and macroglycogenolysis: relationship with exercise intensity and duration. *Journal of Applied Physiology*. 2001;90(3):873-9.

42. Graham TE, Adamo KB. Dietary carbohydrate and its effects on metabolism and substrate stores in sedentary and active individuals. *Can J Appl Physiol-Rev Can Physiol Appl*. 1999;24(5):393-415.
43. Rosenvold K, Andersen HJ. Factors of significance, for pork quality - a review. *Meat Science*. 2003;64(3):219-37.
44. Wallimann T, Schlosser T, Eppenberger HM. Function of the M-line-bound creatine-kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the Phosphorylcreatine shuttle in muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1984;259(8):5238-46.
45. van de Wiel DFM, Zhang WL. Identification of pork quality parameters by proteomics. *Meat Science*. 2007;77(1):46-54.
46. Costa LN, Lo Fiego DP, Dall'Olio S, Davoli R, Russo V. Influence of loading method and stocking density during transport on meat and dry-cured ham quality in pigs with different halothane genotypes. *Meat Science*. 1999;51(4):391-9.
47. Sayre RN, Kiernat B, Briskey EJ. Processing characteristics of porcine muscle related to pH + temperature during rigor mortis development + to gross morphology 24 hr post-mortem. *Journal of Food Science*. 1964;29(2):175-&.
48. Weber HH, Meyer K. Colloidal behaviour of muscle proteins bodies. V. Announcement: The percentage quantity of muscle proteins and its significance for the structure of skeletal rabbit muscle. *Biochemische Zeitschrift*. 1933;266:137-52.
49. Lawrie R, Ledward D. *Lawrie's meat science*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. 2006.
50. Honikel KO, Reagan JO. Influence of different chilling conditions on hot-boned pork. *Journal of Food Science*. 1986;51(3):766-&.
51. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):3.
52. Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(8):657-63.
53. Martin S, Reutelingsperger C, McGahon AJ, Rader JA, Van Schie R, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(5):1545-56.
54. Huff-Lonergan E, Lonergan SM. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*. 2005;71(1):194-204.
55. Warriss PD. *Meat Science: An Introductory Text*: CABI Pub.; 2000.
56. Gispert M, Faucitano L, Oliver MA, Guardia MD, Coll C, Siggins K, et al. A survey of pre-slaughter conditions, halothane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Science*. 2000;55(1):97-106.
57. Kauffman R, Cassens R, Scherer A, Meeker D. Variations in pork quality: history, definition, extent, resolution. *Swine health and production: the official journal of the American Association of Swine Practitioners (USA)*. 1993.
58. Kim CJ, Honikel KO, Hamm R. Changes in pork muscle after slaughter and their effect on the water-binding capacity of meat and muscle homogenates. 2. Experiments at temperatures of 0-degrees-C to 35 degrees-C. *Fleischwirtschaft*. 1985;65(5):645-9.
59. Bendall JR, Swatland HJ. A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Science*. 1988;24(2):85-126.
60. Scheffler TL, Scheffler JM, Kasten SC, Sosnicki AA, Gerrard DE. High glycolytic potential does not predict low ultimate pH in pork. *Meat Science*. 2013;95(1):85-91.
61. Muchenje V, Dzama K, Chimonyo M, Strydom PE, Hugo A, Raats JG. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. *Food Chemistry*. 2009;112(2):279-89.

62. Panella-Riera N, Velarde A, Dalmau A, Fabrega E, Furnols MFI, Gispert M, et al. Effect of magnesium sulphate and L-tryptophan and genotype on the feed intake, behaviour and meat quality of pigs. *Livestock Science*. 2009;124(1-3):277-87.
63. Dokmanovic M, Baltic MZ, Duric J, Ivanovic J, Popovic L, Todorovic M, et al. Correlations among Stress Parameters, Meat and Carcass Quality Parameters in Pigs. *Asian Australas J Anim Sci*. 2015;28(3):435-41.
64. Hambrecht E, Eissen JJ, Newman DJ, Smits CHM, den Hartog LA, Verstegen MWA. Negative effects of stress immediately before slaughter on pork quality are aggravated by suboptimal transport and lairage conditions. *J Anim Sci*. 2005;83(2):440-8.
65. Hambrecht E, Eissen JJ, Nooijen RJJ, Ducro BJ, Smits CHM, den Hartog LA, et al. Preslaughter stress and muscle energy largely determine pork quality at two commercial processing plants. *J Anim Sci*. 2004;82(5):1401-9.
66. Hambrecht E, Eissen JJ, Newman DJ, Smits CHM, Verstegen MWA, den Hartog LA. Preslaughter handling effects on pork quality and glycolytic potential in two muscles differing in fiber type composition. *J Anim Sci*. 2005;83(4):900-7.
67. Muchenje V, Ndou SP. How pig pre-slaughter welfare affects pork quality and the pig industry. News and Industry Article, South African Pork Producers Organization (SAPPO). 2011.
68. Dokmanovic M, Velarde A, Tomovic V, Glamoclija N, Markovic R, Janjic J, et al. The effects of lairage time and handling procedure prior to slaughter on stress and meat quality parameters in pigs. *Meat Science*. 2014;98(2):220-6.
69. Guardia MD, Estany J, Balasch S, Oliver MA, Gispert M, Diestre A. Risk assessment of PSE condition due to pre-slaughter conditions and RYR1 gene in pigs. *Meat Science*. 2004;67(3):471-8.
70. Van de Perre V, Ceustermans A, Leyten J, Geers R. The prevalence of PSE characteristics in pork and cooked ham - Effects of season and lairage time. *Meat Science*. 2010;86(2):391-7.
71. Troeger K, Woltersdorf W. Electrical stunning and meat quality in the pig. *Fleischwirtschaft*. 1990;70(8):901-4.
72. Solomon M, Dunn M. Simultaneous histochemical determination of three fiber types in single sections of ovine, bovine and porcine skeletal muscle. *J Anim Sci*. 1988;66(1):255-64.
73. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *New England Journal of Medicine*. 1990;322(4):223-8.
74. Adzitey F, Nurul H. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: Causes and measures to reduce these incidences—a mini review. *International Food Research Journal*. 2011;18(1):11-20.
75. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. Basingstoke: W.H. Freeman; 2012.
76. Koeslag JH, Saunders PT, Terblanche E. A reappraisal of the blood glucose homeostat which comprehensively explains the type 2 diabetes mellitus–syndrome X complex. *The Journal of physiology*. 2003;549(2):333-46.
77. Mueller AS, Mueller K, Wolf NM, Pallauf J. Selenium and diabetes: an enigma? *Free Radical Research*. 2009;43(11):1029-59.
78. Van Obberghen E, Baron V, Delahaye L, Emanuelli B, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, et al. Surfing the insulin signaling web. *Eur J Clin Invest*. 2001;31(11):966-77.
79. Kim Y-B, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(6):733-41.
80. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology*. 2001;3(11):1014-9.

81. Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez JR. Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;302(2):128-39.
82. Lonergan EH, Zhang W, Lonergan SM. Biochemistry of postmortem muscle—Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat science*. 2010;86(1):184-95.
83. Koochmaraie M, Kent MP, Shackelford SD, Veiseth E, Wheeler TL. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Science*. 2002;62(3):345-52.
84. Nishimura T, Fang S, Wakamatsu J, Takahashi K. Relationships between physical and structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of raw pork. *Anim Sci J*. 2009;80(1):85-90.
85. McCormick RJ. The flexibility of the collagen compartment of muscle. *Meat Science*. 1994;36(1-2):79-91.
86. Pearce KL, Rosenvold K, Andersen HJ, Hopkins DL. 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 Science*. 2011;89(2):111-24.
87. Walls EW. The microanatomy of muscle. . 1960;1(Structure and Function 0/ Muscle. Vol. 1. ).
88. Gobert M, Sayd T, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. Application to proteomics to understand and modify meat quality. *Meat science*. 2014;98(3):539-43.
89. Lawson MA. The role of integrin degradation in post-mortem drip loss in pork. *Meat Science*. 2004;68(4):559-66.
90. Taylor TW, Goto Y, Hata K, Takasago T, Saeki A, Nishioka T, et al. Cardiac quick-release contraction mechanoenergetics analysis using a cardiac-muscle cross-bridge model. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol*. 1995;268(6):H2544-H52.
91. Taylor RG, Geesink G, Thompson V, Koochmaraie M, Goll D. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J Anim Sci*. 1995;73(5):1351-67.
92. Gardner M, Huff-Lonergan E, Lonergan S, editors. Prediction of fresh pork quality using indicators of protein degradation and calpain activation. *Proceedings, 51st international congress of meat science and technology; 2005*.
93. Crick FH, editor *On protein synthesis*. Symp Soc Exp Biol; 1958.
94. Heysood S, Rich A. In vitro synthesis of native myosin, actin, and tropomyosin from embryonic chick polyribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1968;59(2):590-7.
95. Vary TC, Lynch CJ. Nutrient signaling components controlling protein synthesis in striated muscle. *The Journal of nutrition*. 2007;137(8):1835-43.
96. Nishimura T, Hattori A, Takahashi K. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: effect of marbling on beef tenderization. *J Anim Sci*. 1999;77(1):93-104.
97. Nishimura T. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Anim Sci J*. 2010;81(1):21-7.
98. Bachmann P. Motility, linear arrangement and cell-to-cell contact of myogenic cells prior to fusion. *Cell and tissue research*. 1980;206(3):431-40.
99. Colley N, Tokuyasu K, Singer S. The early expression of myofibrillar proteins in round postmitotic myoblasts of embryonic skeletal muscle. *Journal of cell science*. 1990;95(1):11-22.
100. Brameld JM, Buttery PJ, Dawson JM, Harper JM. Nutritional and hormonal control of skeletal-muscle cell growth and differentiation. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1998;57(02):207-17.
101. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models and Mechanisms*. 2013;6(1):25-39.
102. Kristensen L, Therkildsen M, Riis B, Sorensen MT, Oksbjerg N, Purslow PP, et al. Dietary-induced changes of muscle growth rate in pigs: Effects on in vivo and postmortem muscle proteolysis and meat quality. *J Anim Sci*. 2002;80(11):2862-71.

103. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*. 2009;37(1):1-17.
104. Emmans G, Kyriazakis I. Issues arising from genetic selection for growth and body composition characteristics in poultry and pigs. *BSAS Occasional Publication*. 2000:39-52.
105. Garssen GJ, Geesink GH, Hovingbolink AH, Verplanke JC. Effects of dietary clenbuterol and salbutamol on meat quality in veal calves. *Meat Science*. 1995;40(3):337-50.
106. den Hertog-Meischke M, Van Laack R, Smulders F. The water-holding capacity of fresh meat. *Veterinary quarterly*. 1997;19(4):175-81.
107. Bendixen E. The use of proteomics in meat science. *Meat Science*. 2005;71(1):138-49.
108. Farges M-C, Balcerzak D, Fisher BD, Attaix D, Béchet D, Ferrara M, et al. Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2002;282(2):E326-E35.
109. Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Christiansen JA. Role of the Calpain system in muscle growth. *Biochimie*. 1992;74(3):225-37.
110. Etlinger J, Zak R, Fischman D, Rabinowitz M. Isolation of newly synthesised myosin filaments from skeletal muscle homogenates and myofibrils. 1975.
111. Dahlmann B, Kuehn L, Reinauer H. Identification of two alkaline proteinases from rat skeletal muscle. Cysteine proteinases and their inhibitors. 1986:133-46.
112. Reville W, Murray B, Ahern S, Zeece M. Easily releasable myofilaments in post mortem bovine muscle. *Sciences des aliments*. 1994;14(4):431-40.
113. Koohmaraie M, Geesink G. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*. 2006;74(1):34-43.
114. Bailey AJ, Light ND. *Connective tissue in meat and meat products*: Elsevier Applied Science; 1989.
115. Etherington DJ. The Dissolution of Insoluble Bovine Collagens by Cathepsin B1, Collagenolytic Cathepsin and Pepsin: The influence of collagen type, age and chemical purity on susceptibility. *Connective tissue research*. 1977;5(3):135-45.
116. Nishimura T, Hattori A, Takahashi K. Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during post-mortem ageing of beef. *Meat Science*. 1996;42(3):251-60.
117. Rodrigueznunez E, Aristoy MC, Toldra F. Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*. 1995;53(2):187-90.
118. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological reviews*. 1996;76(2):371-423.
119. O'Halloran G, Troy D, Buckley D, Reville W. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Science*. 1997;47(3):187-210.
120. Muroya S, Erbjerg P, Pomponio L, Christensen M. Desmin and troponin T are degraded faster in type IIb muscle fibers than in type I fibers during postmortem aging of porcine muscle. *Meat science*. 2010;86(3):764-9.
121. Choe J, Choi Y, Lee S, Shin H, Ryu Y, Hong KC, et al. The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition, and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality. *Meat Science*. 2008;80(2):355-62.
122. Whipple G, Koohmaraie M. Effects of lamb age, muscle type, and 24-hour activity of endogenous proteinases on postmortem proteolysis. *J Anim Sci*. 1992;70(3):798-804.
123. Kemp CM, Parr T. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Meat Science*. 2012;92(3):252-9.
124. Dransfield E, Jones RCD, Macfie HJH. Tenderizing in *M-Longissimus-dorsi* of beef, veal, rabbit, lamb and pork. *Meat Science*. 1981;5(2):139-47.
125. Toldra F, Rico E, Flores J. Cathepsin-B, Cathepsin-D, Cathepsin-H and Cathepsin-L activities in the processing of dry-cured ham. *J Sci Food Agric*. 1993;62(2):157-61.

126. Toldra F, Falkous G, Flores M, Mantle D. Comparison of aminopeptidase inhibition by amino acids in human and porcine skeletal muscle tissues in vitro. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol.* 1996;115(4):445-50.
127. Watanabe A, Devine C. Effect of meat ultimate pH on rate of titin and nebulin degradation. *Meat science.* 1996;42(4):407-13.
128. Carlin K, Huff-Lonergan E, Rowe L, Lonergan SM. Effect of oxidation, pH, and ionic strength on calpastatin inhibition of  $\mu$ - and m-calpain. *J Anim Sci.* 2006;84(4):925-37.
129. Sharp J. Aseptic autolysis in rabbit and bovine muscle during storage at 37. *J Sci Food Agric.* 1963;14(7):468-79.
130. Moya V-J, Flores M, Aristoy M, Toldra F. Pork meat quality affects peptide and amino acid profiles during the ageing process. *Meat Science.* 2001;58(2):197-206.
131. Toldrá F, Flores M. The use of muscle enzymes as predictors of pork meat quality. *Food Chemistry.* 2000;69(4):387-95.
132. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiological reviews.* 2003;83(3):731-801.
133. Lonergan S, Huff-Lonergan E, Wiegand B, Kriese-Anderson L. Postmortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from Brangus cattle<sup>1</sup>. *Journal of Muscle Foods.* 2001;12(2):121-36.
134. Koohmaraie M, Schollmeyer J, Dutson T. Effect of Low-Calcium-Requiring Calcium Activated Factor on Myofibrils under Varying pH and Temperature Conditions. *Journal of Food Science.* 1986;51(1):28-32.
135. Geesink GH, Koohmaraie M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by  $\mu$ -calpain under postmortem conditions. *J Anim Sci.* 1999;77(10):2685-92.
136. Huff-Lonergan E, Mitsuhashi T, Beekman DD, Parrish F, Olson DG, Robson RM. Proteolysis of specific muscle structural proteins by  $\mu$ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J Anim Sci.* 1996;74(5):993-1008.
137. Ji J-R, Takahashi K. Changes in concentration of sarcoplasmic free calcium during post-mortem ageing of meat. *Meat science.* 2006;73(3):395-403.
138. Huff-Lonergan E, Lonergan SM. Postmortem mechanisms of meat tenderization. *Quality attributes of muscle foods: Springer; 1999.* p. 229-51.
139. Hata S, Sorimachi H, Nakagawa K, Maeda T, Abe K, Suzuki K. Domain II of m-calpain is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cysteine protease. *FEBS Lett.* 2001;501(2-3):111-4.
140. Suzuki K. The structure of calpains and the calpain gene. *Intracellular calcium-dependent proteolysis.* 1990:25-35.
141. Nishimura T, Goll D. Binding of calpain fragments to calpastatin. *Journal of Biological Chemistry.* 1991;266(18):11842-50.
142. Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, et al. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000;97(2):588-92.
143. Elce JS, Hegadorn C, Simon J, Arthur C. Autolysis,  $\text{Ca}^{2+}$  requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(17):11268-75.
144. Edmunds T, Nagainis PA, Sathe SK, Thompson VF, Goll DE. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of  $\mu$ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1991;1077(2):197-208.
145. Salamino F, De Tullio R, Mengotti P, Viotti PL, Melloni E, Pontremoli S. Site-directed activation of calpain is promoted by a membrane-associated natural activator protein. *Biochem J.* 1993;290(1):191-7.
146. Cong J, Goll D, Peterson A, Kapprell H. The role of autolysis in activity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteinases ( $\mu$ -calpain and m-calpain). *Journal of Biological Chemistry.* 1989;264(17):10096-103.

147. Saido T, Suzuki H, Yamazaki H, Tanoue K, Suzuki K. In situ capture of mu-calpain activation in platelets. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(10):7422-6.
148. Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *The EMBO Journal*. 1999;18(24):6880-9.
149. Melody J, Lonergan SM, Rowe L, Huiatt TW, Mayes MS, Huff-Lonergan E. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J Anim Sci*. 2004;82(4):1195-205.
150. Simmons NJ, Daly CC, Cummings TL, Morgan SK, Johnson NV, Lombard A. Reassessing the principles of electrical stimulation. *Meat Science*. 2008;80(1):110-22.
151. Warner R, Kauffman R, Greaser M. Muscle protein changes post mortem in relation to pork quality traits. *Meat science*. 1997;45(3):339-52.
152. Mohrhauser D, Lonergan SM, Huff-Lonergan EJ, Underwood K, Weaver A. Calpain-1 activity in bovine muscle is primarily influence by temperature, not pH decline. *J Anim Sci*. 2014;92:1261-70.
153. Brown N, Crawford C. Structural modifications associated with the change in Ca<sup>2+</sup> sensitivity on activation of m-calpain. *FEBS Lett*. 1993;322(1):65-8.
154. Stabach PR, Cianci CD, Glantz SB, Zhang ZS, Morrow JS. Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry*. 1997;36(1):57-65.
155. Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilagyi A, Banoczi Z, et al. On the sequential determinants of calpain cleavage. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(20):20775-85.
156. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain - New perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *Faseb J*. 1994;8(11):814-22.
157. Sorimachi H, Saido TC, Suzuki K. New era of calpain research - Discivery of tissue-specific calpains. *FEBS Lett*. 1994;343(1):1-5.
158. Kapprell H, Goll D. Effect of Ca<sup>2+</sup> on binding of the calpains to calpastatin. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(30):17888-96.
159. Otsuka Y, Goll DE. Purification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase-inhibitor from bovine cardiac-muscle and ints interaction with the millimolar Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(12):5839-51.
160. Maddock K, Huff-Lonergan E, Rowe L, Lonergan SM. Effect of pH and ionic strength on  $\mu$ -and m-calpain inhibition by calpastatin. *J Anim Sci*. 2005;83(6):1370-6.
161. Maki M, Ma H, Takano E, Adachi Y, Lee W, Hatanaka M, et al. Calpastatins: biochemical and molecular biological studies. *Biomedica biochimica acta*. 1990;50(4-6):509-16.
162. Takano E, Maki M. Structure of calpastatin and its inhibitory control of calpain. *Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease Taylor &Francis*. 1999:25-50.
163. Hanna RA, Campbell RL, Davies PL. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*. 2008;456(7220):409-U78.
164. Ciobanu DC, Bastiaansen JWM, Lonergan SM, Thomsen H, Dekkers JCM, Plastow GS, et al. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J Anim Sci*. 2004;82(10):2829-39.
165. Gandolfi G, Pomponio L, Ertbjerg P, Karlsson AH, Costa LN, Lametsch R, et al. Investigation on CAST, CAPN1 and CAPN3 porcine gene polymorphisms and expression in relation to post-mortem calpain activity in muscle and meat quality. *Meat Science*. 2011;88(4):694-700.
166. Consortium U. Calpastatin - Bos taurus, P20811 (ICAL\_BOVIN). . 2013.
167. Consortium U. Calpastatin - Sus scrofa (Pig), P12675 (ICAL\_PIG). . 2013.
168. Koohmaraie M, Shackelford SD, Wheeler TL, Lonergan SM, Doumit ME. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *J Anim Sci*. 1995;73(12):3596-607.

169. Morgan JB, Wheeler TL, Koohmaraie M, Crouse JD, Savell JW. Effect of castration on myofibrillar protein-turnover, endogenous proteinase activities and muscle growth in bovine skeletal-muscle. *J Anim Sci.* 1993;71(2):408-14.
170. Doumit M, Koohmaraie M. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle. *J Anim Sci.* 1999;77(6):1467-73.
171. Koohmaraie M. The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (Calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie.* 1992;74(3):239-45.
172. Sentandreu M, Coulis G, Ouali A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology.* 2002;13(12):400-21.
173. Li W, Dalen H, Eaton JW, Yuan XM. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(7):1124-30.
174. Ouali A, Garrel N, Obled A, Deval C, Valin C, Penny IF. Comparative action of Cathepsins-D, Cathepsins-B, Cathepsins-L and of a new lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils. *Meat Science.* 1987;19(2):83-100.
175. Schwartz WN, Bird JWC. Degradation of myofibrillar proteins by Cathepsins B and D. *Biochem J.* 1977;167(3):811-&.
176. Koohmaraie M, Whipple G, Kretchmar D, Crouse J, Mersmann H. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J Anim Sci.* 1991;69(2):617-24.
177. Toldra F, Rico E, Flores J. Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham. *J Sci Food Agric.* 1993;62(2):157-61.
178. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry.* 1999;68(1):383-424.
179. Green DR, Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, Salvesen GS. RIPK-Dependent Necrosis and Its Regulation by Caspases: A Mystery in Five Acts. *Mol Cell.* 2011;44(1):9-16.
180. Kemp C, Parr T. The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle. *Animal: an international journal of animal bioscience.* 2008;2(8):1254.
181. Nakagawa T, Yuan JY. Cross-talk between two cysteine protease families: Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;150(4):887-94.
182. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry.* 1999;68:383-424.
183. Denault J-B, Salvesen GS. Apoptotic caspase activation and activity. *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols.* 2008:191-220.
184. Chua BT, Guo K, Li P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(7):5131-5.
185. Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, et al. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1998;356(2):187-96.
186. Wang KKW. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 2000;23(1):20-6.
187. Goll D, Neti G, Mares S, Thompson V. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci.* 2008;86(14\_suppl):E19-E35.
188. Lomiwes D, Farouk M, Wiklund E, Young O. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. *Meat Science.* 2014;96(1):26-40.
189. Johansson A-C, Appelqvist H, Nilsson C, Kågedal K, Roberg K, Öllinger K. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis.* 2010;15(5):527-40.
190. Orłowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry.* 1990;29(45):10289-97.
191. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews.* 2002;82(2):373-428.

192. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 2006;31(1):137-55.
193. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(3):169-78.
194. Splettstoesser T. 2006.
195. Robert N, Briand M, Taylor R, Briand Y. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Science.* 1999;51(2):149-53.
196. Kisselev AF, Akopian TN, Goldberg AL. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(4):1982-9.
197. Peters JM. Proteasomes - Protein degradation machines of the cell. *Trends BiochemSci.* 1994;19(9):377-82.
198. Lamare M, Taylor RG, Farout L, Briand Y, Briand M. Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle. *Meat Science.* 2002;61(2):199-204.
199. Geesink G, Kuchay S, Chishti A, Koochmaraie M.  $\mu$ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J Anim Sci.* 2006;84(10):2834-40.
200. Houbak MB, Ertbjerg P, Therkildsen M. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and  $\mu$ -calpain. *Meat Science.* 2008;79(1):77-85.
201. Smith IJ, Dodd SL. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. *Experimental physiology.* 2007;92(3):561-73.
202. Haas KF, Woodruff E, Broadie K. Proteasome function is required to maintain muscle cellular architecture. *Biology of the Cell.* 2007;99(11):615-26.
203. Low P, Bussell K, Dawson SP, Billett MA, Mayer RJ, Reynolds SE. Expression of a 26S proteasome ATPase subunit, MS73, in muscles that undergo developmentally programmed cell death, and its control by ecdysteroid hormones in the insect *Manduca sexta*. *FEBS Lett.* 1997;400(3):345-9.
204. Kretz-Remy C, Arrigo A-P. Modulation of the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome by intracellular redox status: effects of glutathione peroxidase-1 overexpression and antioxidant drugs. *Biological chemistry.* 2003;384(4):589-95.
205. Wenzel T, Baumeister W. Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nature Structural & Molecular Biology.* 1995;2(3):199-204.
206. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999;59(11):2615-22.
207. Houbak MB, Ertbjerg P, Therkildsen M. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and  $\mu$ -calpain. *Meat Science.* 2008;79(1):77-85.
208. Formanek Z, Kerry JP, Buckley DJ, Morrissey PA, Farkas J. Effects of dietary vitamin E supplementation and packaging on the quality of minced beef. *Meat Science.* 1998;50(2):203-10.
209. Asghar A, Gray J, Buckley D, Pearson A, Booren A. Perspectives on warmed-over flavor. *Food Technology.* 1988;42(6):102-8.
210. Srinivasan S, Xiong YLL, Decker EA. Inhibition of protein and lipid oxidation in beef heart surimi-like material by antioxidants and combinations of pH, NaCl, and buffer type in the washing media. *J Agric Food Chem.* 1996;44(1):119-25.
211. Roubal WT, Tappel A. Polymerization of proteins induced by free-radical lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1966;113(1):150-5.
212. Gardner J, Woods R. A study of the surface oxidation of galena using cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry.* 1979;100(1):447-59.

213. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(4):2005-8.
214. Strehler EE, Strehlerpage MA, Perriard JC, Periasamy M, Nadalginard B. Complete nucleotide and encoded amino-acid sequence of a mammalian myosin heavy chain gene - Evidence against intron-dependent evolution of the rod. *J Mol Biol*. 1986;190(3):291-317.
215. Schilder KJ. Alterations in protein functionality due to oxidative reactions. 1993.
216. Jarenbäck L, Liljemark A. Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua* L.). *International Journal of Food Science & Technology*. 1975;10(3):309-25.
217. Xiong YL. Protein oxidation and implications for muscle food quality. Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality. 2000:85-111.
218. Kanner J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*. 1994;36(1):169-89.
219. Nollet LM, Toldrá F. *Food analysis by HPLC*: CRC Press; 2012.
220. Buttkus H. Reaction of myosin with malonaldehyde. *Journal of Food Science*. 1967;32(4):432-8.
221. Bhoitesolomon V, Kesslericekson G, Shaklai N. Peroxidative cross-linking of myosin. *Biochemistry International*. 1992;26(1):181-9.
222. Lee H, Lee C, Chung K, Lavery S. Sodium Ascorbate Affects Surimi Gel-forming Properties. *Journal of food science*. 1992;57(6):1343-7.
223. Decker EA, Xiong YL, Calvert JT, Crum AD, Blanchard SP. Chemical, physical, and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *J Agric Food Chem*. 1993;41(2):186-9.
224. Xiong Y, Decker E. Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes 1. *Journal of Muscle Foods*. 1995;6(2):139-60.
225. Meucci E, Mordente A, Martorana G. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(8):4692-9.
226. Agarwal S, Sohal RS. Aging and proteolysis of oxidized proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1994;309(1):24-8.
227. Kaminski HJ, Andrade FH. Nitric oxide: biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscular Disorders*. 2001;11(6):517-24.
228. Radi R, Denicola A, Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Rubbo H. The biological chemistry of peroxynitrite. *Nitric oxide: Biology and pathobiology*. 2000:57-82.
229. Klebl BM, Ayoub AT, Pette D. Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett*. 1998;422(3):381-4.
230. Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature cell biology*. 2001;3(2):193-7.
231. Koh TJ, Tidball JG. Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2000;279(3):C806-C12.
232. Michetti M, Salamino F, Melloni E, Pontremoli S. Reversible inactivation of calpain isoforms by nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;207(3):1009-14.
233. Liu R, Li YP, Zhang WG, Fu QQ, Liu N, Zhou GH. Activity and expression of nitric oxide synthase in pork skeletal muscles. *Meat Science*. 2015;99:25-31.
234. Zhang W. Involvement of protein degradation, calpain autolysis and protein nitrosylation in fresh meat quality during early postmortem refrigerated storage. 2009.
235. Zhang W, Marwan A-H, Samaraweera H, Lee EJ, Ahn DU. Breast meat quality of broiler chickens can be affected by managing the level of nitric oxide. *Poultry science*. 2013;92(11):3044-9.

236. Cottrell JJ, McDonagh M, Dunshea F, Warner R. Inhibition of nitric oxide release pre-slaughter increases post-mortem glycolysis and improves tenderness in ovine muscles. *Meat science*. 2008;80(2):511-21.
237. Cottrell J, Ponnampalam E, Dunshea F, Warner R. Effects of infusing nitric oxide donors and inhibitors on plasma metabolites, muscle lactate production and meat quality in lambs fed a high quality roughage-based diet. *Meat science*. 2015;105:8-15.
238. Small DM. A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1968;45(3):108-&.
239. Carey MC, Small DM. Micelle formation by bile-salts -Physical-chemical and thermodynamic considerations. *Archives of Internal Medicine*. 1972;130(4):506-+.
240. Enser M. The chemistry, biochemistry and nutritional importance of animal fats. In: Wiseman J, editor. *Fat in animal nutrition*. UK.: Butterworths London.; 1984. p. 23-52.
241. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 2005;46(5):839-61.
242. Ohea EK, Leveille GA. Significance aof adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in pig and efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis. *Journal of Nutrition*. 1969;99(3):338-&.
243. Smith S, Tsai S-C. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports*. 2007;24(5):1041-72.
244. Principles of biochemistry, 2nd edition, edited by Albert Lehninger, David Nelson, and Michael Cox, Worth Publishers, Inc., New York, 1992, 1012 pp, \$67.95. *Molecular Reproduction and Development*. 1994;37(4):477-.
245. Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of Delta 6, Delta 5, and Delta 9 desaturases. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:345-76.
246. McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase-I in animal and human-tissues - demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochemical Journal*. 1983;214(1):21-8.
247. Saggerson D, Ghadiminejad I, Awan M. Regulation of mitochondrial carnitine palmitoyl transferases from liver and extrahepatic tissues. Weber G, editor 1992. 285-306 p.
248. Winder WW, Arogyasami J, Barton RJ, Elayan IM, Vehrs PR. Muscle malonyl-CoA decreases during exercise. *Journal of Applied Physiology*. 1989;67(6):2230-3.
249. Power GW, Yaqoob P, Harvey DJ, Newsholme EA, Calder PC. The effect of dietary-lipid manipulation on hepatic mitochondrial phospholipid fatty-acid composition and carnitine palmitoyltransferase-I activity. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1994;34(4):671-84.
250. Cheng B, Karamizrak O, Noakes TD, Dennis SC, Lambert EV. Time course of the effects of a high-fat diet and voluntary exercise on muscle enzyme activity in Long-Evans rats. *Physiology & Behavior*. 1997;61(5):701-5.
251. Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *Comptes Rendus Biologies*. 2006;329(8):598-607.
252. Deiuliis JA, Shin J, Bae D, Azain MJ, Barb R, Lee K. Developmental, hormonal, and nutritional regulation of porcine adipose triglyceride lipase (ATGL). *Lipids*. 2008;43(3):215-25.
253. Bézaire V, Langin D. Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2009;68(04):350-60.
254. Moltiva MJ, Toldrá F, Aristoy MC, Flores J. Subcutaneous adipose tissue lipolysis in the processing of dry-cured ham. *Journal of food biochemistry*. 1992;16(5):323-35.
255. Motilva M-J, Toldrá F, Nieto P, Flores J. Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*. 1993;48(2):121-5.
256. Armero E, Barbosa J-A, Toldra F, Baselga M, Pla M. Effects of the terminal sire type and sex on pork muscle cathepsins (B, B+ L and H), cysteine proteinase inhibitors and lipolytic enzyme activities. *Meat Science*. 1999;51(2):185-9.

257. Hernández P, Zomeño L, Ariño B, Blasco A. Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. *Meat Science*. 2004;66(3):525-9.
258. Langfort J, Donsmark M, Ploug T, Holm C, Galbo H. Hormone-sensitive lipase in skeletal muscle: regulatory mechanisms. *Acta physiologica scandinavica*. 2003;178(4):397-403.
259. Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LAW, Peroni O, Katic M, Flier JS. Adipose triglyceride lipase - Function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*. 2006;55(1):148-57.
260. Bezaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Grousse A, Jocken J, et al. Contribution of Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase to Lipolysis in hMADS Adipocytes. *J Biol Chem*. 2009;284(27):18282-91.
261. Cheah KS, Cheah AM, Krausgrill DI. Effect of dietary supplementation of vitamin-E on pig meat quality. *Meat Science*. 1995;39(2):255-64.
262. Chen T, Zhou G-H, Xu X-L, Zhao G-M, Li C-b. Phospholipase A 2 and antioxidant enzyme activities in normal and PSE pork. *Meat Science*. 2010;84(1):143-6.
263. Monahan FJ. Oxidation of Lipids in Muscle Foods Fundamental and Applied Concerns. *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. 2000:1.
264. Decker EA, Faustman C, Lopez-Bote CJ. *Antioxidants in muscle foods: nutritional strategies to improve quality*: John Wiley & Sons; 2000.
265. Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science-Bangalore-*. 1999;77:658-66.
266. Halliwell B. The role of oxygen radicals in human-disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*. 1993;23:118-26.
267. Davies KJ, editor *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. Biochemical Society Symposia; 1995: Portland Press Limited.
268. Koga H, Martinez-Vicente M, Arias E, Kaushik S, Sulzer D, Cuervo AM. Constitutive Upregulation of Chaperone-Mediated Autophagy in Huntington's Disease. *J Neurosci*. 2011;31(50):18492-505.
269. Bandyopachyay U, Cuervo AM. Entering the lysosome through a transient gate by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 2008;4(8):1101-3.
270. Carney JM, Smith CD, Carney AM, Butterfield DA. Aging-induced and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. In: Chiueh CC, Gilbert DL, Colton CA, editors. *Neurobiology of No- and -Oh*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 738. New York: New York Acad Sciences; 1994. p. 44-53.
271. Signorini C, Ferrali M, Ciccoli L, Sugherini L, Magnani A, Comporti M. Iron release, membrane-protein oxidation and erythrocyte aging. *FEBS Lett*. 1995;362(2):165-70.
272. Tian LQ, Cai QY, Bowen R, Wei HC. Effects of caloric restriction on age-related oxidative modifications of macromolecules and lymphocyte proliferation in rats. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(6):859-65.
273. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*. 1997;10(5):485-94.
274. Yin J, Wu M, Xiao H, Ren W, Duan J, Yang G, et al. Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. *J Anim Sci*. 2014;92(2):612-9.
275. Mattson MP. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of neurovirology*. 2002;8(6):539-50.
276. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 1999;37(9-10):949-62.
277. Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, et al. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(15):5618-23.
278. Barbosa K, Bressan J, Zulet M, Martínez HJ, editors. [Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*; 2007.

279. Thomas A, Miller V, Shenkin A, Fell G, Taylor F. Selenium and glutathione peroxidase status in paediatric health and gastrointestinal disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1994;19(2):213-9.
280. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1993;300(2):535-43.
281. Decker E. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science & Technology*. 1998;9(6):241-8.
282. Hacquebard M, Vandenbranden M, Malaisse WJ, Ruyschaert JM, Deckelbaum RJ, Carpentier YA. Vitamin E transfer from lipid emulsions to plasma lipoproteins: Mediation by multiple mechanisms. *Lipids*. 2008;43(7):663-71.
283. Pinelli-Saavedra A, de la Barca AMC, Hernandez J, Valenzuela R, Scaife JR. Effect of supplementing sows' feed with alpha-tocopherol acetate and vitamin C on transfer of alpha-tocopherol to piglet tissues, colostrum, and milk: Aspects of immune status of piglets. *Research in Veterinary Science*. 2008;85(1):92-100.
284. Mustacich DJ, Bruno RS, Traber MG. Vitamin E. In: Litwack G, editor. *Vitamin E: Vitamins and Hormones Advances in Research and Applications*. Vitamins and Hormones. 76. San Diego: Elsevier Academic Press Inc; 2007. p. 1-21.
285. Niki E, Matsuo M. Rates and products of reactions of vitamin E with oxygen radicals. *Vitamin E in Health and Disease* (Packer L, Fuchs J, eds) New York: Dekker. 1993:121-30.
286. Prévéraud D, Desmarchelier C, Rouffineau F, Devillard E, Borel P. A meta-analysis to assess the effect of the composition of dietary fat on  $\alpha$ -tocopherol blood and tissue concentration in pigs. *J Anim Sci*. 2015;93(3):1177-86.
287. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2004;1660(1):171-99.
288. Sohal RS, Forster MJ. Coenzyme Q, oxidative stress and aging. *Mitochondrion*. 2007;7:S103-S11.
289. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free-radicals and iron in relation to biology and medicine - some problems and concepts  $\Delta\Delta$  *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1986;246(2):501-14.
290. Lee SK, Mei L, Decker EA. Lipid oxidation in cooked turkey as affected by added antioxidant enzymes. *Journal of Food Science*. 1996;61(4):726-&.
291. Gebicki S, Gebicki JM. Formation of peroxides in amino-acids and proteins exposed to oxygen free-radicals. *Biochem J*. 1993;289:743-9.
292. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1974;41:35-97.
293. Renner M, Dumont F, Gatellier P. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Science*. 1996;43(2):111-21.
294. Claiborne A. Catalase activity. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. 1985;1:283-4.
295. Arthur RJ. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001;57(13):1825-35.
296. Daun C, Johansson M, Önning G, Åkesson B. Glutathione peroxidase activity, tissue and soluble selenium content in beef and pork in relation to meat ageing and pig RN phenotype. *Food Chemistry*. 2001;73(3):313-9.
297. Sun Q-A, Kirnarsky L, Sherman S, Gladyshev VN. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(7):3673-8.
298. Fujii J, Taniguchi N. Down regulation of superoxide dismutases and glutathione peroxidase by reactive oxygen and nitrogen species. *Free radical research*. 1999;31(4):301-8.
299. Rey A, Segura J, Olivares A, Cerisuelo A, Piñeiro C, López-Bote C. Effect of micellized natural (D- $\alpha$ -tocopherol) vs. synthetic (DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate) vitamin E supplementation given to turkeys on oxidative status and breast meat quality characteristics. *Poultry science*. 2015;94(6):1259-69.

300. Wayner D, Burton G, Ingold K, Barclay L, Locke S. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1987;924(3):408-19.
301. Johns A, Birkinshaw L, Ledward D. Catalysts of lipid oxidation in meat products. *Meat Science*. 1989;25(3):209-20.
302. Petillo D. Antioxidant losses in the light and dark muscles of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). 1996.
303. Isabel B, Cordero G, Lopez-Bote C, Daza A. Tocopherol content, weight loss and instrumental color analysis of Iberian dry-cured ham as affected by rearing and feeding systems. *Grasas Aceites*. 2009;60(3):248-54.
304. Rhee K, Anderson L, Sams A. Lipid oxidation potential of beef, chicken, and pork. *Journal of Food Science*. 1996;61(1):8-12.
305. RHEE KS, ZIPRIN YA. Lipid oxidation in retail beef, pork and chicken muscles as affected by concentrations of heme pigments and nonheme iron and microsomal enzymic lipid peroxidation activity. *Journal of Food Biochemistry*. 1987;11(1):1-15.
306. Soares AL, Marchi DF, Matsushita M, Guarnieri PD, Droval AA, Ida EI, et al. Lipid oxidation and fatty acid profile related to broiler breast meat color abnormalities. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2009;52(6):1513-8.
307. Nawar WW. Chemistry of thermal oxidation of lipids. *Flavor chemistry of fats and oils*. 1985:39-60.
308. Love JD, Pearson A. Lipid oxidation in meat and meat products—A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1971;48(10):547-9.
309. Freybler LA, Gray JJ, Asghar A, Booren AM, Pearson AM, Buckley DJ. Nitrite stabilization of lipids in cured pork. *Meat Science*. 1993;33(1):85-96.
310. te Pas MF, Kruijt L, Pierzchala M, Crump RE, Boeren S, Keuning E, et al. Identification of proteomic biomarkers in *M. Longissimus dorsi* as potential predictors of pork quality. *Meat science*. 2013;95(3):679-87.
311. Pierzchała M, Pareek PL, Urbański P, Goluch UC, Kamyczek MR, Cooper JK. Expression profile of MYF5 and MYF6 genes in skeletal muscles of young growing gilts of five breeds at different ages, based on the most stable reference genes. *Animal Science Papers and Reports*. 2011;29(3):231-46.
312. Henckel P, Karlsson A, Oksbjerg N, Petersen JS. Control of post mortem pH decrease in pig muscles: experimental design and testing of animal models. *Meat Science*. 2000;55(1):131-8.
313. Kim KS, Larsen N, Short T, Plastow G, Rothschild MF. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mamm Genome*. 2000;11(2):131-5.
314. Milan D, Robic A, Chardon P, Iannuccelli N, Caritez JC, Yerle M, et al. Example of fine mapping: Case of the RN gene in hogs. *Prod Anim*. 2000:137-9.
315. te Pas MF, Jansen J, Broekman KC, Reimert H, Heuven HC. Postmortem proteome degradation profiles of longissimus muscle in Yorkshire and Duroc pigs and their relationship with pork quality traits. *Meat science*. 2009;83(4):744-51.
316. Becker BA, Mayes HF, Hahn GL, Nienaber JA, Jesse GW, Anderson ME, et al. Effect of fasting and transportation on various physiological-parameters and meat quality of slaughter hogs. *J Anim Sci*. 1989;67(2):334-41.
317. Young JF, Bertram HC, Oksbjerg N. Rest before slaughter ameliorates pre-slaughter stress-induced increased drip loss but not stress-induced increase in the toughness of pork. *Meat Science*. 2009;83(4):634-41.
318. Offer G, Knight P, Jeacocke R, Almond R, Cousins T, Elsey J, et al. The structural basis of the water-holding, appearance and toughness of meat and meat products. *Food structure*. 1989;8(1):17.

319. Zhang W, Lonergan SM, Gardner MA, Huff-Lonergan E. Contribution of postmortem changes of integrin, desmin and  $\mu$ -calpain to variation in water holding capacity of pork. *Meat Science*. 2006;74(3):578-85.
320. Honikel K. Quality of fresh pork—Review. *Pork Quality: Genetic and metabolic factors*. 1993:203-16.
321. Bertram HC, Schafer A, Rosenvold K, Andersen HJ. Physical changes of significance for early postmortem water distribution in porcine M-longissimus. *Meat Science*. 2004;66(4):915-24.
322. Honikel K, Kim C, Hamm R, Roncales P. Sarcomere shortening of prerigor muscles and its influence on drip loss. *Meat science*. 1986;16(4):267-82.
323. Bertram HC, Whittaker AK, Andersen HJ, Karlsson AH. Visualization of drip channels in meat using NMR microimaging. *Meat Science*. 2004;68(4):667-70.
324. Honikel KO. Water-holding capacity of meat. *Muscle development of livestock animals: Physiology, genetics and meat quality*. 2004:389-400.
325. Offer G. Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: Effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Science*. 1991;30(2):157-84.
326. Diesbourg L, Swatland H, Millman B. X-ray diffraction measurements of postmortem changes in the myofilament lattice of pork. *J Anim Sci*. 1988;66(4):1048-54.
327. Brewer M. Chemical and physical characteristics of meat. Water-holding capacity. *Encyclopedia of Meat Science* W Jensen, C Devine, and M Dikeman, ed Elsevier Ltd, St Louis, MO. 2004:242-9.
328. Bertram HC, Rasmussen M, Busk H, Oksbjerg N, Karlsson AH, Andersen HJ. Changes in porcine muscle water characteristics during growth—an in vitro low-field NMR relaxation study. *Journal of Magnetic Resonance*. 2002;157(2):267-76.
329. Kristensen L, Purslow PP. The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. *Meat science*. 2001;58(1):17-23.
330. Currie R, Wolfe F. An assessment of extracellular space measurements in post-mortem muscle. *Meat science*. 1983;8(2):147-61.
331. Hopkins D, Thompson J. The relationship between tenderness, proteolysis, muscle contraction and dissociation of actomyosin. *Meat Science*. 2001;57(1):1-12.
332. Joo S, Kauffman R, Kim B-C, Park G. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat science*. 1999;52(3):291-7.
333. Straadt IK, Rasmussen M, Andersen HJ, Bertram HC. Aging-induced changes in microstructure and water distribution in fresh and cooked pork in relation to water-holding capacity and cooking loss—A combined confocal laser scanning microscopy (CLSM) and low-field nuclear magnetic resonance relaxation study. *Meat Science*. 2007;75(4):687-95.
334. Farouk M, Mustafa NM, Wu G, Krsinic G. The “sponge effect” hypothesis: An alternative explanation of the improvement in the waterholding capacity of meat with ageing. *Meat science*. 2012;90(3):670-7.
335. Schäfer A, Rosenvold K, Purslow PP, Andersen HJ, Henckel P. Physiological and structural events post mortem of importance for drip loss in pork. *Meat science*. 2002;61(4):355-66.
336. Lopez-Bote C, Warriss P, Brown S. The use of muscle protein solubility measurements to assess pig lean meat quality. *Meat science*. 1989;26(3):167-75.
337. Nollet LM, Toldrá F. *Handbook of muscle foods analysis*: CRC Press; 2008.
338. Honikel KO. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat science*. 1998;49(4):447-57.
339. Brøndum J, Munck L, Henckel P, Karlsson A, Tornberg E, Engelsen SB. Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Science*. 2000;55(2):177-85.

340. Bertram HC, Andersen HJ, Karlsson AH. Comparative study of low-field NMR relaxation measurements and two traditional methods in the determination of water holding capacity of pork. *Meat science*. 2001;57(2):125-32.
341. Jacob C, Giles GL, Giles NM, Sies H. Sulfur and selenium: The role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem-Int Edit*. 2003;42(39):4742-58.
342. Lyons MP, Papazyan TT, Surai PF. Selenium in food chain and animal nutrition: Lessons from nature. *Asian Australas J Anim Sci*. 2007;20(7):1135-55.
343. Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol*. 2002;22(11):3565-76.
344. Low SC, Grundner-Culemann E, Harney JW, Berry MJ. SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *Embo J*. 2000;19(24):6882-90.
345. Gassner NC, Baase WA, Hausrath AC, Matthews BW. Substitution with selenomethionine can enhance the stability of methionine-rich proteins. *J Mol Biol*. 1999;294(1):17-20.
346. McSheehy S, Yang L, Sturgeon R, Mester Z. Determination of methionine and selenomethionine in selenium-enriched yeast by species-specific isotope dilution with liquid chromatography-mass spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Analytical chemistry*. 2005;77(1):344-9.
347. Thomson C. Selenium speciation in human body fluids†. *Analyst*. 1998;123(5):827-31.
348. Daniels LA. Selenium metabolism and bioavailability. *Biological trace element research*. 1996;54(3):185-99.
349. Whanger P. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002;21(3):223-32.
350. Kim Y, Mahan D. Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. *J Anim Sci*. 2001;79(4):942-8.
351. Suzuki K, Ogra Y. Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Additives & Contaminants*. 2002;19(10):974-83.
352. Kohrle J, Brigelius-Flohe R, Bock A, Gartner R, Meyer O, Flohe L. Selenium in biology: Facts and medical perspectives. *Biological Chemistry*. 2000;381(9-10):849-64.
353. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 2003;300(5624):1439-43.
354. Flohé L, Brigelius-Flohé R. Selenoproteins of the glutathione system. *Selenium: Springer*; 2001. p. 157-78.
355. Burk RF. *Selenium in biology and human health*: Springer; 1994.
356. Muges G, Singh HB. Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. *Chem Soc Rev*. 2000;29(5):347-57.
357. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione-peroxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1985;839(1):62-70.
358. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(2):145-69.
359. Ufer C, Borchert A, Kuhn H. Functional characterization of cis- and trans-regulatory elements involved in expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(15):4293-303.
360. Hollander JM, Lin KM, Scott BT, Dillmann WH. Overexpression of PHGPx and HSP60/10 protects against ischemia/reoxygenation injury. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(7):742-51.
361. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):951-65.
362. Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshow JH, Binder SW, Chu FF. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol-Gastroint Liver Physiol*. 2001;281(3):G848-G55.

363. Schweizer U, Schomburg L. New insights into the physiological actions of selenoproteins from genetically modified mice. *IUBMB Life*. 2005;57(11):737-44.
364. Gromadzinska J, Reszka E, Bruzelius K, Wasowicz W, Akesson B. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur J Nutr*. 2008;47:29-50.
365. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a Co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*. 1999;31(4):273-300.
366. Singh AK, Shichi H. A novel glutathione peroxidase in bovine eye - Sequence analysis, mRNA level, and translation. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(40):26171-8.
367. Schwaab V, Lareyre JJ, Vernet P, Pons E, Faure J, Dufaure JP, et al. Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil*. 1998:157-62.
368. Gromadzinska J, Sklodowska M, Wasowicz W. Glutathione-peroxidase activity, lipid peroxides and selenium concentration in various rat organs. *Biomedica Biochimica Acta*. 1988;47(1):19-24.
369. Adkins RS, Ewan RC. Effect of selenium on performance, serum selenium concentration and glutathione-peroxidase activity in pigs. *J Anim Sci*. 1984;58(2):346-50.
370. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J*. 2000;346:1-8.
371. Arner ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2000;267(20):6102-9.
372. Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxin system - From science to clinic. *Med Res Rev*. 2004;24(1):40-89.
373. Das KC. Thioredoxin system in premature and newborn biology. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(1):177-84.
374. Rundlof AK, Arner ESJ. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(1):41-52.
375. Council NR. *Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition*. Washington, DC: The National Academies Press; 2012. 420 p.
376. Gabriele Aquilina GB, Andrew Chesson, Pier Sandro Cocconcelli, Joop de Knecht, Noël Albert Dierick, Mikolaj Antoni Gralak, Jürgen Gropp, Ingrid Halle, Reinhard Kroker, Lubomir Leng, Anne-Katrine Lundebye Haldorsen, Alberto Mantovani, Miklós Mézes, Derek Renshaw and Maria Saarela. Scientific Opinion on Safety and efficacy of Sel-Plex® (organic form of selenium produced by *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060) for all species. *EFSA Journal*. 2011;9(4):52.
377. EFSA Scientific Committee on Food; Scientific Panel on Dietetic Products NaA. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. 2006.
378. Zarczynska K, Sobiech P, Radwinska J, Rekawek W. Effects of selenium on animal health. *Journal of Elementology*. 2013;18(2).
379. Wolter B, Miller KD, Ellis M, McKeith F. Influence of Dietary Selenium Source on Growth Performance, and Carcass and Meat Quality Characteristics in Swine. 1999.
380. Mahan DC, Cline TR, Richert B. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality. *J Anim Sci*. 1999;77(8):2172-9.
381. Jacyno E, Kawecka M, Kamyczek M, Kolodziej A, Owsiany J, Delikator B. Influence of inorganic Se+ vitamin E and organic Se+ vitamin E on reproductive performance of young boars. 2002.
382. Mateo R, Spallholz J, Elder R, Yoon I, Kim S. Efficacy of dietary selenium sources on growth and carcass characteristics of growing-finishing pigs fed diets containing high endogenous selenium. *J Anim Sci*. 2007;85(5):1177-83.

383. Lisiak D, Janiszewski P, Blicharski T, Borzuta K, Grześkowiak E, Lisiak B, et al. Effect of selenium supplementation in pig feed on slaughter value and physicochemical and sensory characteristics of meat. *Annals of Animal Science*. 2014;14(1):213-22.
384. Yingcai JZWYL, Fang ZCJSC. of Ministry of Agriculture, Guangdong Public Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Institute of Animal Sciences, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China); Effects of Dietary Selenomethionine Supplementation on Performance and Meat Quality of Finishing Pigs [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*. 2010;2.
385. Liu B, Xiong P, Chen N, He J, Lin G, Xue Y, et al. Effects of Replacing of Inorganic Trace Minerals by Organically Bound Trace Minerals on Growth Performance, Tissue Mineral Status, and Fecal Mineral Excretion in Commercial Grower-Finisher Pigs. *Biological trace element research*. 2016:1-9.
386. Cao J, Guo F, Zhang L, Dong B, Gong L. Effects of dietary Selenomethionine supplementation on growth performance, antioxidant status, plasma selenium concentration, and immune function in weaning pigs. *Journal of animal science and biotechnology*. 2014;5(1):1.
387. Speight SM, Estienne MJ, Harper AF, Barb CR, Pringle TD. Effects of organic selenium supplementation on growth performance, carcass measurements, tissue selenium concentrations, characteristics of reproductive organs, and testis gene expression profiles in boars. *J Anim Sci*. 2012;90(2):533-42.
388. Douillet C, Bost M, Accominotti M, Borson-Chazot F, Ciavatti M. Effect of selenium and vitamin E supplementation on lipid abnormalities in plasma, aorta, and adipose tissue of Zucker rats. *Biological Trace Element Research*. 1998;65(3):221-36.
389. Pinto A, Juniper DT, Sanil M, Morgan L, Clark L, Sies H, et al. Supranutritional selenium induces alterations in molecular targets related to energy metabolism in skeletal muscle and visceral adipose tissue of pigs. *J Inorg Biochem*. 2012;114:47-54.
390. Marin-Guzman J, Mahan D, Pate J. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J Anim Sci*. 2000;78(6):1537-43.
391. Xiao P, Cao X, Luo S, Li L, Liang M. The Effect of Different Selenium Sources and Levels on Sero-immunity of Weaned Piglets. *Swine Production*. 2014;3:023.
392. Liu F, Cottrell JJ, Furness JB, Rivera LR, Kelly FW, Wijesiriwardana U, et al. Selenium and vitamin E together improve intestinal epithelial barrier function and alleviate oxidative stress in heat-stressed pigs. *Experimental physiology*. 2016;101(7):801-10.
393. Biswal D, Sethy K, Mishra S, Swain R, Behera K, Behera A, et al. Effect of sodium selenite and vitamin E supplementation on growth and serum minerals profile of pigs (*Sus domesticus*). *Exploratory Animal and Medical Research*. 2015;5(2):224-9.
394. Zhan X, Wang M, Zhao R, Li W, Xu Z. Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 2007;132(3):202-11.
395. Jean-Louis Bresson AF, Marina Heinonen, Karin Hulshof, Hannu Korhonen, Pagona Lagiou, Martinus Løvik, Rosangela Marchelli, Ambroise Martin, Bevan Moseley, Hildegard Przyrembel, Seppo Salminen, Sean (J.J.) Strain, Stephan Strobel, Inge Tetens, Henk van den Berg, Hendrik van Loveren and Hans Verhagen. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to selenium and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 277, 283, 286, 1289, 1290, 1291, 1293, 1751), function of the immune system (ID 278), thyroid function (ID 279, 282, 286, 1289, 1290, 1291, 1293), function of the heart and blood vessels (ID 280), prostate function (ID 284), cognitive function (ID 285) and spermatogenesis (ID 396) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*. 2009;7(9):24.
396. López-Bellido Garrido FJ, López Bellido L. Selenio y salud: valores de referencia y situación actual de la población española. *Nutrición Hospitalaria*. 2013;28(5):1396-406.

397. B'Hymer C, Caruso JA. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1114(1):1-20.
398. Schrauzer GN. Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001;20(1):1-4.
399. FOOD F, Board N. National Research Council, Recommended dietary allowances 10th ed. Washington, DC: National Academy Press; 1989.
400. Biesalski H-K. Meat as a component of a healthy diet—are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat science*. 2005;70(3):509-24.
401. Díaz-Alarcón JP, Navarro-Alarcón M, López-García de la Serrana H, López-Martínez MC. Determination of selenium in meat products by hydride generation atomic absorption spectrometry selenium levels in meat, organ meats, and sausages in Spain. *J Agric Food Chem*. 1996;44(6):1494-7.
402. Mahan D, Brendemuhl J, Carter S, Chiba L, Crenshaw T, Cromwell G, et al. Comparison of dietary selenium fed to grower-finisher pigs from various regions of the United States on resulting tissue Se and loin mineral concentrations. *J Anim Sci*. 2005;83(4):852-7.
403. Encinar JR, Śliwka-Kaszyńska M, Potatajko A, Vacchina V, Szpunar J. Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast. *Analytica Chimica Acta*. 2003;500(1):171-83.
404. Peters U, Takata Y. Selenium and the prevention of prostate and colorectal cancer. *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(11):1261-72.
405. Dennert G, Zwahlen M, Brinkman M, Vinceti M, Zeegers M, Horneber M. Selenium for preventing cancer. *The Cochrane Library*. 2011.
406. Shen HM, Yang CF, Liu J, Ong CN. Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(7):1115-24.
407. Garberg P, Stahl A, Warholm M, Hogberg J. Studies of the role of DNA fragmentation in selenium toxicity. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(18):3401-6.
408. Oldfield J. Some recollections of early swine research with selenium and vitamin E. *J Anim Sci*. 2003;81(14\_suppl\_2):E145-E8.
409. Rowe L, Lonergan S, Rothschild M, Huff-Lonergan E. Relationship between porcine longissimus dorsi pH decline and  $\mu$ -calpain activity/autolysis and protein degradation. *J Anim Sci*. 2001;79(Suppl. 1):20.
410. Zhang W, Xiao S, Samaraweera H, Lee EJ, Ahn DU. Improving functional value of meat products. *Meat science*. 2010;86(1):15-31.
411. Musik I, Staroslawska E, Pasternak K. Effect of organic selenium compounds on the activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in selected mouse tissues. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2003;47(2):567-73.
412. Li J-G, Zhou J-C, Zhao H, Lei X-G, Xia X-J, Gao G, et al. Enhanced water-holding capacity of meat was associated with increased Sepw1 gene expression in pigs fed selenium-enriched yeast. *Meat science*. 2011;87(2):95-100.
413. Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales E, Bertin G. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J Anim Sci*. 2008;86(11):3100-9.
414. Bobcek B, Lahucky R, Mrázová J, Bobcek R, Novotná K, Vasicek D. Effects of dietary organic selenium supplementation on selenium content, antioxidative status of muscles and meat quality of pigs. *Czech Journal of Animal Science-UZPI (Czech Republic)*. 2004.
415. Isabel B, Lopez-Bote CJ, de la Hoz L, Timón M, Garcí C, Ruiz J. Effects of feeding elevated concentrations of monounsaturated fatty acids and vitamin E to swine on characteristics of dry cured hams. *Meat Science*. 2003;64(4):475-82.
416. Pehrson B, editor Selenium in nutrition with special reference to the biopotency of organic and inorganic selenium compounds. *Biotechnology in the Feed Industry: Proc Alltech's 9th Annu Symp Nottingham University Press, Nottingham; 1993*.

417. Macit M, Aksakal V, Emsen E, Aksu MI, Karaoglu M, Esenbuga N. Effects of vitamin E supplementation on performance and meat quality traits of Morkaraman male lambs. *Meat Science*. 2003;63(1):51-5.
418. Pan D, Lillioja S, Kriketos A, Milner M, Baur L, Bogardus C, et al. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*. 1997;46(6):983-8.
419. Edens FW, editor *Organic selenium: from feathers to muscle integrity to drip loss. Five years onward: no more selenite. Biotechnology In the Feed Industry Proceedings= of Alltech 12th Annual Symposium Nottingham University Press, Nottingham UK; 1996.*
420. Lauridsen C, Nielsen JH, Henckel P, Sørensen MT. Antioxidative and oxidative status in muscles of pigs fed rapeseed oil, vitamin E, and copper. *J Anim Sci*. 1999;77(1):105-15.
421. Asghar A, Gray JI, Booren AM, Gomaa E, Abouzied MM, Miller ER, et al. Effects of supranutritional dietary vitamin E levels on subcellular deposition of  $\alpha$ -tocopherol in the muscle and on pork quality. *J Sci Food Agric*. 1991;57(1):31-41.
422. Cannon J, Morgan J, Schmidt G, Tatum J, Sofos J, Smith G, et al. Growth and fresh meat quality characteristics of pigs supplemented with vitamin E. *J Anim Sci*. 1996;74(1):98-105.
423. Dirinck P, De Winne A, Casteels M, Frigg M. Studies on vitamin E and meat quality. 1. Effect of feeding high vitamin E levels on time-related pork quality. *J Agric Food Chem*. 1996;44(1):65-8.
424. Jensen C, Guider J, Skovgaard I, Staun H, Skibsted LH, Jensen SK, et al. Effects of dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation on  $\alpha$ -tocopherol deposition in porcine m. psoas major and m. longissimus dorsi and on drip loss, colour stability and oxidative stability of pork meat. *Meat Science*. 1997;45(4):491-500.
425. Hoving-Bolink A, Eikelenboom G, Van Diepen JTM, Jongbloed A, Houben J. Effect of dietary vitamin E supplementation on pork quality. *Meat Science*. 1998;49(2):205-12.
426. Rosenvold K, Laerke H, Jensen S, Karlsson A, Lundström K, Andersen HJ. Manipulation of critical quality indicators and attributes in pork through vitamin E supplementation, muscle glycogen reducing finishing feeding and pre-slaughter stress. *Meat Science*. 2002;62(4):485-96.
427. Swigert K, McKeith F, Carr T, Brewer M, Culbertson M. Effects of dietary vitamin D 3, vitamin E, and magnesium supplementation on pork quality. *Meat science*. 2004;67(1):81-6.
428. Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM, Huff-Lonergan E. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of mu-calpain. *J Anim Sci*. 2004;82(11):3254-66.
429. Apple J, Maxwell C, Derodas B, Watson H, Johnson Z. Effect of magnesium mica on performance and carcass quality of growing-finishing swine. *J Anim Sci*. 2000;78(8):2135-43.
430. D'souza D, Warner R, Leury B, Dunshea F. The effect of dietary magnesium aspartate supplementation on pork quality. *J Anim Sci*. 1998;76(1):104-9.
431. Apple JK, Maxwell CV, Stivarius MR, Rakes LK, Johnson ZB. Effects of dietary magnesium and halothane genotype on performance and carcass traits of growing-finishing swine. *Livestock production science*. 2002;76(1):103-13.
432. Apple J, Kegley E, Maxwell C, Rakes L, Galloway D, Wistuba T. Effects of dietary magnesium and short-duration transportation on stress response, postmortem muscle metabolism, and meat quality of finishing swine. *J Anim Sci*. 2005;83(7):1633-45.
433. Frederick B, Van Heugten E, See M. Timing of magnesium supplementation administered through drinking water to improve fresh and stored pork quality. *J Anim Sci*. 2004;82(5):1454-60.
434. Frederick B, van Heugten E, See M. Effects of pig age at market weight and magnesium supplementation through drinking water on pork quality. *J Anim Sci*. 2006;84(6):1512-9.
435. Apple JK, Roberts WJ, Maxwell CV, Boger CB, Friesen KG, Rakes LK, et al. Influence of dietary manganese source and supplementation level on pork quality during retail display. *Journal of Muscle Foods*. 2005;16(3):207-22.

436. Wang M, Xu Z. Effect of chromium nanoparticle on growth performance, carcass characteristics, pork quality and tissue chromium in finishing pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 2004;17(8):1118-22.
437. Matthews J, Higbie A, Southern L, Coombs D, Bidner T, Odgaard R. Effect of chromium propionate and metabolizable energy on growth, carcass traits, and pork quality of growing-finishing pigs. *J Anim Sci*. 2003;81(1):191-6.
438. Shelton J, Payne R, Johnston S, Bidner T, Southern L, Odgaard R, et al. Effect of chromium propionate on growth, carcass traits, pork quality, and plasma metabolites in growing-finishing pigs. *J Anim Sci*. 2003;81(10):2515-24.
439. Swanek S, Morgan J, Owens F, Gill D, Strasia C, Dolezal H, et al. Vitamin D3 supplementation of beef steers increases longissimus tenderness. *J Anim Sci*. 1999;77(4):874-81.
440. Montgomery JL, Parrish F, Beitz DC, Horst RL, Huff-Lonergan EJ, Trenkle AH. The use of vitamin D3 to improve beef tenderness. *J Anim Sci*. 2000;78(10):2615-21.
441. Wiegand B, Sparks J, Beitz D, Parrish F, Horst R, Trenkle A, et al. Short-term feeding of vitamin D improves color but does not change tenderness of pork-loin chops. *J Anim Sci*. 2002;80(8):2116-21.
442. Wilborn B, Kerth C, Owsley W, Jones W, Frobish L. Improving pork quality by feeding supranutritional concentrations of vitamin D. *J Anim Sci*. 2004;82(1):218-24.
443. Enright K, Anderson B, Ellis M, McKeith F, Berger L, Baker D. The effects of feeding high levels of vitamin D3 on pork quality. *J Anim Sci*. 1998;76(Suppl 1):149.
444. Peeters E, Driessen B, Geers R. Influence of supplemental magnesium, tryptophan, vitamin C, vitamin E, and herbs on stress responses and pork quality. *J Anim Sci*. 2006;84(7):1827-38.
445. Kremer B, Stahly T, Ewan R. The effect of dietary vitamin C on meat quality of pork. *J Anim Sci*. 1999;77(Suppl 1):46.
446. Zhang C, Luo J, Yu B, Zheng P, Huang Z, Mao X, et al. Dietary resveratrol supplementation improves meat quality of finishing pigs through changing muscle fiber characteristics and antioxidative status. *Meat science*. 2015;102:15-21.
447. Warner R, Eldridge G, Hofmeyr C, Barnett J. The effect of dietary tryptophan on pig behaviour and meat quality-preliminary results. *Animal Production in Australia*. 1998;22:325-.
448. Berg E, Allee G. Creatine monohydrate supplemented in swine finishing diets and fresh pork quality: I. A controlled laboratory experiment. *J Anim Sci*. 2001;79(12):3075-80.
449. Maddock R, Bidner B, Carr S, McKeith F, Berg E, Savell J. Creatine monohydrate supplementation and the quality of fresh pork in normal and halothane carrier pigs. *J Anim Sci*. 2002;80(4):997-1004.
450. Rienstra R, Socha T, Tilton J, Fisher R. Effects of added phytase in swine diets on performance, body composition, and longissimus dorsi quality traits. *J Anim Sci*. 2001;79(Suppl 2):348.
451. Shelton J, Southern L, LeMieux F, Bidner T, Page T. Effects of microbial phytase, low calcium and phosphorus, and removing the dietary trace mineral premix on carcass traits, pork quality, plasma metabolites, and tissue mineral content in growing-finishing pigs. *J Anim Sci*. 2004;82(9):2630-9.
452. Young JF, Bertram HC, Rosenvold K, Lindahl G, Oksbjerg N. Dietary creatine monohydrate affects quality attributes of Duroc but not Landrace pork. *Meat science*. 2005;70(4):717-25.
453. Monahan F, Asghar A, Gray J, Buckley D, Morrissey P. Influence of dietary vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) on the colour stability of pork chops. *Proc Intl Congr Meat Sci and Technol*. 1992;38:543.
454. Stef D-S, Stef L, Jianu C, Druga M, Danci M, Alda S, et al. The influence of level and source of selenium on productive performance and meat quality of broiler chickens. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2011;9(1):296-8.

455. Wang Y, Zhan X, Zhang X, Wu R, Yuan D. Comparison of different forms of dietary selenium supplementation on growth performance, meat quality, selenium deposition, and antioxidant property in broilers. *Biological Trace Element Research*. 2011;143(1):261-73.
456. Calvo L, Toldrá F, Rodríguez AI, López-Bote C, Rey AI. Effect of dietary selenium source (organic vs. mineral) and muscle pH on meat quality characteristics of pigs. *Food Science & Nutrition*. 2017;5(1):94-102.
457. Calvo L, Toldrá F, Aristoy M, López-Bote C, Rey A. Effect of dietary organic selenium on muscle proteolytic activity and water-holding capacity in pork. *Meat science*. 2016;121:1-11.
458. Kim CY, Kim G-N, Wiacek JL, Chen C-Y, Kim K-H. Selenate inhibits adipogenesis through induction of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;426(4):551-7.
459. Podszun MC, Grebenstein N, Spruss A, Schlueter T, Kremoser C, Bergheim I, et al. Dietary  $\alpha$ -tocopherol and atorvastatin reduce high-fat-induced lipid accumulation and down-regulate CD36 protein in the liver of guinea pigs. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014;25(5):573-9.
460. Jang Y, Choi H, Durosoy S, Schlegel P, Choi B, Kim Y. Comparison of bioavailability of organic selenium sources in finishing pigs. *Asian Australas J Anim Sci*. 2010;23(7):931-6.
461. Mahan D, Azain M, Crenshaw T, Cromwell G, Dove C, Kim S, et al. Supplementation of organic and inorganic selenium to diets using grains grown in various regions of the United States with differing natural Se concentrations and fed to grower–finisher swine. *J Anim Sci*. 2014;92(11):4991-7.
462. Krajewska K, Rozbicka-Wieczorek A, Kowalczyk J, Czauderna M. Dietary linseed oil and selenate affect the concentration of fatty acids and selenium in the spleen, pancreas, and kidneys of lambs. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2012;21(2).
463. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408(6809):239-47.
464. Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*. 1999;13(10):1145-55.
465. Rey A, López-Bote C, Daza A, Lauridsen C. Accumulation and evolution of tocopherols in dry-cured hams from Iberian pigs as affected by their feeding and rearing system. *Food chemistry*. 2010;123(4):1170-5.
466. Jin S-K, Kim I-S, Hur I-C, Choi S-Y, Yu K-O, Kim J-G, et al. Effect of feeding complex of wild chrysanthemum powder, probiotics and selenium on meat quality in finishing porks. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2009;29(1):114-20.
467. Korniluk K, Gabryszuk M, Kowalczyk J, Czauderna M. Effect of diet supplementation with selenium, zinc and alpha-tocopherol on fatty acid composition in the liver and loin muscle of lambs. *Animal Science Papers and Reports*. 2008;1(26).
468. Czauderna M, Kowalczyk J, Krajewska K, Michalski J. The dietary level of selenite and selenized yeast influences the concentrations of selected fatty acids in the abdominal fat and brain of rats. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2010;19(1):113-29.
469. Infante J. Vitamin E and selenium participation in fatty acid desaturation A proposal for an enzymatic function of these nutrients. *Molecular and cellular biochemistry*. 1986;69(2):93-108.
470. Nuernberg K, Kuechenmeister U, Kuhn G, Nuernberg G, Winnefeld K, Ender K, et al. Influence of dietary vitamin E and selenium on muscle fatty acid composition in pigs. *Food Res Int*. 2002;35(6):505-10.
471. Toldrá F, Flores M. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science*. 1998;38(4):331-52.
472. Stapleton S. Selenium: an insulin mimetic. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000;57(13):1874-9.
473. Marshall JR. Diet and prostate cancer prevention. *World journal of urology*. 2012;30(2):157-65.

474. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama*. 2009;301(1):39-51.
475. Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M, Andersson A. Desaturation and elongation of fatty acids and insulin action. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;967(1):183-95.
476. Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, et al. Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2006;29(4):895-900.
477. Perseghin G, Price TB, Petersen KF, Roden M, Cline GW, Gerow K, et al. Increased glucose transport–phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *New England Journal of Medicine*. 1996;335(18):1357-62.
478. Hassan A, Ahn J, Suh Y, Choi YM, Chen P, Lee K. Selenium promotes adipogenic determination and differentiation of chicken embryonic fibroblasts with regulation of genes involved in fatty acid uptake, triacylglycerol synthesis and lipolysis. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014;25(8):858-67.
479. Wang X, Wu H, Long Z, Sun Q, Liu J, Liu Y, et al. Differential effect of Se on insulin resistance: regulation of adipogenesis and lipolysis. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016;415(1-2):89-102.
480. Koshkenbaev B, Tazhibaev S, Maksimenko V, Sisemalieva Z. Effect of protein-vitamin deficiency on the enzyme activity of lipolysis and the synthesis of cholesterol esters during hypokinesia. *Voprosy pitaniia*. 1984(6):53-7.
481. Abedian Kenari A, Naderi M. Effects of enriched Artemia by fish and soybean oils supplemented with vitamin E on growth performance, lipid peroxidation, lipase activity and fatty acid composition of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. *Aquaculture Nutrition*. 2015.
482. Chen G, Wu J, Li C. Effect of different selenium sources on production performance and biochemical parameters of broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2014;98(4):747-54.
483. Mikulski D, Jankowski J, Zduńczyk Z, Wróblewska M, Sartowska K, Majewska T. The effect of selenium source on performance, carcass traits, oxidative status of the organism, and meat quality of turkeys. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2009;18(3):518-30.
484. Padmaja S, Squadrito G, Lemercier J-N, Cueto R, Pryor WA. Rapid oxidation of DL-selenomethionine by peroxyxynitrite. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(3):317-22.
485. Finley JW. Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition reviews*. 2006;64(3):146-51.
486. Grant CM, Collinson LP, Roe JH, Dawes IW. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular microbiology*. 1996;21(1):171-9.
487. Spallholz JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic Biol Med*. 1994;17(1):45-64.
488. Monahan F, Buckley D, Morrissey P, Lynch P, Gray J. Influence of dietary fat and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. *Meat Science*. 1992;31(2):229-41.
489. Faustman C, Chan W, Schaefer D, Havens A. Beef color update: the role for vitamin E. *J Anim Sci*. 1998;76(4):1019-26.
490. Juniper DT, Phipps RH, Bertin G. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in commercial-line turkeys. *animal*. 2011;5(11):1751-60.
491. Wachholz D, Kauffman R, Henderson D, Lochner J. Consumer discrimination of pork color at the market place. *Journal of Food Science*. 1978;43(4):1150-2.
492. Smith W, Lesser D. An economic assessment of pale, soft exudative musculature in the fresh and cured pig carcass. *Animal Production*. 1982;34(03):291-9.

493. Jennen D, Brings A, Liu G, Jüngst H, Tholen E, Jonas E, et al. Genetic aspects concerning drip loss and water-holding capacity of porcine meat. *J Anim Breed Genet.* 2007;124(s1):2-11.
494. Otto G, Roehe R, Looft H, Thoelking L, Kalm E. Comparison of different methods for determination of drip loss and their relationships to meat quality and carcass characteristics in pigs. *Meat Science.* 2004;68(3):401-9.
495. Hovenier R, Kanis E, Verhoeven J. Repeatability of taste panel tenderness scores and their relationships to objective pig meat quality traits. *J Anim Sci.* 1993;71(8):2018-25.
496. Huff-Lonergan E, Baas TJ, Malek M, Dekkers JC, Prusa K, Rothschild MF. Correlations among selected pork quality traits. *J Anim Sci.* 2002;80(3):617-27.
497. DeVol D, McKeith F, Bechtel PJ, Novakofski J, Shanks R, Carr T. Variation in composition and palatability traits and relationships between muscle characteristics and palatability in a random sample of pork carcasses. *J Anim Sci.* 1988;66(2):385-95.
498. Eikelenboom G, Van der Wal P, De Vries A, editors. The significance of ultimate pH for pork quality. *Annual International Congress of Meat Science and Technology*; 1995.
499. Petričević A, Kralik G, Kušec G, editors. Relation between important indicators of the pig meat quality. *44th International Congress of Meat Science and Technology*; 1998.
500. Vidal M, Mullen A, Troy D, Buckley D, editors. Early postmortem pH measurements as indicators of meat quality. *International Congress of Meat Science and Technology*; 1998.
501. Bidner B, Ellis M, Brewer M, Campion D, Wilson E, McKeith F. Effect of ultimate pH on the quality characteristics of pork. *Journal of Muscle Foods.* 2004;15(2):139-54.
502. Hamilton D, Miller K, Ellis M, McKeith F, Wilson E. Relationships between longissimus glycolytic potential and swine growth performance, carcass traits, and pork quality. *J Anim Sci.* 2003;81(9):2206-12.
503. Segura J, Calvo L, Óvilo C, González-Bulnes A, Olivares A, Cambero M, et al. Alternative method for intramuscular fat analysis using common laboratory equipment. *Meat science.* 2015;103:24-7.
504. Castro-Rios K, Narvaez-Solarte W. Sensory quality and cooking loss in pork meat: effect of sex and source of selenium. *Biotechnología en el sector agropecuario y agroindustrial.* 2013;11(1):130-5.
505. Martinaud A, Mercier Y, Marinova P, Tassy C, Gatellier P, Renerre M. Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *J Agric Food Chem.* 1997;45(7):2481-7.
506. Santé-Lhoutellier V, Engel E, Aubry L, Gatellier P. Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat science.* 2008;79(4):777-83.
507. Aksu Mİ, Aktas N, Kaya M, Macit M. The effects of vitamin E supplementation on the myofibrillar protein of male Morkaraman lambs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.* 2003;27(4):987-90.
508. Servais S, Letexier D, Favier R, Duchamp C, Desplanches D. Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med.* 2007;42(5):627-35.
509. Mercier Y, Gatellier P, Renerre M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science.* 2004;66(2):467-73.
510. D'Astous-Pagé J, Gariépy C, Blouin R, Cliche S, Sullivan B, Fortin F, et al. Carnosine content in the porcine longissimus thoracis muscle and its association with meat quality attributes and carnosine-related gene expression. *Meat science.* 2017;124:84-94.
511. Reig M, Aristoy M-C, Toldrá F. Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food chemistry.* 2013;140(3):478-82.
512. Decker EA, Crum AD. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat science.* 1993;34(2):245-53.

513. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological reviews*. 2013;93(4):1803-45.
514. Dosler D, Polak T, Zlender B, Gasperlin L. Relation of myofibril fragmentation to textural and chemical parameters of aged pork Longissimus dorsi. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2007;90:5-16.