



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
VETERINARIA**

Análisis, cuantificación y comparación del perfil de aminoácidos en dos razas de ganado bovino.

Alumna: Concepción Sánchez Romero

Tutor: Juan Carlos Gardón Poggi

Curso académico: 2020-2021



**Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales**
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis padres, Fernando y María José por ser mi apoyo diario durante todos estos años. A mi hermana, Ana, por darme siempre sus mejores consejos y empujarme a seguir luchando por mis sueños. Les estoy profundamente agradecida, son y serán mis pilares fundamentales, sin ellos no podría haber emprendido este viaje.

A toda mi familia, por seguir cuidando de mí en la distancia, por todos los viajes para ir a verme y por hacerme sentir cerca, aunque estuviera lejos de ellos.

A mis compañeras de piso, por hacer de un piso de estudiantes un hogar. Por las tardes de biblioteca juntas, por las mañanas de estudio y por ser un apoyo constante.

A los amigos que me ha dado la carrera, gracias a ellos he disfrutado de los años de universidad y de Valencia, realmente son lo mejor que me llevo de esta etapa.

A mi tutor, Juan Carlos, por guiarme durante el desarrollo del trabajo, y por su paciencia. A Joaquín Fayos, por brindarme su ayuda para que pudiera entender cada paso del procedimiento.

Índice

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. RAZAS PRODUCTORAS DE CARNE EN ESPAÑA.....	3
1.2. CALIDAD DE LA CARNE.....	4
1.3. VALOR NUTRICIONAL DE LA CARNE.....	5
1.4. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN CARNE DE GANADO VACUNO.....	6
1.4.1. <i>Hidrlisis de los aminoácidos.</i>	7
1.4.2. <i>Separación de los aminoácidos usando cromatografía.</i>	7
1.4.3. <i>Derivatización de aminoácidos.</i>	11
1.5. ELEMENTOS QUE AFECTAN O ALTERAN EL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS DE LA CARNE.....	11
1.5.1. <i>Cambios en el nivel de aminoácidos según la raza</i>	12
1.5.2. <i>Cambios en el nivel de aminoácidos según la nutrición.</i>	13
1.5.3. <i>Cambios en el nivel de aminoácidos según el sexo.</i>	13
1.5.4. <i>Cambios en el nivel de aminoácidos según la edad al sacrificio.</i>	14
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
1.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO.....	16
1.2. ANIMALES.....	16
1.2.1. <i>Animales objeto de estudio</i>	16
1.2.2. <i>Alojamiento</i>	16
1.2.3. <i>Alimentación</i>	17
1.2.4. <i>Plan sanitario y manejo</i>	17
1.3. ANÁLISIS DE LABORATORIO:.....	18
1.3.1. <i>Obtención de las muestras de carne en matadero y conservación de estas hasta su estudio:</i>	18
1.3.2. <i>Preparación de las muestras:</i>	18
1.3.2.1. <i>Proceso de extracción de proteínas, grasa y cenizas.</i>	18
1.3.2.2. <i>Hidrólisis ácida / básica de las proteínas de nuestras muestras:</i>	20
1.3.3. <i>Determinación de aminoácidos por HPLC</i>	22
1.3.3.1. <i>Determinación de aminoácidos tras la hidrólisis ácida.</i>	22
1.3.3.1.1. <i>Calibración del equipo.</i>	22
1.3.3.1.2. <i>Análisis de las muestras a evaluar</i>	26
1.3.3.2. <i>Determinación del triptófano</i>	26
1.3.4. <i>Cuantificación de aminoácidos</i>	27
1.3.4.1. <i>Cuantificación de aminoácidos de hidrólisis ácida.</i>	27

1.3.4.2. Cuantificación del triptófano	28
1.4. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSIÓN	35
6. CONCLUSIONES	39
7. BIBLIOGRAFÍA	40

Índice de tablas:

Tabla 1: Grado de calidad de la canal en Japón (Motoyama et al., 2016).....	4
Tabla 2: Categorías de calidad USDA (USDA, 2017).....	5
Tabla 3: Ración diaria de alimento	17
Tabla 4: Tabla de gradientes de elución.	23
Tabla 5: Factores de corrección de cada aminoácido.....	25
Tabla 6: Diluciones de triptófano	29
Tabla 7: Miligramos de aminoácidos por cien gramos de carne fresca cruce de Wangus...	32
Tabla 8: Miligramos de aminoácidos por cien gramos de carne fresca en Wagyu.	33
Tabla 9: Media aritmética y desviación típica de la cantidad de cada aminoácido en ambas razas.	34

Índice de figuras:

Figura 1: Reacción de derivatización del AQC.....	10
Figura 2: Hidrólisis del exceso de AQC.....	10
Figura 3: Parque de la ganadería Mudéjar – Wagyu de 80 m2.	16
Figura 4: Placas de Petri con las muestras frescas pesadas y troceadas.	18
Figura 5: Vertido del éter dietílico sobrante a la placa de petri 1.	19
Figura 6: Muestra seca y sin grasa en papel de aluminio.	19
Figura 7: Ampollas de vidrio abiertas con 100 mg de muestra.	20
Figura 8: Ampollas de vidrio selladas en el interior de la mufla a 110 °C.....	21
Figura 9: Ampollas de vidrio, abierta y cerrada a la llama.....	21
Figura 10: Stock de aminoácidos.	22

RESUMEN

El valor nutricional de la carne está determinado por el contenido de nutrientes necesarios para el cuerpo humano. Estos son; vitaminas, minerales, grasas, agua, carbohidratos y proteínas. La carne como producto proteico, está determinada por el balance de la composición de aminoácidos (aa). Los objetivos del presente estudio fueron 1: Poner a punto y cuantificar, mediante cromatografía de altas presiones de fase reversa (HPLC), el perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales en la carne de vacuno; y 2: evaluar las diferencias en el perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales de 2 razas de ganado vacuno. Fueron utilizados un total de 27 animales, 15 animales fueron de la raza bovina Wagyu (WA) y 12 del cruce de esta con Aberdeen-Angus, a lo que se llamó Wangus (WN). Al momento del sacrificio los animales tenían entre 22 y 47 meses de edad. Se analizó el músculo *Longissimus dorsi*. Los pasos para la determinación de aminoácidos fueron: hidrólisis ácida con HCL 6 N a 110 °C durante 24 horas; derivatización precolumna con 6 – aminoquinolyl – N - hydroxysuccinimidyl carbamate; cromatografía de altas presiones de fase reversa y detección por fluorescencia a 250 y 395 nanómetros (nm). Para la determinación del triptófano se llevó a cabo otro procedimiento: hidrólisis con NaOH 6N a 100 °C durante 4 horas, cromatografía de altas presiones de fase reversa y detección por espectrofotometría a 280 nm. Los resultados generales muestran que no existen diferencias significativas entre ambas razas (P=0.54). La cantidad de prolina e histidina fue mayor para la raza WA y la cantidad de tirosina fue mayor para la raza WN (P<0.95).

Palabras clave: Aberdeen Angus, Wagyu, aminoácidos, HPLC.

Abstract

The nutritional value of meat is determined by the content of nutrients that are necessary for the human body. These are; vitamins, minerals, fats, water, carbohydrates, and proteins. Meat as a protein product is determined by the balance of the amino acid composition. The objectives of the present study were: To fine-tune and quantify the profile of beef essential and non-essential amino acids by reverse phase high-pressure chromatography (HPLC) the profile of essential and non-essential amino acids in beef, and 2: evaluate the differences in the essential and non-essential amino acid profile on 2 breeds of cattle. A total of 27 animals were used, 15 animals were from the Wagyu bovine breed (WA) and 12 from the crossing of WA with Aberdeen-Angus, which was called Wangus (WN). The animals were between 22 and 47 months old. The muscle analysed was the *Longissimus dorsi*. The steps for the determination of amino acids were: acid hydrolysis with 6 N HCL at 110 °C for 24 hours, precolumn derivatization with

6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate; reverse phase high-pressure chromatography and fluorescence detection at 250 and 395 nm. For the determination of tryptophan another procedure was carried out: hydrolysis with 6N NaOH at 100 ° C for 4 hours, reverse phase high-pressure chromatography and, detection by spectrophotometry at 280 nm. The results show that the amount of proline and histidine was higher for the WA breed and the amount of tyrosine was higher for the WN breed ($p < 0.95$). The general results show that there are no significant differences between both breeds ($P < 0.95$).

Keywords: Aberdeen-Angus, Wagyu, Amino acids, HPLC.

1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Razas productoras de carne en España

En España, las razas bovinas son numerosas dada su importancia en la producción de carne. Dentro de las producciones ganaderas de España, el bovino se encuentra en el tercer lugar en cuanto a producción, según datos de enero de 2019 (MAPAMA, 2019).

Las diferentes razas bovinas, productoras de carne, empleadas en España se pueden agrupar según su procedencia. En primer lugar, están las razas autóctonas de fomento, estas son razas de origen español; Asturiana de los Valles, Asturiana de la Montaña, Avileña, Morucha, Parda de la Montaña, Pirenaica, Retinta y Rubia Gallega. En segundo lugar, se encuentran las razas integradas en España: *Blonde d'Aquitaine*, Charolais, Fleckvieh y Limousin. Por último, podemos considerar las razas procedentes de terceros países, cómo son Wagyu y Aberdeen-Angus (MAPAMA, 2019).

La raza de bovino de carne Wagyu es originaria de Japón. En la antigüedad, estos animales fueron utilizados como animales de tiro, gracias a sus patas cortas y fuertes, por ese motivo fueron criados como animales domésticos. Posteriormente, gracias a la tecnificación de la agricultura y a la cultura popular de comer carne de res en Japón se llevó a cabo una mejora de la genética de esta raza y pasó a ser una raza productora de carne (Motoyama et al. 2016). Tras su registro por la UNESCO como patrimonio cultural inmaterial en 2013, la carne de esta raza ha ido ganando popularidad entre los gourmets de todo el mundo. De acuerdo con esta tendencia, Wagyu ha sido atraída hacia el mercado mundial de la carne de vacuno.

Aberdeen Angus o Angus es una de las razas bovinas de aptitud cárnica más conocidas a nivel mundial. El origen de esta raza está en Escocia en las áreas de Aberdeenshire y de Angusshire. Presenta un óptimo biotipo de raza productora de carne ya que es un animal voluminoso, no muy largo y de tamaño moderado. Además, es ancho (especialmente en las regiones posteriores a la mitad del dorso) y de buena profundidad, cuenta con contornos redondeados y musculosos. Si a todo esto se le suma: la excelencia de su carne; su eficiencia de conversión del alimento en peso vivo; el elevado rendimiento de la canal y el hecho de que el color negro y la ausencia de cuernos sean caracteres dominantes, da lugar a que esta raza se haya ganado merecida reputación en la producción de carne de res (Briggs, 1980).

1.2. Calidad de la carne

La calidad de un producto es un término complejo de definir de manera general. Sobre todo, considerando que es la preferencia del que consume dicho producto, la que le confiere determinada calidad (Lunt et al., 1992).

Para la carne de Wagyu existe un estándar de calidad creado por la Asociación Japonesa de Clasificación de Carne, aprobado por el Director General de la Oficina de Producción Agrícola del Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca (MAFF) (Motoyama et al., 2016). Desde el punto de vista de la calidad y productividad de la carne las canales son evaluadas mediante dos índices; el rendimiento y el grado de calidad. El rendimiento es la ratio carne/canal y está clasificado en tres grados (A, B y C) dependiendo de las siguientes cuatro categorías; el área del músculo *Longissimus thoracis*; el grosor de la costilla; el peso de la canal fría dividida en dos y el grosor de la grasa subcutánea (Lunt et al., 1992). La calidad está categorizada de 1 a 5 (valores más altos indican mayor calidad), dependiendo de: el grado de infiltración intramuscular de grasa y el color del músculo *Longissimus dorsi*. También se tienen en cuenta el aroma, el brillo, la firmeza y textura de la carne (tabla 1) (Motoyama et al., 2016).

Tabla 1: Grado de calidad de la canal en Japón (Motoyama et al., 2016).

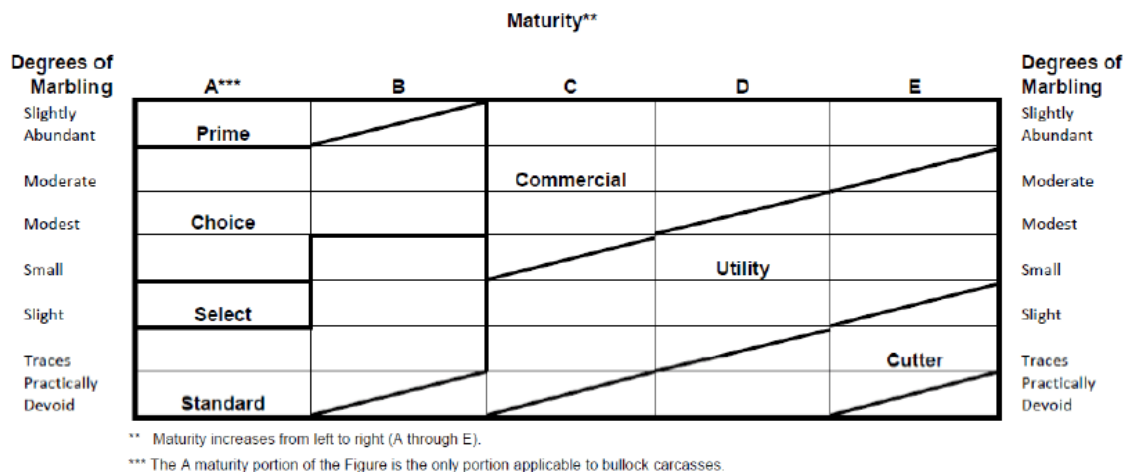
Carcass grading in Japan.

		Quality Grade				
		5	4	3	2	1
Yield Grade	A	A5	A4	A3	A2	A1
	B	B5	B4	B3	B2	B1
	C	C5	C4	C3	C2	C1

Por otro lado, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) redactó el estándar de clasificación de la carne en Estados Unidos. Este estándar uniformó los rendimientos de las canales y su clasificación para mejorar la comercialización de la carne. Las clasificaciones de calidad están determinadas por el veteado de grasa en el lomo y la madurez de las canales. Este estándar posee 8 categorías de calidad; Prime, Choice, Select, Standard, Commercial, Utility, Cutter y Canner. Las primeras 4 categorías corresponden a animales jóvenes menores de 42 meses. Las otras categorías corresponden a animales de una edad fisiológica superior a 42 meses. El marmoleo se determina en el músculo *Longissimus dorsi*, al cortar la canal entre las costillas 12 y 13. La madurez fisiológica se determina por el grado de osificación de la columna,

el color y forma de los huesos de las costillas y el color y textura del *Longissimus dorsi* (USDA, 2017).

Tabla 2: Categorías de calidad USDA (USDA, 2017).



Además, Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la calidad de la carne también se define en función de su calidad composicional.

1.3. Valor nutricional de la carne

El valor nutricional de la carne está determinado por el contenido de nutrientes necesarios para el cuerpo humano (Kolchina y Alekseeva, 2019). Estos son; vitaminas, minerales, grasas, agua, carbohidratos y proteínas. La carne como producto proteico, está determinada por el balance de la composición de aminoácidos (Kolchina y Alekseeva, 2019). Los aminoácidos son compuestos químicos a partir de los cuales se sintetizan todas las proteínas de los organismos vivos. Los aminoácidos se dividen en esenciales, los cuales el organismo humano no es capaz de sintetizar, estos son: valina, treonina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, alanina e histidina, y no esenciales, tales como: aspartato, ácido aspártico, glicina, glutamina, ácido glutámico, prolina, serina y tirosina (Vopálenský et al., 2017).

El valor nutritivo de los alimentos para humanos y animales es de gran importancia en la actualidad, es por esto que el análisis de aminoácidos (aa) encuentra aplicación en muchos campos de investigación. La elevada demanda de información relacionada con el valor nutricional de los alimentos, ha dado lugar al desarrollo de métodos cada vez más precisos para la determinación de distintos componentes, incluidos los aminoácidos (Wu et al., 2016).

En la pasada década, el consumo de carne de vacuno en España ha disminuido más de un 18 % (MAPAMA, 2020). Esta reducción puede ser resultado del desconocimiento de la importancia de la carne como fuente de proteínas (Wu et al., 2016).

Como bien se sabe, tras el consumo de la carne, los aminoácidos libres son rápidamente absorbidos mientras que las proteínas son fácilmente hidrolizadas en péptidos y en aminoácidos libres, los cuales también serán absorbidos en el intestino (Pérez-Palacios et al., 2014). En humanos, esta absorción de los aminoácidos proporciona numerosos beneficios. Una adecuada provisión de aa mejora la síntesis de proteínas musculares y disminuye el riesgo de sarcopenia en ancianos (Riddle et al., 2016). Además, la arginina reduce la obesidad y mejora la disfunción cardiovascular (McKnight et al., 2010). Una dieta que incluya taurina es esencial en niños y adultos para mantener las funciones retinal y cardiaca correctas, además de tener una función antiobesidad, antidiabética y con efectos anticancerígenos (Wu et al., 2013). Así mismo, la carnosina y la glutamina son potentes antioxidantes para las células (Hipkiss et al., 1997). La glutamina libre más el glutamato, presentes en la carne de vacuno, juegan un papel importante como combustibles metabólicos en funciones vitales como moduladores de la respuesta inmune, estimulación de la síntesis de proteínas, regulación de la integridad del epitelio intestinal y su función (Wu et al., 2009).

El porcentaje de proteína presente en 100 gramos de carne de vacuno oscila entre 63 a 68 %, mientras que la mayoría de las plantas tienen menos de un 12 % de proteína en su composición. Es por esto que tiene deficiencias en algunos aminoácidos, incluyendo la lisina, metionina, cisteína, triptófano, treonina y glicina (Young y Pellet, 1994). La ausencia de algunos aminoácidos en las proteínas de las plantas contribuye a la importancia de adquirir estos de otras fuentes. Es el caso de la taurina, la cual se debe obtener de fuentes de origen animal (Jeong et al., 2012). Lo ideal para llevar una vida sana y saludable sería ingerir de 3 a 4 raciones de carne de calidad a la semana, combinándola con una alta ingesta de vegetales (Ríos C., 2019). Además de su valor nutricional, los aminoácidos influyen en la palatabilidad de la carne, en su sabor y en la generación de compuestos volátiles (Pérez-Palacios et al., 2014).

1.4. Determinación de aminoácidos en carne de ganado vacuno

El análisis de aminoácidos en la carne requiere de varios pasos. En primer lugar, la liberación de los aminoácidos de la matriz de la proteína. En segundo lugar, la separación de estos de forma individual, y por último su cuantificación usando estándares de calibración (Otter, 2011). Los

pasos son; hidrólisis de aminoácidos, separación de los aminoácidos usando cromatografía y derivatización de los aminoácidos (Otter, 2011).

1.4.1. Hidrólisis de los aminoácidos

La hidrólisis de aminoácidos consiste en la liberación de los diferentes aminoácidos de la proteína que forman. El método más utilizado es la adición de HCL 6 normal (N) a la muestra, sellado al vacío y posterior calentamiento a 110 °C durante 24 horas. (Holló et al., 2001; Holló et al., 2007; Wu et al., 2016). Este método se ha mantenido sin cambios desde 1954 (Stein et al., 1954).

Otter, (2011) evaluó diferentes métodos de hidrólisis de las proteínas intentando sustituir o mejorar el método anteriormente descrito (HCL 6M 110°C durante 24 horas). Los diferentes métodos analizados fueron dos. El primero estaba basado en resinas de intercambio catiónico fuertes, que funcionaron como catalizadores ácidos para la hidrólisis de proteínas cuando se calientan en presencia de agua. El segundo método se hizo mediante hidrólisis ácida asistida por microondas. Se concluyó que no había mejoras suficientes que pudieran mejorar el método estándar.

Se ha reconocido que las condiciones de hidrólisis estándar no son adecuadas para la extracción de todos los aminoácidos, ya que algunos de estos son inestables, por ejemplo, los aminoácidos sulfurados (cisteína y metionina) y el triptófano. Esto ha resultado en el desarrollo de condiciones de hidrólisis variables para estas excepciones (Otter, 2011). En particular, la determinación del triptófano en el alimento es esencial ya que, al igual que la lisina, cisteína y metionina, es el aminoácido en menores concentraciones. Por lo tanto, para poder realizar la hidrólisis de este aminoácido se lleva a cabo una hidrólisis básica. Las muestras son hidrolizadas con hidróxido sódico 4 N, selladas en tubos de hidrólisis e incubadas a 100°C durante 4 horas (Yust et al., 2003).

1.4.2. Separación de los aminoácidos usando cromatografía

El análisis de aminoácidos ha sido una parte integral del análisis bioquímico durante más de 70 años (Alterman y Hunziker, 2012). Este análisis, fue originariamente desarrollado por Moore y Strein, en 1958, cuando aplicaron la cromatografía de líquidos para determinar aminoácidos, utilizando una columna de intercambio iónico y reacción de oxidación postcolumna (tras el análisis cromatográfico) con ninhidrina. Los aminoácidos sólo se detectan parcialmente mediante detectores de luz ultravioleta y por lo general, deben derivatizarse químicamente

antes del análisis. Dicha derivatización puede realizarse antes (precolumna) o después de la separación cromatográfica (postcolumna) de los aminoácidos (Manning, 1993). Debido a que el triptófano se absorbe fuertemente a 280 nm, puede ser analizado individualmente por detección UV tras la hidrólisis alcalina mediante cromatografía, sin derivatización (Yust et al., 2003; Peace et al., 2005).

Existen diferentes técnicas empleadas en el análisis de aminoácidos, pese a que hay numerosos avances con el paso de los años, los métodos más utilizados han sido: cromatografía de intercambio iónico (IEC) (Pérez-Palacios et al., 2015); cromatografía líquida de altas presiones de fase reversa (HPLC) (Csapó et al., 1989); cromatografía de gases (CG) (Yagües, 2008) y electroforesis capilar (EC) (Gilani et al., 2008).

1.4.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

Tradicionalmente, esta ha sido la técnica principal para analizar aminoácidos libres en matrices de alimento (Pérez-Palacios et al., 2015).

En este método, dos bombas de precisión liberan continuamente volúmenes constantes de eluyentes, a elevadas presiones. Por un lado, una bomba libera eluyentes tamponados a las columnas de intercambio catiónico y la otra bomba, añade ninhidrina al flujo de aminoácidos que van saliendo de la columna. La ninhidrina actúa como agente derivatizante postcolumna, descarboxila y desamina los aminoácidos. Esto lo hace mediante la oxidación de los aa, liberando el grupo amino como amonio. La forma reducida de la ninhidrina, llamada hidrindantina, reacciona con las aminas libres para producir un derivado púrpura que absorbe a 550-570 nanómetros (nm). Las aminas secundarias como la prolina y la hidroxiprolina reaccionan de manera similar, pero producen un cromóforo amarillo que se mide a 440 nm. Para acelerar la reacción con ninhidrina son requeridas altas temperaturas (125-135 °C) (Gilani et al., 2008).

Holló et al. (2007), analizaron sus muestras mediante este método, para ello se usaron tres buffers de sodio. El primer buffer de sodio (0,3 0 M Na, pH = 3.50) fue usado para la elución de los siguientes aminoácidos: ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, cisteína, glicina, alanina y valina. El segundo buffer de sodio (0,4 M Na, pH = 4.25) fue usado para la elución de la metionina, isoleucina y leucina. El tercer buffer de sodio (1.12 M Na, pH = 7.9) fue usado para la elución de la tirosina, isoleucina, histidina, lisina y arginina. La tasa de flujo de los buffers fue de 50 cm² / h y la tasa de flujo de la ninhidrina fue de 25 cm³ / h. La determinación

de los aminoácidos fue realizada con una derivatización post columna con ninhidrina, con una detección fotométrica a 570 nm para todos los aminoácidos y a 440 nm para la prolina.

1.4.2.2. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es otra alternativa a métodos de análisis de aminoácidos, especialmente cuando las muestras son de volúmenes pequeños y se requiere una alta sensibilidad (Peace et al., 2005).

En la cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC). La cromatografía gas-líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia normalmente como cromatografía de gases (GC) (Yagües, 2008).

1.4.2.3. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica en la que se separan diferentes moléculas presentes en una disolución, en este caso aminoácidos. Esta técnica consta de un capilar de separación en el que se encuentra la disolución que contiene los aminoácidos y el tampón que es el encargado de conducir la corriente eléctrica. La separación se lleva a cabo según la relación masa/carga de las distintas moléculas. Para que esto sea posible es necesario aplicar una diferencia de potencial eléctrico entre los dos extremos del capilar que hará que las moléculas se muevan hacia un extremo u otro del capilar y que se vayan separando entre sí (Gilani et al., 2008).

1.4.2.4. Cromatografía líquida de alta presión de fase reversa

En el HPLC de fase reversa, se lleva a cabo una derivatización precolumna. En la mayoría de los casos, esta se realiza mediante el reactivo 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). Este producto reacciona con los aminoácidos esenciales y no esenciales y los transforma en aductos fluorescentes altamente estables con una fuerte fluorescencia a 395 nm (Figura 1).

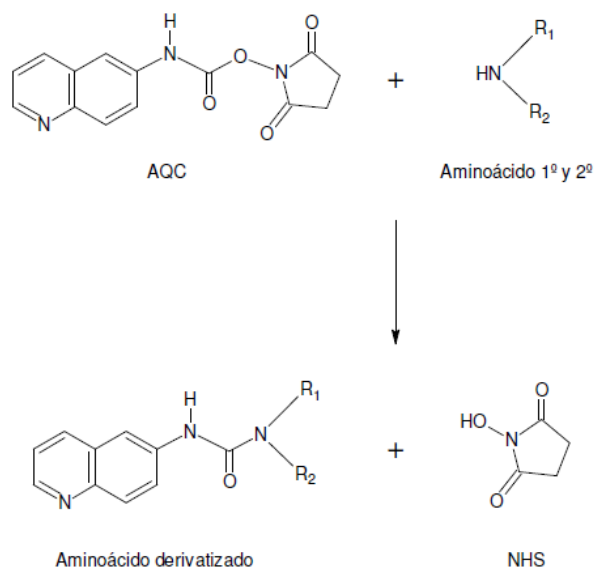


Figura 1: Reacción de derivatización del AQC.

El exceso del reactivo se hidroliza durante la reacción para formar 6 – aminoquinolina (AMQ) (Figura 2) cuyas características espectrales son netamente diferentes a cualesquiera de los aminoácidos derivatizados. Ello permite programar una longitud de onda que maximice la respuesta de emisión de los derivados y reduzca al mínimo la respuesta del AMQ. En esta hidrólisis del reactivo también se forma N-hidroxisuccinimida (NHS) y dióxido de carbono, pero éstos no interfieren en el análisis cromatográfico. La destrucción del exceso de reactivo es completada en un minuto.

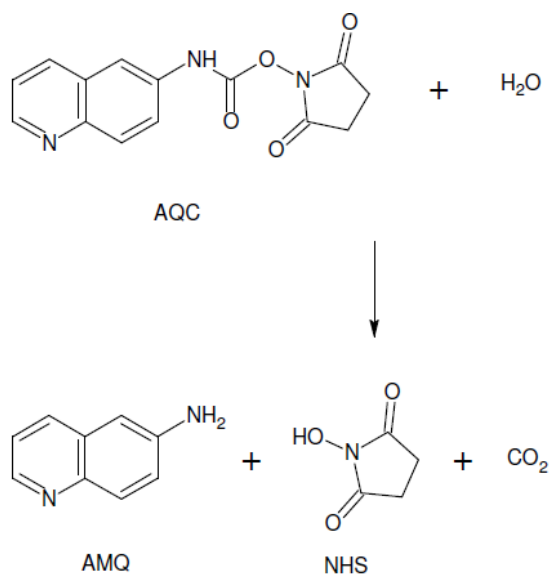


Figura 2: Hidrólisis del exceso de AQC

Tras la derivatización, se lleva a cabo el análisis mediante cromatografía líquida de alta presión de fase reversa. La muestra a analizar pasa por la columna cromatográfica mediante el bombeo de líquido (fases móviles) a alta presión. Las fases móviles se forman haciendo gradientes de elución, unos hidrofílicos y otros lipofílicos. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades en la columna y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de su polaridad. Debido a que el conjunto de los aminoácidos presenta una amplia gama de polaridades, para resolverlos en un solo cromatograma se necesita variar la composición de la fase móvil a lo largo de la separación, aumentando su poder de elución. De esta forma, mediante el empleo de un gradiente de polaridad, se consigue separar todos los compuestos en un tiempo razonable (Gilani et al., 2008).

La cromatografía líquida de alta presión, normalmente, usa columnas basadas en sílice C8 o C18 de fase reversa. Este método es más simple, más rápido, tiene mayor sensibilidad y utilizan sistemas menos costosos que IEC (Gilani et al., 2008).

1.4.3. Derivatización de aminoácidos

Como se ha mencionado anteriormente, en algunos métodos, los aminoácidos pueden derivatizarse antes o después del análisis.

Según Gilani et al. (2008), los reactivos más utilizados para la derivatización precolumna son: Phenylisothiocyanate (PITC); o-phthalaldehyde (OPA); 5-dimethylamino-1-naphthalene; sulfonyl chloride (DABS-CL); 9-fluorenylmethyl chloroformate (F-MOC); y 6-aminoquinoyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC).

Por otro lado, el reactivo más usado para la derivatización postcolumna es la ninhidrina, pero también se utilizan los reactivos o-phthalaldehyde (OPA) y fluoescamina (Gilani et al. 2008).

1.5. Elementos que afectan o alteran el contenido de aminoácidos de la carne

El nivel de aminoácidos en el tejido muscular es relativamente constante. A pesar de ello, se han mencionado diferencias; según la raza (Hollo et al., 2007; Jeong et al., 2012), el sexo (Hollo et al., 2001), la edad y la nutrición (Hollo et al., 2007, Muhlisin et al., 2015 y Koutsidis et al., 2008).

1.5.1. Cambios en el nivel de aminoácidos según la raza

Hollo et al. (2001), analizaron el perfil de aminoácidos, esenciales y no esenciales, y el valor biológico de las proteínas del músculo *Longissimus dorsi* de dos razas europeas, Hungarian Simmental y Holstein-Friesian. Las muestras se analizaron mediante HPLC con las siguientes condiciones: dimensiones de columna 500 x 6 mm, temperatura de la columna de 50 °C; resina de intercambio iónico Chromex UA-8; tasa de flujo del buffer 80 cm³, tasa de flujo de ninhidrina 40 cm³. Se concluyó que no había diferencias significativas entre razas.

Jeong et al. (2012), compararon los aminoácidos libres del *Longissimus lumborum* de novillos Hanwoo, Holstein Friesian y Aberdeen Angus o Angus, engordados en Corea. El análisis se llevó a cabo mediante HPLC con las siguientes condiciones: el método DAD detector, 262 nanómetros (nm), 338 nm; Columna, Zorbax Eclipse Analysis Amino Acid, 4,6 x 60 mm, 5 µm; temperatura de la columna, 40 °C; fase móvil A, 40 ml de fosfato sódico, ph 7,8; fase móvil B, acetonitrilo: metanol: agua 45:45:10. En términos generales, el resultado del estudio fue que no había diferencias significativas entre las diferentes razas. Sin embargo, hallaron leves diferencias en la cantidad de ácido glutámico, serina, glicina y treonina comparando Hanwoo y Angus con Holstein Friesian. Por un lado, el porcentaje de ácido glutámico en Angus y Hanwoo es significativamente mayor que en Holstein. Por otro lado, Angus tiene mayor porcentaje de serina, glicina y treonina que Holstein Friesian.

En 2016, Koshchayev et al. (2016), compararon el perfil de aminoácidos en terneros de carne. Estas razas fueron Charolais, Aberdeen Angus y Hereford. Las muestras fueron analizadas usando el sistema de electroforesis capilar. Al igual que en el resto de estudios, las muestras se tomaron del músculo *Longissimus dorsi*. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias significativas entre las diferentes razas. En cambio, la cantidad de glicina, serina, prolina e histidina fue menor en Hereford que en el resto de razas.

Vopálensky et al. (2017), analizaron y compararon perfiles de aminoácidos en toros clínicamente sanos, criados en las mismas condiciones y con el mismo peso al sacrificio de doce razas de vacuno de carne. Las razas utilizadas fueron: Aberdeen Angus, Belgian Blue-White, Blonde d'Aquitaine, Galloway, Gasconne, Hereford, Highland, Charolais, Limousine, Simmental, Piemontese y Salers. La técnica usada fue la cromatografía de intercambio iónico basada en la reacción de color obtenida tras la oxidación de los aminoácidos con ninhidrina. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la cantidad de los aminoácidos esenciales valina, metionina y arginina, estos aminoácidos se encontraban en mayor cantidad para

Gasconne. Por otro lado, la cantidad de aminoácidos no esenciales también variaba siendo mayor el ácido glutámico en Gasconne que en el resto de razas.

Un estudio reciente (Alekseeva and Kolchina, 2019), ha mostrado que valor biológico de las proteínas es mayor en la raza Aberdeen-Angus respecto de Hereford. Concretamente se comparó la relación triptófano: hidroxiprolina y se demostró que disminuye cuando aumenta el contenido de proteínas de tejido conectivo de la carne. Por lo tanto, fue asociado con una disminución del valor nutricional de la misma.

1.5.2. Cambios en el nivel de aminoácidos según la nutrición

Varios autores han mostrado diferencias entre los sistemas de alimentación de producción intensivo y extensivo (Holló et al., 2007 y Nicastro et al., 2000). Por ejemplo, animales en extensivo alimentados con ensilaje de pasto y concentrado muestran cambios en la proporción de algunos de sus aminoácidos con respecto a animales de intensivo alimentados con ensilaje de maíz, heno y concentrado, enriquecido con un 25 % de harina de linaza al día (Holló et al., 2005). Los animales criados en extensivo muestran mayores cantidades de fenilalanina, leucina, treonina, cisteína y glicina (Holló et al., 2007).

Nicastro et al. (2000), analizaron la influencia de la dieta en el perfil de aminoácidos de los músculos *Longissimus thoracis* y *Semimembranosus* en la raza Chianina. El resultado indicó que el nivel de energía de la dieta no influyó en el perfil de aminoácidos en animales de 8 meses de edad.

En 2014, Griffiths (2014), evaluó el efecto de la ingesta de proteínas en la dieta sobre la deposición de aminoácidos en la carne de res. Se estudiaron 21 animales de la raza British Friesian, se hicieron tres grupos y cada uno se alimentó con 90 g, 125 g y 150 g de proteína cruda por kg de materia seca. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico y usando norleucina y ácido 2-amino-3-guanidino-propionico como estándar interno. Una mayor ingesta de proteínas en la dieta no afectó a la composición de aminoácidos esenciales o no esenciales en la canal, pero aumentó significativamente la tasa de deposición de estos.

1.5.3. Cambios en el nivel de aminoácidos según el sexo.

Varios estudios han demostrado que el género influye en la composición del perfil de aminoácidos en la carne de vacuno (Hollo et al., 2001; Molnár and Mólnar, 1981). Pese a esto,

hay varias controversias entre autores. Por un lado, hay autores que afirman que son los machos los que presentan más cantidad de aminoácidos esenciales (metionina, isoleucina, leucina, lisina, histidina y arginina), debido a la producción de andrógenos, que se traduce en un aumento de la actividad anabólica estimulando la síntesis proteica (Vopalensky et al., 2017) y por otro los que piensan de forma opuesta (Holló et al., 2001).

1.5.4. Cambios en el nivel de aminoácidos según la edad al sacrificio

En el año 2012, Jeong et al. (2012), demostraron que las cantidades de glicina, treonina, alanina, metionina, isoleucina y leucina, fue mayor en animales sacrificados con 18 meses respecto de los sacrificados con 14 meses. Esto puede ser debido a que la cantidad de aminoácidos libres aumentan con la edad, debido a las proteasas y lipasas que se liberan de los lisosomas con el envejecimiento celular (Geromen y Montgomery, 1980). Sin embargo, Holló et al. (2001), analizaron las diferencias entre las razas Simmental y Holstein, comparando diferentes pesos de sacrificio en cada una de ellas y concluyeron que no había diferencias significativas en ningún aminoácido, excepto para la lisina.

2. OBJETIVOS

1. Poner a punto y cuantificar, mediante HPLC, el perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales en carne de vacuno.
2. Evaluar las diferencias en el perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales en 2 razas de ganado vacuno.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Localización del establecimiento

La ganadería de bovino de carne Mudéjar-Wagyu está localizada en Aliaga, un municipio situado en el centro norte de la provincia de Teruel, perteneciente a la Comunidad Autónoma de Aragón, al este de España. Esta zona está caracterizada por ser una zona de montaña de gran altitud que determina la crianza de esta raza.

3.2. Animales

3.2.1. Animales objeto de estudio

Fueron estudiados un total de 27 animales de la raza bovina Wagyu (WA) y cruce de esta con Angus, a lo que se llamó Wangus (WN). Los animales, clínicamente sanos, tenían una edad comprendida entre los 22 y los 47 meses. Desde el nacimiento fueron criados y mantenidos bajo las mismas condiciones sanitarias, de manejo y alimentación.

3.2.2. Alojamiento

Las instalaciones de la explotación se organizaban en naves que se dividieron en parques de 80 m² (Figura 3). Desde los 6 a los 15 meses de edad se agrupaban a 15 animales en cada uno de los parques. A partir de esta edad y hasta el momento de ser destinados a matadero, los parques albergaban grupos de 8 animales.



Figura 3: Parque de la ganadería Mudéjar – Wagyu de 80 m²

3.2.3. Alimentación

Los animales requieren una dieta o ración que suministre los compuestos necesarios según sus necesidades. A partir de distintos ingredientes con los que contaba la explotación se realizó la ración para satisfacer las necesidades de mantenimiento y producción. Las proporciones de cada ingrediente se pueden visualizar en la tabla 3.

Tabla 3: Ración diaria de alimento

Ingredientes	Porcentaje
Cebadilla	45,66 %
Avena	11,42 %
Paja de cebada	15,22 %
Silo de triticale + Vicia sativa	8,9 %
Silo de avena + Vicia sativa	8,9 %
Silo de cebada + Vicia sativa	8,9 %
Carbonato	0,57 %
Sal	0,30 %
Corrector	0,19 %

3.2.4. Plan sanitario y manejo

En la empresa Mudejar-Wagyu se lleva a cabo un programa sanitario en el que se desarrolla un plan de desparasitación y de vacunación de todos los animales.

En adultos mayores de 18 meses los animales se vacunan frente a; Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (BOVILIS IBR MARKER VIVA); Diarrea Viral Bovina (BOVILIS BVD); Clostridiales (POLIBASCOL); Virus Sincitial Respiratorio, Parainfluenza y *Mannhemia haemolítica* (BOVIPAST RSP). Además, estos se desparasitan con; Closantel (Endoex) oral; Ivermectina (Noromectin) pour-on; Deltametrina (externo); Cipermetrina (externo).

3.3. Análisis de laboratorio:

3.3.1. Obtención de las muestras de carne en matadero y conservación de estas hasta su estudio

Al alcanzar una edad promedio de $38.9 \pm 5,10$ meses para Wagyu y $26,7 \pm 4,11$ meses para Wangus los animales fueron sacrificados en los mataderos de Don Jate, Mercavalencia y Mercazaragoza. Una vez realizado el despiece de las reses se llevó a cabo la toma de muestras. Para ello se tomaron dos cm^2 de carne del músculo *Longissimus dorsi* de cada animal, entre la sexta y la séptima costilla. Las muestras se congelaron a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

3.3.2. Preparación de las muestras

Previo a la determinación de los aminoácidos, las muestras se descongelaron dejándolas a temperatura ambiente durante 24 horas en papel de aluminio. Pasadas estas 24 horas, el agua superficial se secó manualmente con ayuda de un papel absorbente. Para determinar el peso húmedo las muestras se pesaron con una balanza analítica (BL 24 basic, modelo XS).

3.3.2.1. Proceso de extracción de proteínas, grasa y cenizas

Tras la eliminación de la grasa superficial y el troceado de las muestras con tijeras, se introdujeron en placas de Petri (Figura 4).

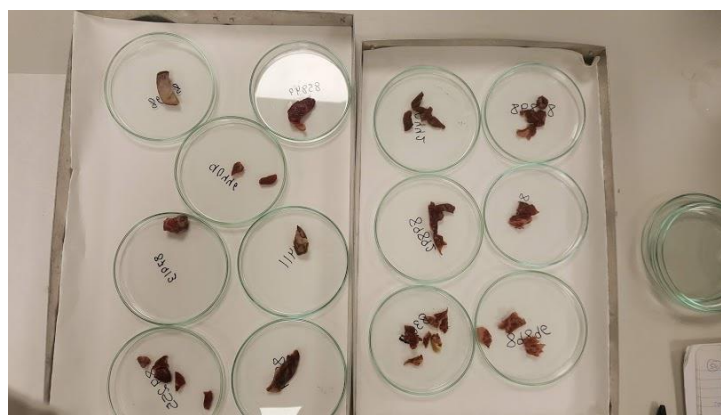


Figura 4: Placas de Petri con las muestras frescas pesadas y troceadas.

Posteriormente, se secaron en una estufa de secado por convección forzada (Binder, modelo FD 23 – 20L) a $150\text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora. Seguidamente, se pesaron las muestras para conocer la humedad y se picaron con un mortero. El grado de humedad se evaluó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad} = \frac{[(\text{Peso placa} + \text{muestra húmeda}) - (\text{Peso placa} + \text{muestra seca})] \times 100}{\text{Muestra}}$$

A continuación, se extrajo la grasa intramuscular de las muestras utilizando 5 ml de éter dietílico. A tal fin, se introdujeron las muestras en un vaso de precipitado y se agitó manualmente, este paso se repitió tres veces. Las muestras secas y sin grasa se pusieron en papel de aluminio previamente tarado (Figuras 5 y 6).



Figura 5: Vertido del éter dietílico sobrante a la placa de petri 1.



Figura 6: Muestra seca y sin grasa en papel de aluminio.

Se dejó secar la placa que contenía éter dietílico y el papel de aluminio con la muestra, ya sin grasa, bajo la campana de extracción de gases (Flores Valles, modelo VA 150810ADSG) durante 24 horas.

3.3.2.2. Hidrólisis ácida / básica de las proteínas de nuestras muestras

Para preparar una muestra para el análisis de aminoácidos, en primer lugar, se hidrolizaron las muestras y posteriormente se derivatizaron los aminoácidos. La hidrólisis es un proceso que permite transformar las proteínas en aminoácidos libres. Se llevaron a cabo dos tipos de hidrólisis; ácida y alcalina. La hidrólisis alcalina se realizó para la determinación del triptófano ya que tras la hidrólisis ácida este se degrada.

La carne libre de humedad y grasa, se molió en un mortero lo más fino posible. Seguidamente, se pesaron 10 mg del molido y se depositó en ampollas de vidrio (NAFVSM, modelo 24.480). Se llenaron dos ampollas por muestra con 10 mg cada una, para la hidrólisis ácida y la hidrólisis básica (ampollas número 1: hidrólisis ácida, ampollas número 2: hidrólisis básica) (Figura 7).



Figura 7: Ampollas de vidrio abiertas con 100 mg de muestra.

Posteriormente, se añadió 1 ml de HCL 6 N a las ampollas 1 (para la hidrólisis ácida), para la determinación de todos los aminoácidos. Para la determinación del triptófano se añadió un ml de NaOH 6 N a las ampollas 2 (para la hidrólisis básica).

Las ampollas de hidrólisis fueron selladas bajo la llama (Figura 9) y dejadas en una mufla (Nabertherm, modelo LE 2-11 – LE 14-11), a 112°C durante 24 horas (Figura 8). Finalizado este paso las ampollas se abrieron (Figura 9) y su contenido fue transferido mediante una pipeta monocanal de 100 microlitros (VWR collection, modelo 613-5258) a tubos Eppendorf.



Figura 8: Ampollas de vidrio selladas en el interior de la mufla a 112 °C

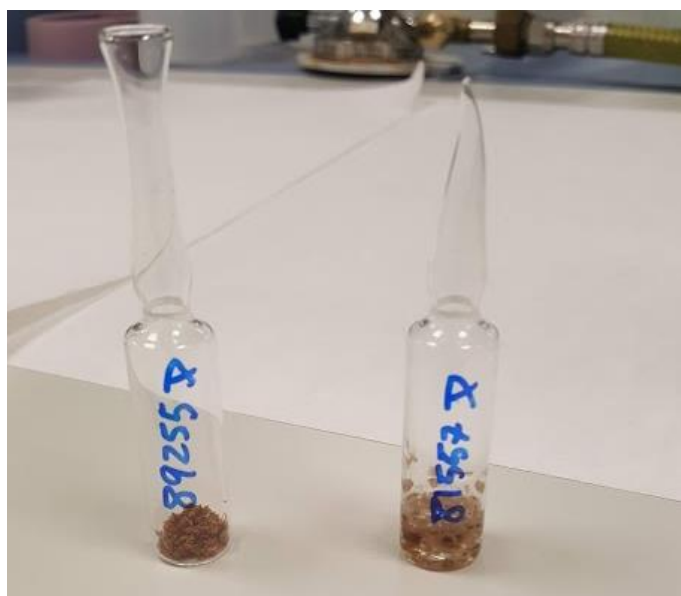


Figura 9: Ampollas de vidrio, abierta y cerrada a la llama.

Seguidamente los tubos Eppendorf fueron centrifugados (Ahrm Biosystems, modelo 342-3321) a 10.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante fue filtrado con filtros de jeringa (Acrodisc Supor, modelo 514-4122) con malla de 0,22 micrómetros y transferida a otro tubo Eppendorf (Figura 10). La resuspensión filtrada fue almacenada a – 20 °C hasta su posterior utilización.



Figura 10: Stock de aminoácidos

3.3.3. Determinación de aminoácidos por HPLC

3.3.3.1. Determinación de aminoácidos tras la hidrólisis ácida

El análisis de las muestras hidrolizadas con HCL 6N se llevó a cabo mediante High Performance Liquid Chromatography de fase reversa y se utilizó el kit de Waters AccQ Tag.

El kit Waters AccQ-Tag se compone de los siguientes elementos:

- Tampón de borato de flúor
- Polvo del reactivo de flúor: carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (ACQ)
- Diluyente del reactivo de flúor

3.3.3.1.1. Calibración del equipo

3.3.3.1.1.1. Condiciones cromatográficas

Antes del análisis fue necesario establecer las condiciones cromatográficas. Las fases móviles usadas para el análisis de HPLC tenían que estar libres de impurezas y burbujas por lo que ambas soluciones fueron sonicadas con un sonicador (Witeg). Se utilizaron como fases móviles un gradiente de dos eluyentes. El eluyente A se preparó agregando 100 ml de un tampón concentrado de ácido fosfórico en cada litro de agua ultra pura para HPLC. El eluyente B consistió en 600 ml de acetonitrilo más 400 ml de agua ultra pura para HPLC. El gradiente utilizado es el que figura en la tabla 4.

Tabla 4: *Tabla de gradientes de elución.*

Tiempo (min)	% Buffer A	% Buffer B
0.0	100.0	0.0
0.5	98.0	2.0
15.0	93.0	7.0
23.0	88.0	12.0
32.0	67.0	33.0
34.0	0	100.0
37.0	0	100.0
38.0	100.0	0.0

3.3.3.1.1.2. Preparación del estándar interno para la cuantificación

El estándar interno es un aminoácido no proteico que se añade a las muestras o los estándares con una concentración conocida. Concretamente es el ácido α -aminobutírico (α Aba) que se separó bien de los aminoácidos proteicos en el análisis cromatográfico por HPLC. Los estándares de aminoácidos se proporcionaban, también con una concentración conocida, lo que permitió conocer la relación entre los picos de cada aminoácido y el del estándar interno en los cromatogramas del análisis por HPLC. Se pudo así calcular factores de corrección en los análisis y conocer la concentración de cada aminoácido en las muestras problema.

Para preparar los estándares internos, se mezclaron en un Eppendorf 40 μ l de los estándares de aminoácidos aportados por kit de Waters (2,5 milimolar, mM) más 40 μ l del estándar interno α Aba, preparado a la misma concentración que los estándares del kit de Waters. A esta preparación se le añadieron 920 μ l de agua Mili-Q, quedando así preparados para introducir en los viales del inyector automático del HPLC.

3.3.3.1.1.3. Cálculo de la correlación entre los distintos aminoácidos de los estándares de calibración y del patrón interno

Para conocer la correlación entre las áreas de los diferentes aminoácidos en los cromatogramas del HPLC partimos de los estándares de calibración, de los cuales se conoce su

concentración. Ello permitió correlacionar las áreas de cada uno. Además, con la utilización de un patrón interno, que se utilizará también en las muestras a evaluar, podemos tomarlo como aminoácido de referencia. En el gráfico 1 se muestra un cromatograma tipo donde los aminoácidos (a excepción del triptófano) se detectan por fluorescencia.

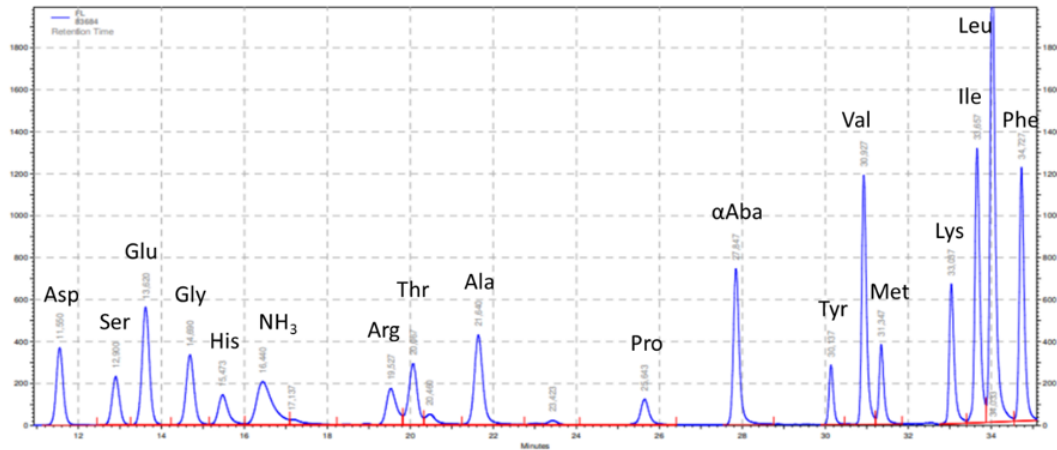


Gráfico1: Cromatograma de los estándares de aminoácidos

A partir del cromatograma de los estándares y de la medida de las áreas de cada pico se calculó el factor de corrección para cada aminoácido, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de corrección: } \frac{\text{Área aminoácido}}{\text{Área } \alpha\text{Aba}}$$

Este factor relaciona la absorbancia entre un nanomolar (nM) de cada aminoácido y un nM de alfa-aminobutírico (tabla 5).

Tabla 5: Factores de corrección de cada aminoácido

Aminoácidos	ÁREA (Ufx 10 ⁻⁶)	Factor de corrección
AA no esenciales		
Alanina	24,81	0,89
Aspartato	10,69	0,39
Ácido glutámico	12,04	0,43
Glicina	12,68	0,46
Prolina	8,06	0,29
Serina	13,61	0,49
Tirosina	17,17	0,62
AA esenciales		
Isoleucina	50,01	1,80
Leucina	52,6	1,89
Lisina	16,86	0,61
Metionina	31,21	1,12
Fenilalanina	67,66	2,44
Treonina	21,28	0,77
Valina	36,38	1,31
Histidina	18,04	0,65
Arginina	18,52	0,67
Patrón interno		
αABA	27,76	

3.3.3.1.2. Análisis de las muestras a evaluar

3.3.3.1.2.1. Preparación de las muestras

Las muestras problema se prepararon mezclando en un Eppendorf 40 µl de las reacciones de hidrólisis más 40 µl del estándar interno αAba, a esto se le añadieron 920 µl de agua Mili-Q.

3.3.3.1.2.2. Reacción de derivatización

Para derivatizar los aminoácidos (tanto de los estándares como de las muestras a evaluar) se introdujo en un Eppendorf 10 µl de las diluciones anteriores. Seguidamente, se añadieron 70 µl del buffer flúor borato (reagent 1 del kit) y se agitó vigorosamente mediante un vórtex durante 10 segundos.

Posteriormente, se añadieron 20 µl del reactivo ACQ previamente reconstituido y se agitó en el vórtex nuevamente otros 10 segundos. Las muestras se dejaron reposar durante un minuto a temperatura ambiente.

Seguidamente se usó una micropipeta de 10 microlitros (VWR collection, modelo 613-5258) para transferir el contenido de los tubos de las muestras al fondo de un vial de 2 ml con microinserto y posteriormente se taparon. La adición de un microinserto a los viales del inyector automático es una adaptación para trabajar con volúmenes pequeños.

3.3.3.1.2.3. Separación de los aminoácidos derivatizados

Los aminoácidos se separaron en una columna C18 de fase reversa (AccQ Tag, 3.9x150mm, Waters Co, Milford, EE. UU.) utilizando como fase móvil un gradiente de dos eluyentes, A y B. Se inyectaron 3 µl de muestra para cada análisis que se realizó en un tiempo de 50 minutos.

La detección de los aminoácidos se llevó a cabo con un detector de fluorescencia que se configuró para trabajar a 250 y 395 nm (longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente). Los datos fueron procesados con el programa EZChromeElite (Agilent, Santa Clara, EE.UU.).

3.3.3.2. Determinación del triptófano

3.3.3.2.1. Calibración del equipo

Para el análisis mediante HPLC se preparó un patrón de triptófano a una concentración de 2,45 nM en 1ml de NaOH 0,4 N. Se hicieron distintas diluciones (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/50).

En el HPLC, como eluyente se empleó una mezcla de acetato sódico 25 mM preparado con agua ultra pura para HPLC y acetonitrilo al 90%, en condiciones isocráticas y un flujo de 1 ml/min.

Se preparó el HPLC con la misma columna C18 de fase reversa utilizada para la separación de los aminoácidos de la hidrólisis ácida, según el método Waters AccQ-Tag descrito anteriormente. En este caso se usó el detector de absorbancia Photodiode Array.

3.3.3.2.2. Análisis de las muestras a evaluar

La degradación oxidativa del triptófano durante la hidrólisis ácida de las proteínas hace necesario utilizar un procedimiento distinto al de la hidrólisis ácida para poder cuantificar su cantidad en las muestras analizadas.

Para ello se siguió el protocolo descrito por Yust et al. (2004), que consistió básicamente en una hidrólisis alcalina (detallado en apartados 3.3.2.2.) de 10 mg de muestra de carne y cenizas. La separación del triptófano del resto de aminoácidos se llevó a cabo por HPLC de fase reversa y su detección por absorbancia se realizó a una longitud de onda de 280 nm.

3.3.4. Cuantificación de aminoácidos

3.3.4.1. Cuantificación de aminoácidos de hidrólisis ácida

La concentración final de aminoácidos en las muestras a evaluar se indica en mg de cada aminoácido presente en 100 gramos de muestra fresca. Para ello, se realizaron los siguientes cálculos:

Fluorescencia de cada aminoácido (área de la integración de cada pico, medida en unidades arbitrarias, UA):

$$\text{Área aa} : \text{fluorescencia, UA}$$

Cantidad de aminoácidos en la muestra seca (nM/3µl):

$$AA \text{ nM} / 3\mu\text{l} = \frac{\text{área aminoácido}}{\text{área } \alpha\text{ABA}} \times \frac{FC}{100}$$

Cantidad de aminoácidos la muestra seca y sin grasa (MS) (nM/1 ml):

$$AA \text{ nM} / 1 \text{ ml MS} = \frac{A \times 1000}{3}$$

Cantidad de aminoácidos de la MS (*mg /1 ml*):

$$AA \text{ mg /1 ml MS} = \frac{(B \times \text{Peso Molecular})}{1000000}$$

Cantidad de aminoácidos de la muestra fresca (MF) (*mg / 100 g*):

$$AA \text{ mg / 100 g MF} = \frac{\frac{C \times MST}{MS}}{MF} \times 100$$

Dónde:

A = Nanomoles de aminoácidos en 3 μ l de muestra: Nmol /3 μ l

B = Nanomoles de aminoácidos en 1 μ l de la muestra seca y sin grasa: Nmol /1 ml MS

C = Miligramos de aminoácidos en 1 μ l de la muestra seca y sin grasa: Mg /1 ml MS

Miligramos de aminoácidos en 100 gramos de muestra fresca: Mg / 100 g MF

Factor de corrección: FC

Muestra seca y sin grasa Total (g): MST

3.3.4.2. Cuantificación del triptófano

Como se describe en el apartado 3.3.3.2, se preparó un patrón de triptófano a una concentración de 2,45 nM en 1 ml de NaOH 0,4 N. Posteriormente se hicieron sucesivas diluciones (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/50).

En la tabla 6 se observan la absorbancia de las diferentes diluciones de triptófano. Estas se utilizaron para crear la recta de calibración (gráfico 2) a partir de la cual se calculó la cantidad de triptófano.

Tabla 6: Diluciones de triptófano

Diluciones triptófano	Cantidad (ng)	Absorbancia 280nm
1 / 50	100	4305911
1 / 8	625,4	14577308
1 / 4	1250,8	22135333
1 / 2	2501,7	33379184
1 / 1	5003,29	45766983

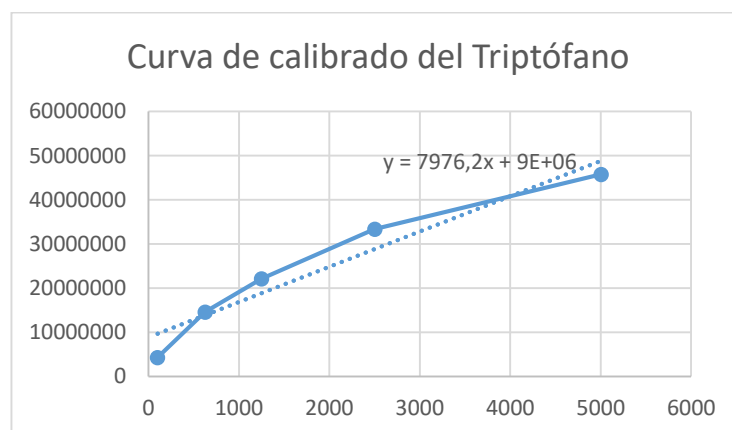


Gráfico 2: Calibración del triptófano

Para calcular la cantidad de triptófano presente en las muestras que se inyectaban en el HPLC se siguieron los siguientes cálculos a partir del gráfico anterior:

$$y = 7976,2x + 9000000 + 06$$

Dónde:

y= Absorbancia de la muestra

X= Nanogramos

3.4. Evaluación de los resultados

Para conocer las diferencias entre WA y WN se estudiaron las siguientes variables en ambas razas:

1. Cantidad individual de aminoácidos esenciales y no esenciales (mg/100g)
2. Porcentaje de aminoácidos esenciales (PerEAA)
3. Total de aminoácidos esenciales (mg/100g) (sEAA)

Se calculó la media aritmética y la desviación típica de cada uno de los aminoácidos en las dos razas de ganado vacuno estudiados. Para esto se utilizó la versión EXCEL 2016 y se aplicaron las siguientes fórmulas:

Media aritmética (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{\sum_1^N X1}{N}$$

Desviación típica (σ):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^N (X1 - \bar{x})^2}{N}}$$

Los datos han sido procesados con IBM SPSS® Statistics v. 25.0 mediante el análisis de varianza Kruskal Wallis o ANOVA.

4. RESULTADOS

La composición de aminoácidos del músculo *Longissimus dorsi* de los animales Wagyu y Wangus están representados en las tablas 6 y 7. Han sido identificados diecisiete aminoácidos en todas las muestras, diferenciándose en aminoácidos esenciales (valina, treonina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, alanina e histidina) y no esenciales (aspartato, ácido aspártico, glicina, glutamina, ácido glutámico, prolina, serina y tirosina).

En la carne de Wagyu, los aminoácidos no esenciales en mayor cantidad son; el ácido aspártico y el ácido glutámico (2.93 ± 0.72 ; 4.71 ± 1.2 , respectivamente). La cantidad de estos aminoácidos ha sido similar ($P < 0.95$) en Wangus (2.94 ± 0.86 ; 4.79 ± 1.5 , respectivamente). Como consecuencia del análisis de los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas entre los aminoácidos no esenciales entre las diferentes razas ($P = 0.54$). Sin embargo, se observa una variación en la cantidad de prolina y tirosina entre ambas razas. Por un lado, la cantidad de prolina fue de 1.74 ± 0.69 para la raza WA y para la raza WN fue de 1.49 ± 0.55 . Por otro lado, la cantidad de tirosina fue de 1.10 ± 0.37 para WA y de 1.28 ± 0.35 para WN (tabla 8).

En cuanto a los aminoácidos esenciales los resultados obtenidos han sido similares. No se han observado diferencias significativas entre ambas razas ($P = 0.54$). Por un lado, el porcentaje de aminoácidos esenciales fue de 37.7 ± 4.03 para WA y de 39.8 ± 1.68 para WN y, por otro lado, el total de aminoácidos esenciales fue de 8980 ± 2040.5 en WA y de 9951 ± 1431.2 en WN. Sin embargo, la histidina ha presentado una leve diferencia (1.28 ± 0.92 en WA y 1.00 ± 0.25 WN). El aminoácido esencial presente en mayor cantidad en ambas razas fue la lisina (2.48 ± 0.75 en WA y 2.59 ± 0.71 en WN) (tabla 8).

Tabla 7: Miligramos de aminoácidos por cien gramos de carne fresca cruce de Wangus

Animales	ASP	SER	AGL	GLY	HYS*	ARG*	THR*	ALA	PRO	TYR	VAL*	MET*	LYS*	ILE*	LEU*	FHE*	TRP*
82581	2898,16	1242,90	4834,08	1375,58	1061,27	1505,89	1306,51	1256,70	1383,24	1250,45	1680,61	795,10	2600,29	1609,60	2409,12	1335,41	196,50
83815	2775,85	1185,64	4479,20	1709,29	956,05	1102,92	758,32	1199,87	1387,56	1141,84	1594,02	648,77	2344,71	1341,99	1826,43	1228,98	219,73
83817	2461,27	1093,01	4088,58	1160,38	816,24	1035,57	773,77	1311,06	1075,49	1042,60	1301,39	561,55	2196,08	1116,62	1842,95	1066,61	251,19
84594	2659,21	1136,37	4355,47	1343,74	1029,20	1423,95	1183,84	1147,92	1270,62	1126,46	1536,02	708,81	2364,43	1466,14	2298,20	1232,40	163,37
85851	2976,66	1215,03	4853,80	1286,64	971,94	1134,91	999,53	1183,23	1244,90	1363,37	1656,19	744,80	2617,96	1471,04	2090,62	1344,64	204,36
85853	2099,41	847,59	3386,33	1210,56	776,13	791,88	704,10	848,32	1022,44	885,89	1239,82	512,23	1842,22	1065,56	1607,72	968,72	194,64
88445	2678,45	1150,40	4456,07	1358,71	906,64	1039,97	865,31	1092,91	1237,71	1110,99	1477,28	607,36	2345,34	1276,90	1893,11	1192,16	118,11
88443	3484,28	1495,91	5887,95	1984,89	1184,76	1448,50	1096,38	1462,32	1709,32	1464,61	1912,79	834,42	3081,24	1640,12	2135,30	1524,71	158,71
89255	2076,09	480,64	2672,94	1282,71	744,37	1077,79	629,46	1438,88	1244,11	1274,70	1317,40	718,55	2011,03	1164,92	1946,64	1156,08	231,77
89257	3657,07	1624,47	6078,96	3085,69	1105,30	1597,37	1143,66	1702,70	2334,55	1475,13	2019,15	770,20	3065,33	1649,95	2577,21	1633,41	300,43
89259	5223,07	2275,17	8575,23	3650,86	1679,66	2221,75	1733,04	2260,83	2839,14	2248,20	2614,16	1326,44	4508,02	2152,75	2632,75	2070,14	267,66
89892	2292,49	990,06	3816,99	1118,49	811,91	1229,82	1012,47	947,75	1081,18	984,08	1329,89	663,57	2058,81	1233,04	1674,87	1072,96	132,88

Tabla 8: Miligramos de aminoácidos por cien gramos de carne fresca en Wagyu.

Animales	ASP	SER	AGL	GLY	HYS*	ARG*	THR*	ALA	PRO	TYR	VAL*	MET*	LYS*	ILE*	LEU*	FHE*	THR*
81557	3787,69	1600,83	6300,06	1726,45	1573,23	1994,31	1767,57	1638,26	2110,12	1715,97	2208,99	1172,29	3506,12	2168,24	2843,85	1775,80	214,77
82007	3362,16	1214,40	4587,61	1271,08	1063,58	1554,98	1281,69	1147,80	1237,18	1172,89	1665,78	833,28	2682,19	1561,64	2043,75	1302,94	193,90
82008	3009,52	1255,93	4946,45	1347,02	1084,29	1578,03	1374,90	1236,22	1345,82	1358,28	1657,96	876,57	2730,35	1516,65	1887,51	1278,59	197,02
83684	1942,69	811,88	3142,12	989,77	758,50	1012,04	872,66	833,79	950,47	808,39	1121,97	551,23	1768,76	1070,06	1737,20	886,78	187,65
83991	4031,41	1700,52	6525,19	1972,54	1441,50	1849,02	1235,87	1955,85	1950,72	1344,18	2075,26	953,85	3661,97	1842,81	2935,20	1659,69	184,75
84592	3251,36	1462,96	5538,61	1777,18	1160,80	1320,64	1086,21	1355,43	1597,22	1534,04	1768,38	854,61	2843,59	1481,67	1864,06	1425,73	184,61
85102	2945,87	1282,76	4951,89	1740,21	909,30	1250,30	866,38	1270,57	1547,85	1271,99	1598,09	703,02	2598,37	1380,02	2185,22	1319,41	212,63
85104	3063,62	1409,85	5126,20	3731,02	977,39	1519,69	820,15	1782,22	2391,02	839,53	1515,08	646,06	2508,00	1223,24	1803,12	1235,22	190,64
85849	3218,40	1320,81	5247,82	2090,59	942,67	1261,52	1086,86	1343,36	1670,79	1430,01	1815,02	802,59	2852,34	1522,60	1927,38	1433,85	192,90
86158	3808,83	1752,53	6211,04	5870,36	1020,71	2400,64	1035,44	2513,59	3644,62	724,66	1871,62	787,36	2907,61	1469,82	2332,31	1480,64	215,58
87911	2637,14	1079,12	4129,50	1148,55	919,71	908,01	823,12	1018,88	1086,80	1095,80	1414,89	610,84	2172,78	1221,97	1585,96	1126,20	165,02
87913	2293,95	962,94	3681,27	1055,65	813,94	974,13	745,88	925,51	988,65	739,35	1273,84	476,35	2042,27	1098,79	1906,42	1022,14	161,62
89898	3108,55	1325,22	5186,67	1513,24	1278,19	1629,33	1401,71	1324,07	1360,19	1340,14	1792,22	894,39	2708,10	1666,03	2138,61	1433,79	210,66
90411	1582,89	1633,23	1925,05	1944,65	4504,98	0,00	2106,96	1316,03	2052,81	538,57	1170,50	420,17	728,49	529,17	1573,66	917,21	163,78
90413	1974,59	945,58	3225,33	3347,40	767,11	1372,28	821,80	1302,76	2162,79	588,89	1097,39	438,84	1508,69	907,82	1599,43	877,09	115,36

Tabla 9: Media aritmética y desviación típica de la cantidad de cada aminoácido en ambas razas.

Aminoácidos	Razas			
	WAGYU		WANGUS	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
E AA				
ASP	2,93	± 0,72	2,94	± 0,86
SER	1,32	± 0,29	1,23	± 0,44
AGL	4,71	± 1,2	4,79	± 1,5
GLY	2,10	± 1,3	1,71	± 0,81
ALA	1,39	± 0,49	1,32	± 0,37
PRO	1,74	± 0,69	1,49	± 0,55
TYR	1,10	± 0,37	1,28	± 0,35
NE AA				
THR	1,15	± 0,38	1,01	± 0,30
VAL	1,60	± 0,34	1,64	± 0,39
MET	0,73	± 0,21	0,74	± 0,20
LYS	2,48	± 0,75	2,59	± 0,71
ILE	1,38	± 0,39	1,43	± 0,30
LEU	2,02	± 0,41	2,08	± 0,34
PHE	1,28	± 0,27	1,32	± 0,30
TRP	0,01	±0,56	0,19	±0,03
HYS	1,28	± 0,92	1,00	± 0,25
ARG	1,37	± 0,55	1,30	± 0,37

4. DISCUSIÓN

Conocer la calidad composicional de la carne es un criterio importante debido a varios factores: el económico, desde el punto de vista del productor y el nutricional y organoléptico, desde el punto de vista del consumidor (Wu et al. 2016, AL-Jammas et al. 2017).

Los resultados del presente trabajo indican que la cantidad de aminoácidos esenciales y no esenciales son muy similares en ambas razas. A excepción de la histidina, prolina y tirosina, que muestran una leve diferencia. La prolina y la histidina son mayores en la raza Wagyu y la tirosina para la raza Wangus. Por lo tanto, en términos generales estos datos muestran que no se observan diferencias significativas entre ambas razas.

En lo referido al objetivo inicial de poner a punto y cuantificar, mediante HPLC, el perfil de aminoácidos se recomienda la opinión de los autores Otter et al. (2008), los cuales afirman que es necesario implantar un método estandarizado. Para ello, la AOAC Internacional (asociación científica sin fines de lucro) publica métodos de análisis químicos estandarizados diseñados para aumentar la confianza en los resultados de los análisis químicos y microbiológicos. Las agencias gubernamentales y las organizaciones civiles a menudo requieren que los laboratorios utilicen métodos oficiales de la AOAC. El método recomendado por la AOAC es: una hidrólisis usando HCL 6N, a 100°C durante 24 horas, separación de aminoácidos mediante Ultra HPLC de fase reversa y una detección y cuantificación de los aminoácidos mediante una dilución de isótopos.

El objetivo inicial de comparar dos razas de ganado bovino ha sido puesto a prueba adecuadamente conforme a los criterios de varios autores (Gilani et al. 2008 y Yust et al. 2003). El análisis de los datos en la investigación lleva a tomar la decisión de que no existen diferencias significativas entre ambas razas.

Según varios autores (Hollo et al., 2007 y Koutsidis et al., 2008), a pesar de que el nivel de aminoácidos es relativamente constante, existen diversos elementos que pueden alterar el contenido de aminoácidos en la carne de vacuno. A tal fin, se han llevado a cabo diversos estudios para comprobar cuáles son los factores que influyen principalmente en la composición de los aminoácidos de la canal (Hollo et al. 2001, Jeong et al. 2012, Koshchaev et al. 2016, Vopálensky et al. 2017, Holló et al. 2007).

Se ha evaluado la influencia de la raza en la composición de aminoácidos por varios autores (Hollo et al. 2001, Jeong et al. 2012 y Koshchaev et al. 2016), y de acuerdo con el presente estudio, han concluido que no existen diferencias significativas en el nivel de aminoácidos en función de la raza. Sin embargo, autores como Vopálensky et al. (2017), mostraron diferencias

significativas en la cantidad de aminoácidos esenciales en diferentes razas (valina, metionina y arginina).

Varios motivos pueden causar estas diferencias entre los diferentes estudios mencionados: el número de razas empleadas, el músculo analizado, el procedimiento de hidrólisis empleado y el método cromatográfico empleado.

Vopálensky et al. (2017), compararon 12 razas de ganado vacuno, siendo mucho mayor el abanico de resultados, lo que puede dar lugar a mayor variación entre razas. En el presente estudio y en los resultados informados por Holló et al. (2001), donde se compararon sólo dos razas de ganado bovino, no se encontraron diferencias significativas. De la misma forma, Jeong et al. (2012), y Koshchaev et al. (2016), compararon sólo tres razas y no encontraron diferencias significativas.

Otros de los factores que pueden influir en los resultados son el músculo analizado. Mientras que Holló et al. (2001), Koshchaev et al. (2016) y Vopálensky et al. (2017) analizaron el músculo *Longissimus dorsi*, Jeong et al. (2012), analizaron el músculo *Longissimus lumborum*. Holló et al. (2001), Koshchaev et al. (2016) y Jeong et al. (2012), no encontraron diferencias entre razas. Vopálensky et al. (2017), sí que encontraron diferencias significativas. En el método estadounidense que existe para evaluar la calidad de carne de vacuno (USDA) se analiza el músculo *Longissimus dorsi*. Por otro lado, en el método japonés, se analiza el músculo *Longissimus thoracis*. Como dato interesante, cabe destacar que Wu et al. (2016), compararon la composición de aminoácidos entre diferentes cortes de carne de vacuno: aguja, lomo y redondo. Como conclusión del trabajo realizado informaron que el lomo tiene más cantidad (mg/100g) de aminoácidos esenciales y no esenciales que el resto.

La hidrólisis de los aminoácidos, paso previo al análisis cromatográfico, presenta una estandarización bastante definida: adición de HCL 6 N a la muestra, sellado al vacío y posterior calentamiento a 110 °C durante 24 horas. Al igual que en el presente estudio Holló et al. (2001), y Vopálensky et al. (2017), utilizaron este método para el análisis de las muestras. Sin embargo, Jeong et al. (2012), lo hicieron mediante HCL 0.01 N. Ninguno de los autores mencionados encontró diferencias significativas entre razas. Otter et al., 2011 tras comparar varios métodos concluyeron que no había mejoras suficientes que pudieran mejorar el método estándar.

Se ha reconocido que las condiciones de hidrólisis estándar no son adecuadas para la extracción de todos los aminoácidos, ya que algunos de estos son inestables, por ejemplo, el

triptófano (Yust et al., 2003). En el presente estudio, siguiendo el método definido por Yust et al. (2003), se llevó a cabo una hidrólisis básica para su determinación, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de triptófano entre ambas razas. Sin embargo, Holló et al. (2001), Vopálensky et al. (2017) y Jeong et al. (2012), no incluyen el triptófano en sus resultados ya que este se degrada con la hidrólisis ácida, que fue el método empleado en sus estudios.

¿Puede influir el método cromatográfico empleado en los resultados obtenidos? Hollo et al. (2001), analizaron sus muestras mediante HPLC y una derivatización postcolumna con ninhidrina. Jeong et al. (2012), analizaron sus muestras mediante HPLC con una derivatización con OPA y FMOC. Ambos autores no encontraron diferencias significativas entre las razas. Koshchaev et al. (2016), tampoco encontraron diferencias entre razas y utilizaron la electroforesis capilar para su análisis. Vopálensky et al. (2017), emplearon la cromatografía de intercambio iónico con reacción postcolumna con ninhidrina y encontraron diferencias significativas entre las 12 razas comparadas. En el estudio que se presenta se realizó un análisis mediante HPLC de fase reversa y una derivatización precolumna con AMQ y no se encontraron diferencias significativas entre WA y WN. Autores como Gilanni et al. (2008), tras comparar los diferentes métodos (EC, CG, CII, HPLC) concluyeron que la cromatografía líquida de alta presión tiene mayor sensibilidad y utiliza sistemas menos costosos que el resto.

Por último, centrándonos específicamente en los aminoácidos a nivel individual Jeong et al. (2012), al comparar las razas Angus, Hanwoo y Holstein, encontraron leves diferencias en el porcentaje de algunos de ellos. El ácido glutámico en Angus y Hanwoo es significativamente mayor que en Holstein. Por otro lado, Angus tiene mayor porcentaje de serina, glicina y treonina que Holstein. Koshchaev et al. (2016), encontró diferencias entre las 3 razas comparadas (Hereford, Charolais y Angus) en la cantidad de glicina, serina, prolina e histidina. Estos fueron menores en Hereford que en Charolais y Angus. En el presente estudio, la prolina y la histidina son mayores para la raza Wagyu y la tirosina para la raza Wangus. Pese a esto, se sigue afirmando que la diferencia en el perfil de aminoácidos entre razas no es significativa.

Otro de los factores influyentes en la composición de los aminoácidos en la canal es la nutrición. Autores como Holló et al. (2007), concluyeron que un sistema de producción extensiva con una dieta basada en ensilaje de pasto y concentrado muestra mayores cantidades de fenilalanina, leucina, cisteína y glicina, que un sistema de producción intensivo. El sistema de producción intensivo basaba su alimentación en ensilaje de maíz, heno y concentrado. Además,

Griffiths (2014), concluyó que la cantidad de aminoácidos esenciales y no esenciales aumenta con una mayor ingesta de proteína en la dieta.

El sexo es uno de los factores más influyentes en la composición de aminoácidos (Holló et al. 2001). Pese a esta afirmación sigue habiendo mucha controversia entre autores. Por un lado, están aquellos que afirman que son las hembras las que presentan mayor cantidad de aminoácidos esenciales (Holló et al. 2001) y por otro lado los que concluyeron que son los machos los que presentan mayor cantidad de estos (Vopalensky et al. 2017).

Por último, otro de los factores que puede alterar el contenido de aminoácidos es el peso al sacrificio. Jeong et al. (2012), demostraron que las cantidades de glicina, treonina, alanina, metionina, isoleucina y leucina, fue mayor en animales sacrificados con 18 meses respecto de los sacrificados con 14 meses. En cambio, Holló et al. (2001), concluyeron que no hubo diferencias significativas en animales sacrificados con diferentes pesos.

En el presente trabajo se llega a la conclusión, al igual que en estudios de otros autores, que no existen diferencias significativas entre razas (Hollo et al. 2001, Jeong et al. 2012, Koshchaev et al. 2016).

Sería interesante seguir estudiando la influencia de los factores: edad al sacrificio, sexo, y nutrición, en la carne de Wagyu, ya que la raza no es uno de los factores que afectan directamente a su perfil de aminoácidos.

5. CONCLUSIONES

1. El método utilizado para el análisis de aminoácidos en el músculo *Longissimus dorsi* sirve para determinar 17 aminoácidos.
2. La hidrólisis básica permite la posterior determinación del triptófano mediante cromatografía.
3. No existieron diferencias significativas en la cantidad de aminoácidos entre Wagyu y Wangus.
4. En el músculo *Longissimus dorsi* de Wagyu y Wangus, los aminoácidos no esenciales en mayor cantidad fueron; el ácido aspártico y el ácido glutámico.
5. En el músculo *Longissimus dorsi* de Wagyu y Wangus, el aminoácido esencial en mayor cantidad fue la lisina.
6. La cantidad de prolina e histidina se encontró en mayores concentraciones en la raza WA.
7. La cantidad de tirosina se encontró en mayores concentraciones en la raza WN.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Alterman M., Hunziker P. (2012). *Amino Acid Analysis Methods and Protocols*. UK: Humana Press.
2. Al-Jammas M., Agabriel J., Vernet J., Ortigues-Marty I. (2017). Comparison of methods to evaluate the chemical composition of carcass from beef cattle. *Advance in Animal Biosciences*, 8 (1), 22 – 27. Doi: 10.1017/s204047001637.
3. Briggs, HM y DM Briggs (1980). Razas modernas de ganado. *Macmillan Publishing Co.* 8 (4), 1 – 6.
4. Csapó J., Toth-Pósfai I., Csapó-Kiss Z. S. (1981). Separation of D- and L- amino acids by ion exchange column chromatography in the form of alanyl dipeptides. *Amino acids*, 1, 331 – 337.
5. Csapó Z., Csapó-Kiss S., N-methy S., Folestad A., Tivesten y and Martin T. G. (1994). Age determination based on amino acid racemization: A new possibility. *Amino acids*. 7, 317 – 325.
6. Gilani G. S., Xiao C. y Lee N. (2008). Need for Accurate and Standardized Determination of Amino Acids and Bioactive Peptides for Evaluating Protein Quality and Potential Health Effects of Foods and Dietary Supplements. *AOAC International*, 91 (4), 894 – 901
7. Griffiths T. W. (2014). Effect of Dietary Protein Intake on the Deposition of Amino Acids in Beef Carcass Meat. *Irish Journal of Agricultural Research*, 18 (3), 315 – 318. Doi: <http://www.jstor.org/stable/25555956> .
8. Hapikiss A. R., Gaunitz F. (2014). Inhibition of tumor cell growth by carnosine: Some possible mechanisms. *Amino acids* 46, 327 – 337. Doi: 10.1007/ s00726-013-1627-5
9. Holló G., Csapó J., Szucs E., Tozser J., Repa I., Holló I. (2001). Influence of breed, slaughter weight and gender on chemical composition of beef. *Asian-Aust J. Anim. Sci.* 14 (11), 1555 – 1559.
10. Holló G., Nuernberg K., Holló I., Csapó J., Seregi J., Repa I., Ender K. (2007). Effect of feeding on the composition of longissimus muscle of Hungarian Grey and Holstein Friesian bulls. *Dummerstorf*, 50 (6), 575 – 586.
11. Holló G., Nuernberg K., Holló I., Csapó J., Seregi J., Repa I., Ender K. (2005). Der Einfluss der Fütterung auf die Zusammensetzung des intra-muskulären Fettes des Musculus longissimus und verschiedener Fettdepots von Jungbullen der Rassen Ungarisches Grauvieh und Holstein Friesian. *Dummerstorf*, 48 (6), 5375 – 546.
12. Jeong D., Oh M. R., Seong P. N., Cho S., Kang G., Kim J., Jeong S., Lee J. y Beom P. (2012). Comparison of meat quality traits, free amino acid and fatty acids *Longissimus Lumborum*

- muscles from Hanwoo, Holstein and Angus steers, fattener in Korea. *Kosea*, 32 (5), 591 – 597. Doi: 10.5851/kosfa.2012.32.5.591.
13. Kolchina V. y Alekseeva E (2019). Amino acid composition of beef obtained from the specialized cattle. *Earth and Environmental Science*, 341, 322 – 343. Doi: 10.1088/1755 – 1315/341/1/012136.
 14. Koshchaev G. A., Shchukina I. V., Semenenko M. P., Sergeevna A. K., Vasilevich K. V. (2016). Amino acid profile of meat of specialized beef breeds. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7 (5) 670 – 676.
 15. Koutsidis G., Elmore J. S., Oruna-Concha M. J., Campo M. M., Madera J. D., Mottram D. S. (2007). Precusores solubles en agua del aroma de la carne de vacuno. *Amino acids*. 26 (3), 1 – 7. Doi= 10.1016/j.meatsci.2007.09.010
 16. Lunt, D. K., Riley R.R. y Smith S.B. (1993). Growth and Carcass Characteristics of Angus and American Wagyu Steers. *Meat Science*, 34, 327 – 334. Doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22060741/>
 17. Manning J. M., (1993). The contributions of Stein and Moore to protein science. *Protein Science*, 2, 118 – 1191.
 18. McKnight, J. G., Satterfield W. S., Jobgen S. B., Smith T. E., Spencer E, Meininger C. J., McNeal C. J., Wu G. (2010). Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: Potential mechanisms and important implications for human health. *Amino acids*, 39, 349 – 357. Doi: 10.1007/s00726-010.0598-z
 19. Molnár J., Molnár A. (1981) Adatok a maguartarka húsának aminosav összetételéhez. *Élelmiszeripari Foiszola Tudományos Közlemények*, 9, 63 – 68.
 20. Motoyama M., Sasaki K. y Watanabe A. (2016). Wagyu and the factors contributing to its beef quality: A Japanese industry overview. *Meat Science*, 120, 10 – 18. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.026>.
 21. Muhlisin, Song S. C., Rhee J. Y., Song Y. H., Lee K. S. (2015). Effects of direct-fed microbial and pine cone extract on carcass traits and meat quality of Hanwoo. *The Asian-Australasian*, 29 (5), 722 – 730. Doi: 10.5713/ajas.15.0303.
 22. Nicastro F. R., Gallo A., Jambrenghi L. Zezza (2000). Influence of diet on amino acid profiles of two muscles in Chianina beef. *Anim Sci*, 83 (1), 161 - 162.
 23. Otter E. (2011). Standardised methods for amino acid analysis of food. *British Journal of Nutrition* 108, 230 – 237. Doi: 10.1017/S0007114512002486.

24. Pérez-Palacios T., Barroso M. A., Ruiz J., Antequera T. (2014). A Rapid and Accurate Extraction Procedure for Analysing Free Amino Acids in Meat Samples by GC-MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 1 – 8. Doi: 10.1155/2015/209214
25. Ridle E. S., Stipanuk M. H. y Mercer A. E. (2016). Amino acids in healthy aging skeletal muscle. *Front. Biosci.* 24 (8), 326 – 350. Doi: 10.1155/2015/209214
26. Ríos C. (2019). *Come comida real*. Barcelona: Paidós.
27. Stein W. H. (1957). Observation on the amino acid composition of human hemoglobins. *Biochim Biophys*, 24, 640–642.
28. Vopálenský J., Suchý P., Straková E., Simek F., Machacek M., Herzig I. (2017). Amino acid levels in muscle tissue of eight meat cattle breeds. *Czech J. Anim*, 62 (8), 339 – 346. Doi: 10.17221/96/2016/CJAS.
29. Wu G., Cross H. R., Gehring K. B., Savell J.W., Arnold A. N. y McNeill S.H. (2016). Composition of free and peptide-bound amino acids in beef Chuck, loin, and round cuts. *American Society of Animal Science*, 94, 2603 – 2613. Doi: 10.2527/jas2016-0478.
30. Wu G. (2009) Amino Acids: Metabolism, functions and nutrition. *Amino acids* 37, 1 – 7. Doi: 10.1007/s00726-009-0269-0
31. Wu G. (2013). Amino acids: Biochemistry and nutrition. *Amino acids*, 38, 1 – 7. Doi: 10.1201/b14661
32. Yagües G. V. (2008). *Cromatografía de gases*. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10045/8247>
33. Yamada T., Kamiya M. y Higuchi M (2020). Gas Chromatography–Mass Spectrometry-Based Metabolomic Analysis of Wagyu and Holstein Beef. *Metabolites (MDPI)*, 95 (10) 1 – 7. Doi:10.3390/metabo10030095
34. Yust. M. M., Pedroche J., Girón-Calle J., Vioque J., Millán F., Alaiz M. (2003). Determination of tryptophan by high.performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry* 85 (2004), 317 – 320. Doi: 10.1016/j.foodchem.2003.07.026