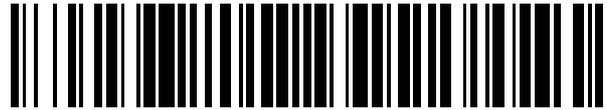


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 510**

51 Int. Cl.:

**A23L 3/3508** (2006.01)  
**A23L 3/3445** (2006.01)  
**A23L 3/3418** (2006.01)  
**A23L 3/34** (2006.01)  
**A23L 1/272** (2006.01)  
**A23B 4/20** (2006.01)  
**A23B 4/16** (2006.01)  
**A23B 4/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2012 E 12735000 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2729023**

54 Título: **Método para tratar y conservar carne**

30 Prioridad:

**04.07.2011 GB 201111390**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.10.2015**

73 Titular/es:

**RED MEAT AS (100.0%)  
Gamble Drammens vei 65C  
1369 Stabekk, NO**

72 Inventor/es:

**SLINDE, ERIK y  
EGELANDSDAL, BJØRG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 548 510 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para tratar y conservar carne

Esta invención se refiere a mejoras en métodos y relativas a métodos de tratamiento de la carne cruda y de alimentos que contienen carne cruda. En particular, se refiere a métodos para preservar la estabilidad del color de la carne cruda.

Los consumidores de productos alimentarios, especialmente alimentos crudos, están naturalmente influenciados por el aspecto visual del alimento que se presenta en el punto de venta. Esto es particularmente cierto en el caso de alimentos envasados, en los cuales las señales olfativas y de textura a menudo no están disponibles. En el caso de la carne cruda (p. ej., en bruto), el color de la carne es un factor clave que influye en la decisión de compra del consumidor; un color de la carne rojo púrpura o rojo brillante se asocia generalmente con la frescura. Para la carne sin envasar, en particular la carne que contiene ácidos grasos poliinsaturados (p. ej., ácidos grasos omega-3, tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA)), la ranciedad es un factor adicional que influye en la elección del consumidor. La ranciedad aparece debido a la descomposición de las grasas y aceites en un producto alimentario, generalmente por oxidación y/o por acción microbiana, e imparte al alimento un olor y sabor característicos y desagradables. La ranciedad es un problema particular que afecta al pescado azul (p. ej., el salmón), al cerdo y a las aves de corral (p. ej., pollo y pavo).

El mantenimiento del color de la carne en la carne cruda y en la carne procesada depende de una serie de factores. Estos incluyen la elección de las condiciones de crecimiento del animal (p. ej., la nutrición, el medio ambiente, la manipulación, etc.) y las condiciones del sacrificio, así como las condiciones de procesado y post-procesado (p. ej., tiempo de envejecimiento y temperatura, aditivos químicos, condiciones de envasado, condiciones de presentación, condiciones de cocción, etc.). Son de particular importancia aquellos factores que se aplican a la carne procesada, especialmente la carne cruda procesada, tales como el ambiente en que se conserva la carne (p. ej., el nivel de oxígeno) y también la inclusión de algún agente estabilizante del color.

El color de la carne cruda fresca proviene principalmente de la mioglobina presente en el tejido muscular. En ausencia de oxígeno, la mioglobina existe en un estado reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) desoxigenado, conocido como "desoximioglobina", que tiene un color rojo púrpura oscuro. Por exposición al oxígeno, la desoximioglobina reacciona fácilmente para formar el complejo "oximioglobina". La oximioglobina es también una forma reducida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) de la mioglobina y tiene un color rojo brillante que es típico de la carne recién sacrificada. Sin embargo, con el tiempo, la oximioglobina (y también la desoximioglobina) se oxida lentamente hasta una forma más estable ( $\text{Fe}^{3+}$ ) que es la "metamioglobina". La oxidación normalmente está mediada por enzimas de la carne y por bacterias colonizantes y da como resultado el color marrón apagado asociado con el deterioro en la calidad de la carne.

En el tejido muscular que tiene enzimas activas que median en la reducción de la metamioglobina, es posible la reducción de la metamioglobina a desoximioglobina, pero sólo si están disponibles los cofactores necesarios. Estos cofactores se agotan normalmente después del sacrificio y por lo tanto la carne que contiene metamioglobina en general no recuperará su color rojo.

Se han investigado algunos compuestos para adición a la carne en un intento de reemplazar a los cofactores reductores necesarios para convertir la metamioglobina en las formas  $\text{Fe}^{2+}$ , pero con un éxito limitado. Debido a las complejidades de las rutas bioquímicas que existen en la célula, en particular los efectos de retroalimentación que tienen diversos compuestos sobre la actividad de las enzimas en las rutas y la disponibilidad de sustratos en la célula, no es posible predecir con exactitud el efecto que tendrá cualquier compuesto dado.

Los efectos de los agentes químicos dependen típicamente de las condiciones en las que se conserva la carne, especialmente los niveles de oxígeno presentes. Para la carne conservada en condiciones de bajo oxígeno (p. ej., menos de aproximadamente 1 % de  $\text{O}_2$ ), es deseable la reducción de la metamioglobina a desoximioglobina para mantener el color rojo púrpura oscuro de la carne fresca. Sin embargo, para la carne conservada en condiciones de alto oxígeno (p. ej., más de aproximadamente 50 % de  $\text{O}_2$ ), se puede mantener en alguna medida la estabilidad del color debido a los altos niveles de oximioglobina. En condiciones ricas en oxígeno, sin embargo, se observa una decoloración por el aumento de la acción microbiana. La dureza de la carne también aumenta bajo condiciones de alto oxígeno por la reticulación de las proteínas en el músculo. En cada caso, se pueden utilizar agentes químicos que tienen capacidades anti-oxidantes y reductoras de la metamioglobina para mantener el color y/o la estabilidad oxidativa de la carne, pero las propiedades requeridas típicamente varían en gran medida en diferentes condiciones. En general tampoco es posible predecir los efectos de los productos químicos que se sabe que tienen actividad antioxidante y reductora, en las diferentes condiciones.

Se conocen varios agentes químicos que mejoran la estabilidad del color en la carne, incluyendo el lactato (p. ej., sales con sodio, potasio y calcio) y el ácido ascórbico. El lactato fue investigado originalmente como un aditivo para reducir la presencia de *Clostridium botulinum* en la carne, pero también puede tener un efecto positivo sobre la estabilidad del color. El ácido ascórbico puede tener efectos positivos, pero se sabe que disminuye la estabilidad del

color en ciertas condiciones (Kropf, DH., Proceedings of the 56<sup>th</sup> American Meat Science Association Reciprocal Meat Conference, 2003, pp. 73-75).

5 Existe una necesidad considerable de desarrollar agentes estabilizadores del color, seguros, que se puedan utilizar para mejorar el aspecto, la vida útil y la posibilidad de venta de la carne cruda y de los productos alimentarios que contienen carne cruda. La presente invención aborda esta necesidad.

10 Los presentes inventores han descubierto que se pueden utilizar combinaciones de compuestos que contienen ácido carboxílico, específicamente succinato, glutamato, citrato (o isocitrato o aconitato), malato y, en menor medida, piruvato, para lograr una estabilización significativa y de larga duración del color en las carnes crudas. En algunos casos, dichas combinaciones proporcionan beneficios que van más allá de los efectos de los compuestos de forma individual, esto es, ciertas combinaciones trabajan en sinergia para producir de manera sorprendente buenos niveles de estabilización del color.

15 Las composiciones descritas en la presente memoria no sólo son seguras (y generalmente aprobadas) para uso en los alimentos, sino que se pueden fabricar fácilmente y a bajo coste. Ciertas combinaciones de los compuestos pueden mejorar también la estabilidad de almacenamiento de los productos cárnicos que contienen ácidos grasos poliinsaturados, tales como el salmón y las aves de corral, reduciendo de este modo la aparición y la extensión de la ranciedad.

20 La invención proporciona un método de envasado de un producto alimentario que comprende (p. ej., que consiste esencialmente en) carne cruda, comprendiendo el método poner en contacto dicho producto o la carne cruda a ser utilizada en el mismo con una composición que comprende (i) succinato y glutamato y/o malato; o (ii) glutamato, malato y, opcionalmente, citrato; y envasar dicho producto. Este envasado se puede llevar a cabo en una atmósfera modificada.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método de envasado de un producto alimentario que comprende (p. ej., que consiste esencialmente en) carne cruda, comprendiendo el método poner en contacto dicho producto o la carne cruda a ser utilizada en el mismo con una composición que comprende (p. ej., que consiste esencialmente en) glutamato, malato y, opcionalmente, citrato, y envasar dicho producto en una atmósfera de alto oxígeno.

Los componentes de la composición para uso en la invención son todos compuestos que comprenden al menos un grupo de ácido carboxílico o un derivado del mismo (p. ej. una sal). Estos compuestos se pueden denominar también en esta memoria "componentes activos".

30 Por "succinato" se entiende ácido succínico, esto es,  $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ , en su forma total o parcialmente protonada así como en su forma totalmente desprotonada, o una sal de ácido succínico con uno o más contraiones fisiológicamente aceptables. Los términos "glutamato", "malato", "citrato", "isocitrato", "aconitato" y "piruvato" se deben interpretar de forma equivalente, esto es, pueden estar en formas totalmente protonadas, parcialmente protonadas o desprotonadas o en la forma de una sal con uno o más contraiones fisiológicamente aceptables. Cuando se proporcionan en la forma de una sal, los contraiones adecuados que pueden estar presentes incluyen iones de metales del grupo I, tales como sodio y potasio; metales del grupo II tales como magnesio y calcio; y metales de transición tales como hierro, cobre y zinc. Como se puede apreciar, los contraiones deben ser adecuados para su uso en un producto alimentario, esto es, fisiológicamente aceptables. Otros contraiones adecuados incluyen contraiones no metálicos tales como el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Cualquier referencia en esta memoria a "sales" incluye sales mixtas y sales parciales tales como succinato de sodio y potasio, dihidrogenocitrato de sodio y similares. A pH fisiológico, se debe entender que los compuestos mencionados anteriormente existen en general principalmente en una forma parcialmente disociada, esto es, aniónica.

45 Los componentes activos preferidos para uso en la invención son compuestos que generalmente están aprobados para uso alimentario (p. ej., generalmente considerados como seguros "GRAS"), especialmente aquellos compuestos que están aprobados para uso alimentario en la Unión Europea (clasificados por los números "E") y/o aprobados por la US Food and Drug Administration (FDA). Los ejemplos de tales compuestos incluyen ácido succínico (E363), ácido glutámico (E620), glutamato monosódico (E621), glutamato monopotásico (E622), diglutamato cálcico (E623), glutamato amónico (E624), glutamato magnésico (E625), ácido cítrico (E330), citrato monosódico, disódico y/o trisódico (E331), citrato monopotásico, dipotásico y/o tripotásico (E332), citrato monocálcico dicálcico y/o tricálcico (E333), citrato magnésico (E345), citrato triamónico (E380), citrato férrico amónico (E381), ácido málico (E296), malato amónico (E349), malato sódico y/o hidrogenomalato sódico (E350), malato potásico (E351), y malato cálcico y/o hidrogenomalato cálcico (E352).

55 Los componentes activos especialmente preferidos son aquellos que son esencialmente incoloros y/o altamente solubles en solución acuosa. Los componentes particularmente preferidos se seleccionan de ácido succínico, ácido glutámico, glutamato monosódico, ácido cítrico, citrato trisódico, ácido isocítrico, isocitrato trisódico, ácido aconítico, ácido málico, malato sódico, ácido pirúvico, piruvato sódico y piruvato cálcico. Se prefieren también las formas ácidas de los componentes activos (esto es, que tienen uno o más protones como el contraion).

- 5 En una realización preferida, uno o más (p. ej. todos) de los componentes activos están presentes tanto en sus formas ácidas como también en la forma de una sal de la correspondiente base conjugada. Por ejemplo, se puede añadir succinato a la composición en las formas de ácido succínico y succinato sódico en una relación elegida para mantener o proporcionar un pH particular, por ejemplo en el caso de una composición líquida o cuando se aplica una composición sólida a la carne. Las sales especialmente preferidas de los componentes activos son como se enumeran en la presente memoria.
- 10 Los compuestos que tienen uno o más estereocentros se pueden proporcionar como mezclas racémicas o como isómeros parcial o totalmente purificados, por ejemplo, enantiómeros o diastereoisómeros. Preferiblemente, los compuestos ópticamente activos se proporcionan en la configuración natural, esto es, en la configuración en que se encuentran naturalmente en el tejido muscular de la carne, o como una mezcla racémica de isómeros. Los compuestos que contienen dobles enlaces asimétricos pueden estar en configuración *cis* y/o *trans*, pero están preferiblemente en la configuración natural. Las formas isómeras preferidas de los compuestos mencionados antes incluyen L-glutamato, D-isocitrato, cis-aconitato y L-malato, así como las sales de los mismos.
- 15 Por "ambiente de bajo oxígeno" se entiende un ambiente gaseoso que contiene menos de aproximadamente 2 % en moles de oxígeno molecular, especialmente menos de aproximadamente 1, 0,5, 0,25, 0,15, 0,1, 0,05 o 0,01 % en moles de oxígeno. Cuando la carne es carne de vaca o de cordero, un ambiente de bajo oxígeno tiene preferiblemente menos de 0,15 % en moles de oxígeno molecular. Cuando la carne es de cerdo, un ambiente de bajo oxígeno tiene preferiblemente menos de 1 % en moles de oxígeno molecular. El término "ambiente de bajo oxígeno" se destina también a cubrir un ambiente no gaseoso, p. ej., un líquido, ambiente en el que el oxígeno disuelto está a un nivel de menos de 10 g/m<sup>3</sup>, especialmente menos de 5 o 1 g/m<sup>3</sup>.
- 20 Por "ambiente de alto oxígeno" se entiende un ambiente gaseoso que contiene más de aproximadamente 2 % en moles, preferiblemente más de aproximadamente 5 % en moles de oxígeno molecular, especialmente más de aproximadamente 25, 50, 60, 65, 70, 72, 74 o 75 % en moles de oxígeno. Típicamente, los ambientes de alto oxígeno contienen hasta aproximadamente 80 % en moles de oxígeno, por ejemplo, alrededor de 75 % en moles de oxígeno.
- 25 Cuando están presentes otros gases en el ambiente en el que se envasa la carne, éstos consisten típicamente en uno o más gases utilizados convencionalmente en el envasado de productos alimentarios, especialmente un gas atmosférico seleccionado de nitrógeno, dióxido de carbono, y un gas noble (p. ej., helio, neón o argón). Se pueden utilizar el monóxido de carbono y/o el óxido nitroso pero son menos preferidos debido a problemas de toxicidad. Gases adicionales preferidos son dióxido de carbono y nitrógeno, especialmente nitrógeno.
- 30 Por "animal joven" se entiende un animal que está en una edad en la que normalmente podría ser sacrificado en primer lugar para carne, por ejemplo, cordero, ternera, cochinito o similares. El intervalo de edad real de un "animal joven" variará dependiendo del tipo de animal. Las edades típicas de animales jóvenes deben estar por debajo de aproximadamente 4 a 6 meses para el ganado vacuno (terneras) o por debajo de aproximadamente 18 meses para el ganado vacuno (vacas), por debajo de aproximadamente 5 meses para los cerdos y por debajo de aproximadamente 3 meses para las ovejas. Cualquier otro animal se puede considerar como un "animal viejo", por ejemplo, ganado vacuno, ovejas, cerdos o similares. Un ejemplo de animales "viejos" sería el ganado vacuno mayor de aproximadamente 3 años.
- 35 En una realización, la composición para uso en la invención comprende succinato y glutamato y/o malato. Esta combinación es especialmente preferida para el tratamiento de la carne que se va a conservar en un ambiente de bajo oxígeno.
- 40 Una composición preferida comprende succinato, glutamato y al menos uno de citrato, isocitrato y aconitato. Otra composición preferida comprende succinato, malato y al menos uno de citrato, isocitrato y aconitato. Una composición especialmente preferida comprende succinato, glutamato, malato y al menos uno de citrato, isocitrato y aconitato, en particular preferiblemente succinato, glutamato, malato y citrato.
- 45 Otra composición preferida comprende succinato, glutamato, malato y opcionalmente citrato, siendo esta combinación especialmente preferida para uso en ambientes de bajo oxígeno. Sin embargo, otra composición preferida comprende glutamato, malato y opcionalmente citrato (especialmente una que comprende glutamato, malato y citrato), siendo esta combinación especialmente preferida para su uso en ambientes de alto oxígeno.
- 50 En una realización preferida de la invención, la composición está esencialmente libre de piruvato, especialmente cuando la carne tratada se va a conservar en un ambiente de bajo oxígeno.
- 55 La cantidad ideal de succinato y de los otros componentes activos presentes en la composición puede depender de una serie de diferentes factores, por ejemplo, la naturaleza de la carne a tratar, la edad del animal en el momento del sacrificio, el tiempo entre el sacrificio y el tratamiento y así sucesivamente. Los valores enumerados más adelante se refieren a composiciones que son particularmente adecuadas para aplicación a la carne poco después del sacrificio,

por ejemplo, hasta aproximadamente 8 días *post mortem*, especialmente de 2 a 6 días, en particular aproximadamente 4 días, *post mortem*.

5 En una realización, los valores enumerados más adelante se refieren a la cantidad total de componentes activos de cada tipo presentes en la composición. Por ejemplo, "alrededor de 55 % en peso" de succinato significa preferiblemente que alrededor de 55 % en peso del total de los componentes activos en la composición consiste en succinatos, por ejemplo, combinaciones de ácido succínico y/o sales del mismo.

10 La cantidad de succinato presente en la composición varía típicamente de 25-95 % en peso del total de los componentes activos presentes en la composición, especialmente de 30-75 % o 40-60 %, por ejemplo, alrededor de 55 %, en peso. Las composiciones preferidas comprenden aproximadamente 35-40 % en peso de succinato (especialmente cuando la composición comprende citrato) o aproximadamente 50 % en peso de succinato (especialmente cuando la composición está libre de citrato). Las composiciones que tienen estos niveles preferidos de succinato son especialmente adecuadas para su uso a bajas concentraciones de oxígeno. La cantidad real o  
15 relativa de succinato que se requiere en la composición puede aumentar cuando aumenta la edad de la carne (*post mortem*). Por ejemplo, la carne que no está recién sacrificada se puede tratar con una composición que comprende 40-80 % de succinato (en peso del total de los componentes activos presentes en la composición), preferiblemente 50-65 % de succinato. El tratamiento con composiciones que tienen mayores niveles de succinato se puede realizar normalmente después de que la carne haya sido envejecida o madurada, por ejemplo después de un período de  
20 alrededor de 4, 6 u 8 días *post mortem*, por ejemplo, entre 10 y 28 días *post mortem* para la carne de vaca. Cuando la carne se va a conservar en altas concentraciones de oxígeno, los niveles de succinato pueden ser inferiores a los indicados anteriormente, normalmente hasta el 30 % en peso, por ejemplo, alrededor de 5-15 % en peso. En una realización, las composiciones están esencialmente libres de succinato. Por ejemplo, éstas pueden comprender menos de 5 %, por ejemplo menos de 2 %, preferiblemente menos de 1 % en peso de succinato.

25 El glutamato está normalmente presente en una cantidad de 0-75 %, por ejemplo de 0-50 % en peso del total de los componentes activos presentes en la composición, especialmente de 10-30 %, por ejemplo aproximadamente 20 %, en peso. Para el tratamiento de la carne a ser conservada en condiciones de bajo oxígeno, los niveles de glutamato son preferiblemente alrededor de 15-30 % en peso, especialmente aproximadamente 18 % o aproximadamente 25 % en peso. Para el tratamiento de la carne a ser conservada en condiciones de alto oxígeno, los niveles de glutamato son preferiblemente alrededor de 25-75 % en peso, especialmente aproximadamente 40-70 %, por ejemplo aproximadamente 50 %, en peso.

30 El malato está normalmente presente en una cantidad de 0-75 %, por ejemplo 0-40 % en peso del total de los componentes activos presentes en la composición, especialmente de 5-25 %, por ejemplo aproximadamente 10 %, en peso. Para el tratamiento de la carne a ser conservada en condiciones de bajo oxígeno, los niveles de malato son preferiblemente alrededor de 15-30 % en peso, especialmente aproximadamente 18 % o aproximadamente 25 % en peso. Para el tratamiento de la carne a ser conservada en condiciones de alto oxígeno, los niveles de malato son  
35 preferiblemente alrededor de 30-60 % en peso, especialmente aproximadamente 40 % o aproximadamente 50 % en peso.

40 Cuando el glutamato y el malato están ambos presentes, se pueden considerar en combinación como un único "componente" de la composición. La cantidad total de glutamato y malato juntos comprende preferiblemente hasta el 80 % en peso del total de los componentes activos presentes en la composición, especialmente 15-55 % en peso, por ejemplo aproximadamente 30 % en peso. La relación de glutamato a malato puede variar entre 1:0 a 0:1, especialmente entre 3:1 a 1:3, por ejemplo entre 3:1 a 1:1, especialmente aproximadamente 2:1 o aproximadamente 1:1.

45 El citrato, isocitrato y/o aconitato están típicamente presentes en una cantidad total de 0-50 % en peso del total de los componentes activos presentes en la composición, especialmente de 10-30 %, por ejemplo aproximadamente 15 %, en peso. La cantidad de citrato en las composiciones de la invención es preferiblemente de hasta 30 % en peso, por ejemplo aproximadamente 25 % en peso.

50 El piruvato está típicamente presente en una cantidad de 0-75 % en peso del total de los componentes activos presentes en la composición, especialmente una cantidad de menos de 10 %, 5 %, 2 %, 1 % o 0,5 % en peso, cuando la composición es para uso en el tratamiento de la carne que se va a conservar en un ambiente de bajo oxígeno y una cantidad entre 25 % y 60 %, por ejemplo aproximadamente 40 %, en peso, cuando la carne se va a conservar en un ambiente de alto oxígeno. En una realización alternativa, cuando la carne se va a conservar en un ambiente de alto oxígeno, la composición puede comprender poco o nada de piruvato, por ejemplo, menos de 5 %, 2 %, 1 % o 0,5 % en peso de piruvato.

55 La cantidad total de la composición añadida a la carne cruda, o al producto alimentario que comprende carne cruda, estará generalmente en el intervalo de 2-40 g/kg (basado en el peso total de los componentes activos de la composición por kg de carne o de producto alimentario que contiene carne), esto es, en el intervalo de 0,2-4 % en peso. Preferiblemente, la composición se añade en una cantidad de 5-30 g/kg (0,5-3 % en peso), especialmente de

## ES 2 548 510 T3

10-20 g/kg (1-2 % en peso). Se prefiere en particular una cantidad de aproximadamente 7,5, 10, 15 o 20 g/kg (0,75, 1, 1,5 o 2 % en peso), especialmente aproximadamente 20 g/kg (2 % en peso).

5 En otra realización, cualquiera de los valores en % en peso enumerados en la presente memoria en relación a la cantidad de cualquier agente activo en la composición, o la relación de todos los agentes activos, se pueden elegir también determinando la cantidad deseada de componente activo en una base molar (esto es, % en moles del agente o agentes activos en la composición). Como se apreciará, estos valores no serán necesariamente idénticos debido a diferencias en los pesos moleculares de los diferentes componentes activos. Cuando se hace referencia en esta memoria a una cantidad de 25-95 % en peso de succinato, por ejemplo, esta puede ser reemplazada por 25-95 % en moles de succinato en la composición. Como un ejemplo adicional, en lugar de alrededor de 55 % en peso de succinato, se puede utilizar alrededor de 55 % en moles de succinato, por ejemplo, una cantidad de succinato de alrededor de 55 milimoles por kg de carne (donde 100 % en moles indica 0,1 moles por kg de carne).

15 En términos de las cantidades molares de los componentes activos que se pueden añadir a la carne o al producto que contiene carne, 100 % en moles de cada componente representa típicamente un valor en el intervalo de hasta 0,2 moles por kg de carne o de producto alimentario que contiene carne, especialmente hasta 0,15 o 0,1 moles por kg, por ejemplo aproximadamente 0,1 moles por kg. En otra realización, el 100 % en moles de cada componente representa típicamente un valor de al menos 0,005 moles por kg, por ejemplo al menos 0,01 o 0,02 moles por kg. Cuando la carne o producto que contiene carne va a ser envasada en condiciones de bajo oxígeno, el 100 % en moles de cada componente representa preferiblemente un valor de 0,01 a 0,1 moles por kg, por ejemplo, alrededor de 0,05 o 0,075 moles por kg. Cuando la carne o producto que contiene carne va a ser envasada en condiciones de alto oxígeno, el 100 % en moles de cada componente representa preferiblemente un valor de 0,05 a 0,2 moles por kg, por ejemplo, alrededor de 0,1 o 0,15 moles por kg.

25 Cuando la composición se mezcla con un producto que contiene carne, por ejemplo, carne picada, o se pulveriza directamente sobre el producto, por ejemplo, un corte de carne cruda, comprenderá típicamente la masa (o proporción molar) de los componentes individuales citados anteriormente. Alternativamente, cuando se pone en contacto la composición con el producto que contiene carne mediante inmersión o remojo, las cantidades de cada componente en la composición de tratamiento serán típicamente mucho mayores que las enumeradas anteriormente. Sin embargo, cada componente estará presente en general en la misma proporción que se define en esta memoria y el procedimiento de tratamiento se optimiza para proporcionar el producto con las masas mencionadas antes de cada componente después del tratamiento. Esto se puede determinar, por ejemplo, llevando a cabo el procedimiento sobre una serie de productos de ensayo en diferentes condiciones (concentraciones, tiempos, temperaturas, etc.) y analizando los productos tratados para determinar la cantidad de componentes cogidos, utilizando equipo estándar.

35 Las cantidades absolutas de cada componente en la composición dependerán de la cantidad de composición requerida, por ejemplo, dependiendo de la cantidad a tratar de producto que contiene carne. Sin embargo, como la composición comprenderá típicamente los componentes activos enumerados anteriormente (especialmente cuando la composición es una composición sólida), la cantidad de cada componente en peso de la composición se puede calcular utilizando los porcentajes en peso enumerados anteriormente. En el caso de que se incluyan en la composición uno o más diluyentes, vehículos u otros agentes inertes (esto es, un agente que no tiene ningún efecto significativo sobre la estabilidad del color y/o sobre la ranciedad de un producto de carne tratado), la cantidad de cada componente en peso será modificada proporcionalmente.

40 Preferiblemente, los componentes activos de la composición estarán presentes en las siguientes proporciones en peso (o en proporción molar):

45 - cuando la composición comprende (p. ej., consiste esencialmente en) succinato y glutamato, estos están presentes preferiblemente en una relación de 9:1 a 1:1 de succinato:glutamato, preferiblemente de 8:2 a 7:3, p. ej., aproximadamente 11:4.

- cuando la composición comprende (p. ej., consiste esencialmente en) succinato y malato, estos están presentes preferiblemente en una relación de 19:1 a 6:4 de succinato:malato, preferiblemente de 9:1 a 8:2, p. ej., aproximadamente 11:2.

50 - cuando la composición comprende (p. ej., consiste esencialmente en) succinato, glutamato y malato, estos están presentes preferiblemente en una relación de 17:2:1 a 5:3:2 de succinato:glutamato:malato, por ejemplo aproximadamente 11:4:2. Una composición preferida, especialmente para uso con la carne a ser conservada en condiciones de bajo oxígeno, tiene una relación de aproximadamente 2:1:1 de succinato:glutamato:malato. La relación de succinato a (glutamato + malato) está preferiblemente entre 4:1 y 1:1, por ejemplo aproximadamente 2:1. Una composición preferida, especialmente para uso con la carne a ser conservada en condiciones de bajo oxígeno, tiene una relación de succinato a (glutamato + malato) de aproximadamente 1:1.

5 - cuando la composición comprende (p. ej., consiste esencialmente en) succinato, glutamato y malato con uno o más de citrato, isocitrato y aconitato, estos están presentes preferiblemente en una relación de aproximadamente 11:4:2:3 de succinato:glutamato:malato:(citrato, isocitrato y/o aconitato total). Una composición preferida, especialmente para uso con la carne a ser conservada en condiciones de bajo oxígeno, tiene una relación de aproximadamente 6:3:3:4 de succinato:glutamato:malato:(citrato, isocitrato y/o aconitato total). La relación de succinato a (glutamato + malato) a (citrato, isocitrato y/o aconitato total) es preferiblemente de aproximadamente 4:2:1, especialmente preferiblemente de aproximadamente 3:3:2, cuando la composición es para uso con la carne a ser conservada en condiciones de bajo oxígeno.

10 - cuando la composición comprende (p. ej., consiste esencialmente en) glutamato, malato y citrato, estos están presentes preferiblemente en una relación de 3:1:0 a 1:3:1 de glutamato:malato:citrato. La relación de (glutamato + malato) a citrato está preferiblemente entre 1:0 a 3:1.

15 En una realización preferida, al menos uno de los componentes activos está presente en la forma del ácido y también como una sal de la base conjugada de dicho ácido. Preferiblemente, la relación de ácido a base conjugada es de tal modo que proporciona a la composición el pH deseado como se describe aquí. En una realización preferida, la relación molar de un ácido a su base conjugada para uno o más de los componentes activos que comprenden dichas formas está en el intervalo de 9:1 a 1:9, por ejemplo de 17:3 a 1:1, especialmente alrededor de 4:1. En una realización especialmente preferida, la composición comprende ácido succínico y succinato de sodio en una relación molar de aproximadamente 4:1.

20 Las composiciones para uso en los métodos de la invención normalmente estarán en forma líquida o sólida. Alternativamente, la composición puede estar en la forma de un coloide, por ejemplo, una emulsión, o un gel. Una composición líquida se proporciona generalmente como una solución de los componentes activos en un líquido de grado alimentario, por ejemplo como una solución acuosa en agua, en aceite y/o en salmuera, o como una solución alcohólica. Para las soluciones preparadas en salmuera, la solución puede comprender la sal (p. ej. cloruro de sodio) a una concentración entre 0,1 y 2 M, especialmente aproximadamente 1 M. Para los presentes fines, el cloruro de sodio no se considera como un componente activo, aunque puede tener algunos efectos sobre la conservación y/o sobre la estabilidad del color de un producto cárnico tratado. Las composiciones se añaden típicamente a la carne de manera que se mantenga el pH de la carne alrededor o por debajo de aproximadamente 5,8. Las soluciones acuosas pueden ser alcalinas o ácidas, pero son típicamente ligeramente ácidas, por ejemplo, con un pH de 5 a 7, especialmente un pH de aproximadamente 6, tal como 5,8. La alcalinidad se puede alcanzar, por ejemplo, utilizando cualquier álcali de grado alimentario, por ejemplo hidróxido de sodio o bicarbonato de sodio. Una composición sólida normalmente se proporcionará como un polvo, por ejemplo como un polvo secado por pulverización, preparado de una manera convencional. Los geles y emulsiones, se pueden preparar utilizando aditivos convencionales, por ejemplo hidrocoloides de grado alimentario tales como la goma de xantano, goma arábiga y carboximetilcelulosa.

35 Los métodos de la invención se pueden aplicar a cualquier producto que contenga carne cruda, por ejemplo, cortes de carne cruda, carne picada, embutidos y similares. El origen de la carne puede ser uno o más animales que normalmente proporcionan la carne destinada al consumo humano o animal (p. ej., alimentos para mascotas). Preferiblemente, la carne se destinará al consumo humano. Los animales adecuados para el abastecimiento de carne incluyen los animales de granja (p. ej., ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras, etc.), aves de corral (p. ej., pollos, pavos, etc.), pescado (p. ej., los peces pelágicos tales como el salmón, la trucha, la caballa, las sardinas, el atún, el arenque, etc.) y animales salvajes (p. ej., ciervos, avestruces, cocodrilos, etc.). La carne a tratar es preferiblemente una carne roja, por ejemplo, carne que contiene una cantidad visualmente observable de mioglobina en la superficie. Se puede utilizar la carne de animales jóvenes y viejos, como se definen en la presente memoria. Los métodos descritos aquí también son particularmente adecuados para el tratamiento de pescado graso, por ejemplo, peces que son particularmente propensos a la ranciedad durante el almacenamiento, especialmente el salmón, la caballa y el atún.

45 La carne puede estar en piezas unitarias, en trozos o en dados o picada como es tradicional en la industria alimentaria. Cuando el producto que contiene carne comprende otros ingredientes, éstos pueden ser cualquier producto alimentario adecuado, por ejemplo, masa de repostería, arroz, pasta, salsas, verduras, etc.

50 El tratamiento de la carne o del producto que contiene carne se puede realizar utilizando métodos conocidos de aplicación. Por ejemplo, el tratamiento de un producto que contiene carne con una composición líquida se puede hacer por mezcla, pulverización, inmersión, recubrimiento, etc. El tratamiento con una composición sólida se hará típicamente por mezcla, espolvoreo, etc. La carne se puede tratar con una composición utilizando métodos de recubrimiento conocidos para proporcionar el llamado "envasado activo", por ejemplo, una película delgada de un gel hidrocoloidal o similar que comprende los componentes activos para controlar el acceso de humedad o de oxígeno. Cuando la composición se queda sobre la superficie de la carne después del tratamiento, ésta se puede mantener o lavar antes del envasado.

55 La carne o el producto que contiene carne se envasa, por ejemplo, en una atmósfera modificada. Los métodos para el envasado en atmósfera modificada (MAP) de productos alimentarios, por ejemplo, productos que contienen carne,

son bien conocidos e incluyen el envasado en recipientes hechos de metal y/o de materiales plásticos, el envasado en papel de aluminio, en bandejas selladas con papel de aluminio, en lámina de plástico, etc. Cuando el producto que contiene carne consiste esencialmente en carne, el envasado incluye preferiblemente una almohadilla absorbente de humedad.

- 5 El envasado de los productos utilizando MAP (atmósfera modificada) se hará típicamente en condiciones de bajo oxígeno o de alto oxígeno como se define en esta memoria. En este caso, normalmente el envase se cerrará herméticamente para evitar el escape de la atmósfera modificada. Alternativamente, cuando el producto que contiene carne se envasa en condiciones esencialmente atmosféricas, al menos una parte del envase será típicamente permeable a los gases.
- 10 Una vez envasado, el producto que contiene carne normalmente se almacenará durante un período de tiempo, por ejemplo antes y/o durante el transporte y en el punto de venta. Las condiciones adecuadas para el almacenamiento (p. ej., temperatura) se pueden determinar fácilmente. El período de tiempo de almacenamiento será típicamente del orden de 1-15 días, por ejemplo de 3 a 12 días, especialmente alrededor de 6, 7 u 8 días. Se prefiere el almacenamiento durante un periodo de tiempo de al menos 3 días, por ejemplo de al menos 5, 6, 8, 10 o 12 días,
- 15 por ejemplo, antes de que se elimine la atmósfera modificada o se sustituya con otra atmósfera. Los productos cárnicos envasados en atmósfera de bajo oxígeno se almacenan preferiblemente durante un período de al menos 6 días, especialmente de al menos 10 días, por ejemplo, alrededor de 13 días. Los productos cárnicos envasados en atmósfera de alto oxígeno se almacenan preferiblemente durante un período de hasta 6 días, por ejemplo, alrededor de 4 días.
- 20 Los efectos de las composiciones definidas en esta memoria sobre el color de productos que contienen carne se pueden determinar según métodos conocidos. Por ejemplo, se puede evaluar el cambio de color con el tiempo utilizando la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR), por ejemplo, a longitudes de onda entre 400 y 2500 nm, utilizando un equipo convencional. Los cambios de color se pueden describir convenientemente utilizando los parámetros del sistema "CIELAB", donde L\* representa la claridad (L\* = 0 indica negro y L\* = 100 indica blanco difuso), a\* representa la posición entre rojo/magenta y verde (los valores negativos de a\* indican verde mientras que los valores positivos indican magenta) y b\* representa la posición entre amarillo y azul (los valores negativos de b\* indican azul y los valores positivos indican amarillo). Un valor bajo de b\* (más azul) es indicativo de un color favorable en la carne cruda, como también lo es un valor alto de a\* (más rojo)
- 25 Las combinaciones de componentes activos descritas en esta memoria son nuevas en sí mismas y por lo tanto forman un aspecto adicional de la invención.
- 30 En un aspecto adicional, la invención proporciona así una composición que comprende (p. ej., que consiste esencialmente en) succinato y glutamato y/o malato, en donde el succinato está presente en una cantidad de 25 a 95 % en peso del total de los componentes activos. Dicha composición puede ser proporcionada de acuerdo con cualquiera de las realizaciones específicas descritas en esta memoria en relación con los métodos de la invención.
- 35 La invención se extiende además a una composición que comprende (p. ej., que consiste esencialmente en) glutamato, malato y, opcionalmente citrato, en donde el malato está presente en una cantidad de 5 a 25 % en peso del total de los componentes activos. Dicha composición se puede proporcionar de acuerdo con cualquiera de las realizaciones específicas descritas en esta memoria en relación con los métodos de la invención. En particular, esta composición puede estar esencialmente libre de piruvato y/o de succinato.
- 40 Las composiciones según la invención se proporcionan típicamente en forma de un polvo (p. ej., un granulado) que se puede dispersar o disolver en una solución acuosa o alcohólica en el punto de uso. Alternativamente, las composiciones se pueden proporcionar en forma lista para el uso, por ejemplo en la forma de un líquido.
- Una composición particularmente preferida según la invención comprende succinato, glutamato, citrato y malato en una relación de aproximadamente 11:4:3:2. Las composiciones preferidas no comprenden piruvato.
- 45 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición como se define en la presente memoria en un método de la invención.
- La invención se describirá ahora además con referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitantes en las que:
- La Figura 1 presenta una superficie de respuesta calculada para el efecto de la variación de las concentraciones de succinato, piruvato y glutamato+malato (como una única variable) sobre los valores de a\* de la carne tratada
- 50 después de 6 días de almacenamiento. Las curvas muestran el cambio en los valores de a\*, siendo las curvas hacia el extremo derecho los valores más bajos y siendo las del extremo izquierdo los valores más altos. El rectángulo en negrita muestra la región del gráfico que contiene el valor máximo de a\*.

- La Figura 2 presenta la varianza en porcentaje calculada a lo largo del tiempo por la mezcla de los componentes (succinato, glutamato, malato y citrato) para las muestras en concentración de bajo oxígeno. El gráfico indica la contribución que hacen los componentes a los cambios en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en días diferentes.
- 5 La Figura 3 presenta la varianza en porcentaje calculada a lo largo del tiempo por la mezcla de los componentes (succinato, glutamato, malato y citrato) para las muestras en concentración de alto oxígeno. El gráfico indica la contribución que hacen los componentes a los cambios en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en días diferentes.
- La Figura 4 presenta la varianza en porcentaje calculada a lo largo del tiempo por la concentración de citrato para las muestras en concentración de alto oxígeno. El gráfico indica la contribución que hace la concentración de citrato a los cambios en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en días diferentes.
- 10 La Figura 5 presenta un diseño experimental que es un diseño factorial  $2^2$  en la edad y el tipo de grasa. En cada punto se añadió un diseño de mezcla centroide simplex de 8 puntos (7 puntos experimentales y 1 réplica, véase el triángulo) y, posteriormente, un diseño  $2^4$  ilustrado por dos cubos. Las flechas indican que un punto experimental se describe por el siguiente diseño. Cada esquina del diseño  $2^2$  se midió en un día. Para más detalles véase el Ejemplo 5 (Materiales y métodos).
- 15 La Figura 6 presenta la media de los valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  (156 muestras) en función del tiempo para el envasado con bajo oxígeno (A) y con alto oxígeno (B). El negro, gris oscuro y gris representan  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , respectivamente, donde  $a^*$  y  $b^*$  asociados al eje de ordenadas están en el lado izquierdo y  $L^*$  asociado al eje de ordenadas en el lado derecho de cada figura. Las barras de error son desviaciones estándar.
- 20 La Figura 7 presenta un modelo ajustado de las medidas de color  $a^*$  y  $b^*$  como una respuesta al tratamiento con diferentes aditivos; cada esquina representa una salmuera con un aditivo,  $a^*$  está representado en A y B, y  $b^*$  está representado en C y D. Se midieron las muestras el día 3 de envasado. Las muestras envasadas con bajo oxígeno se sitúan en A y C, y las muestras con alto oxígeno se sitúan en B y D. Los códigos de color son un gradiente de rojo a azul, donde el rojo es la respuesta más alta (indicada en cada caso por una flecha) y el azul es la respuesta más baja para ambas variables. Las líneas y los colores representan una transición suave del valor más bajo al más alto; los valores máximo y mínimo; el max-min es diferente para cada panel: A) 5,0-9,5; B) 11,4-13-3; C) 1,2-3-7; D) 4,2-4,9. Los datos no están normalizados.
- 25 La Figura 8 presenta una distribución porcentual de DMb, OMb y MMb en función del tiempo para el envasado con bajo oxígeno (A) y con alto oxígeno (B). El negro, gris oscuro y gris representan DMb, MMb y OMb, respectivamente. El eje de ordenadas muestra la cantidad relativa de cada estado de mioglobina en el día respectivo y las barras de error son desviaciones estándar. Las barras de error son demasiado pequeñas para ser visibles.
- 30 La Figura 9 presenta el modelo apropiado (significa ajustado) de medidas de mioglobina no normalizadas como una respuesta al tratamiento con diferentes aditivos; cada esquina representa salmuera con un único aditivo. La DMb se representa en A y B, la OMb se representa en C y D, y la MMb se representa en E y F. Se midieron las muestras el día 3 del experimento. Las muestras envasadas con bajo oxígeno se sitúan en A, C y E, y las muestras envasadas con alto oxígeno se sitúan en B, D y F. Los códigos de color son un gradiente de rojo a azul, donde el rojo es la respuesta más alta (marcada en cada caso con una flecha) y el azul es la respuesta más baja para los tres estados. Las líneas representan una transición suave del valor más bajo al más alto; los valores máximo y mínimo: para A, C, E el intervalo es de 0,03 a 1,03; -0,06 a 0,84; y -0,02 a 0,99 respectivamente; para B, D y F el intervalo es de -0,1 a -0,06; 0,79 a 0,94; y 0,08 a 0,16 respectivamente. Los datos no están normalizados.
- 35 Ejemplo 1 - Tratamiento de la carne con diferentes componentes
- Productos químicos y otros materiales
- Los siguientes compuestos se obtuvieron de Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Alemania): succinato de sodio hexahidrato, ácido succínico y ácido pirúvico. Los siguientes productos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania): piruvato de sodio, ácido glutámico, ácido málico y sal disódica del ácido DL-málico. El hidrogenoglutamato de sodio monohidrato fue adquirido de VWR International BVBA (Lovaina, Bélgica). El ácido cítrico monohidrato y el citrato trisódico se adquirieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Todos los productos químicos eran de calidad analítica.
- 45 La lámina de plástico para envasado era BIAxER 65 XX HFPaFM (permeable al oxígeno a 5 y 7 ml) y se adquirió de Wipak, Nastola, Finlandia. Las muestras se envasaron en cajas de HDPE negras convencionales.
- 50 Se utilizaron grasa de vaca y grasa de cerdo (alto grado de insaturación) con el músculo semimembranoso crudo de ganado vacuno joven y viejo. Se separó la carne de vaca de la pata trasera, se pesó, se cortó, se mezcló con grasa (14 % en peso), y se añadieron a la carne picada los diferentes compuestos de ensayo. Se envasaron las mezclas en cajas y se sellaron con láminas de plástico. El envasado se hizo con MAP (atmósfera modificada) para producir

una atmósfera de bajo oxígeno (60 % de CO<sub>2</sub> y 40 % de N<sub>2</sub>) y también con una atmósfera de alto oxígeno (75 % de oxígeno y 25 % de CO<sub>2</sub>). Se conservaron las muestras en la oscuridad a 4 °C de 0 a 8 días para la atmósfera de alto oxígeno y de 0 a 13 días para las muestras de MAP. Se utilizó una Cheers Packaging Machine (Promens) para el envasado de las muestras. Las muestras de referencia por triplicado con sólo 40 ml de agua destilada mezcladas y envasadas como se ha descrito anteriormente, se evaluaron los días 6 y 8 para la atmósfera de alto oxígeno y los días 6, 8, 10 y 13 para el ambiente de MAP.

Se utilizó la grasa de vaca y de cerdo y la carne de animales jóvenes y viejos (de aproximadamente 1 año y 4 años, respectivamente) para investigar el sistema debido a que (1) la grasa de cerdo es típicamente más oxidativa que la grasa de vaca y (2) los animales más viejos normalmente tienen más pigmento de color en la carne.

10 Preparación de las muestras del compuesto de ensayo

Se prepararon las muestras de los compuestos de ensayo con succinato, glutamato, malato, piruvato y citrato en diferentes combinaciones, como productos químicos individuales o como mezclas. Se añadió el ácido y la base conjugada de cada componente activo en la relación apropiada para proporcionar las soluciones (salmueras) con un pH de 5,8. Como quedará claro por la descripción anterior, el "succinato" utilizado en este experimento era una combinación de ácido succínico y succinato sódico. El "glutamato", "malato", etc. se utilizaron de manera equivalente.

Se cortaron la carne y la grasa en trozos pequeños y se trituraron (agujeros de 3 mm). Se añadieron 40 g de salmuera a 360 g de carne picada y se envasaron en el envase de plástico.

Diseño del experimento

20 Se incluyeron varias variables en el diseño del experimento, utilizando un diseño factorial 2<sup>3</sup>. Se variaron la composición de ácidos grasos (cerdo/vaca), la edad del ganado vacuno y la concentración de O<sub>2</sub>, así como las concentraciones de citrato, piruvato, succinato, malato y glutamato. El malato y el glutamato se consideraron juntos en el diseño y en el análisis, pero su relación se varió en los experimentos desde malato puro hasta glutamato puro.

25 Se realizaron cuatro experimentos con 39 muestras y dos muestras de referencia durante cada ensayo, esto es, un total de 156 muestras y 8 muestras "ciegas".

Análisis del color

Los cambios de color en las muestras se midieron con un analizador FOSS NIRSystems™ 6500 y un medidor Konica Minolta Chroma meter CR 410 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japón). Se midió el color utilizando los parámetros L\*, a\* y b\* los días 0, 1, 3, 6 y 8 para las muestras conservadas en 75 % de oxígeno. Se midieron los cambios de color de las muestras envasadas en MAP (atmósfera modificada) a los 0, 1, 3, 6, 8, 10 y 13 días de tiempo de almacenamiento.

Resultados

Los resultados de los experimentos llevados a cabo sobre las diferentes muestras de carne y de grasa se presentan a continuación en las Tablas 1 a 8. Los valores dados para la cantidad de los agentes activos en las Tablas 1 a 8 corresponden a la proporción molar del agente dado dentro de la mezcla de salmuera/carne, donde un valor de 1 corresponde a 0,1 moles de agente activo por kg de carne, un valor de 0,5 corresponde a 0,05 mol/kg, etc. Cada tabla presenta los resultados para un tipo de muestra diferente, esto es, músculo de vaca joven con grasa de vaca en un ambiente de bajo oxígeno (Tabla 1). Se presentan los valores de b\*, que se considera que son los más representativos de los cambios de color en la carne a analizar. Todos los resultados corresponden a medidas realizadas el día 6 de almacenamiento.

Tabla 1 - Efecto sobre b\* de los diferentes compuestos en el músculo de vaca joven mezclado con grasa de vaca en atmósfera de bajo oxígeno (MAP)

Citrato	Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	b*	Desviación estándar
0,00	1,00	0,00	0,00	1,07	0,15
0,25	0,78	0,00	0,22	1,23	0,14
0,00	0,50	0,00	0,50	1,27	0,14
0,25	1,00	0,00	0,00	1,32	0,19
0,25	0,50	0,00	0,50	1,37	0,14
0,00	0,00	0,00	1,00	1,75	0,19
0,00	0,50	0,50	0,00	1,88	0,14
0,25	0,50	0,50	0,00	2,08	0,14

ES 2 548 510 T3

0,25	0,33	0,33	0,33	2,28	0,09
0,00	0,33	0,33	0,33	2,34	0,09
0,25	0,00	0,00	1,00	2,34	0,19
0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,10
0,25	0,00	0,50	0,50	3,58	0,14
0,00	0,00	0,50	0,50	3,87	0,14
0,25	0,00	1,00	0,00	4,00	0,19
0,00	0,00	1,00	0,00	4,24	0,19
0,00	0,00	0,86	0,14	4,31	0,15

Tabla 2 - Efecto sobre b\* de los diferentes compuestos en el músculo de vaca joven mezclado con grasa de cerdo en atmósfera de bajo oxígeno (MAP)

Citrato	Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	b*	Desviación estándar
0,00	0,92	0,08	0,00	1,32	0,16
0,00	1,00	0,00	0,00	1,34	0,18
0,00	0,50	0,00	0,50	1,44	0,14
0,25	0,26	0,00	0,74	1,60	0,14
0,25	0,50	0,00	0,50	1,71	0,14
0,25	0,00	0,00	1,00	1,73	0,19
0,00	0,00	0,00	1,00	1,83	0,19
0,00	0,50	0,50	0,00	1,86	0,14
0,00	0,00	0,00	0,00	2,14	0,31
0,25	0,33	0,33	0,33	2,15	0,09
0,25	0,50	0,50	0,00	2,19	0,14
0,00	0,33	0,33	0,33	2,35	0,09
0,25	1,00	0,00	0,00	2,59	0,19
0,25	0,00	0,50	0,50	2,75	0,14
0,25	0,00	1,00	0,00	2,94	0,19
0,25	0,00	0,86	0,14	2,97	0,15
0,00	0,00	0,50	0,50	3,75	0,14
0,00	0,00	1,00	0,00	3,93	0,14
0,00	0,00	0,80	0,20	4,07	0,12

5 Tabla 3 - Efecto sobre b\* de los diferentes compuestos en el músculo de vaca vieja mezclado con grasa de vaca en atmósfera de bajo oxígeno (MAP)

Citrato	Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	b*	Desviación estándar
0,25	0,60	0,00	0,40	0,81	0,14
0,25	0,50	0,00	0,50	0,83	0,14
0,25	1,00	0,00	0,00	1,10	0,19
0,00	0,32	0,00	0,68	1,21	0,13
0,00	0,50	0,00	0,50	1,23	0,14
0,00	0,00	0,00	1,00	1,27	0,14
0,00	0,50	0,50	0,00	1,47	0,14
0,00	1,00	0,00	0,00	1,48	0,18
0,25	0,00	0,00	1,00	1,48	0,19
0,25	0,50	0,50	0,00	1,77	0,14
0,25	0,33	0,33	0,33	1,78	0,09
0,00	0,00	0,00	0,00	1,82	0,02
0,00	0,33	0,33	0,33	1,90	0,09
0,25	0,00	0,50	0,50	2,95	0,14
0,00	0,00	1,00	0,00	3,00	0,19
0,00	0,00	0,50	0,50	3,01	0,14
0,00	0,00	0,74	0,26	3,23	0,14
0,25	0,00	1,00	0,00	3,60	0,19

ES 2 548 510 T3

Tabla 4 - Efecto sobre b\* de los diferentes compuestos en el músculo de vaca vieja mezclado con grasa de cerdo en atmósfera de bajo oxígeno (MAP)

Citrato	Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	b*	Desviación estándar
0,00	0,94	0,06	0,00	0,97	0,13
0,00	1,00	0,00	0,00	0,98	0,15
0,25	0,32	0,00	0,68	1,02	0,14
0,00	0,50	0,00	0,50	1,06	0,13
0,25	0,50	0,00	0,50	1,07	0,14
0,25	0,00	0,00	1,00	1,21	0,19
0,00	0,00	0,00	1,00	1,44	0,14
0,00	0,50	0,50	0,00	1,56	0,13
0,25	1,00	0,00	0,00	1,85	0,19
0,25	0,33	0,33	0,33	2,00	0,09
0,00	0,33	0,33	0,33	2,01	0,09
0,25	0,50	0,50	0,00	2,23	0,14
0,25	0,00	0,50	0,50	2,90	0,14
0,00	0,00	0,00	0,00	3,12	0,18
0,00	0,00	0,50	0,50	3,43	0,13
0,00	0,00	1,00	0,00	3,67	0,14
0,25	0,00	1,00	0,00	3,77	0,19
0,00	0,00	0,82	0,18	3,79	0,12

5 Tabla 5 - Efecto sobre b\* de los diferentes compuestos en el músculo de vaca joven mezclado con grasa de vaca en atmósfera de alto oxígeno

Citrato	Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	b*	Desviación estándar
0,25	0,64	0,00	0,36	3,74	0,25
0,25	0,50	0,00	0,50	3,77	0,25
0,25	1,00	0,00	0,00	3,96	0,33
0,00	0,98	0,02	0,00	4,01	0,32
0,00	1,00	0,00	0,00	4,01	0,33
0,25	0,33	0,33	0,33	4,07	0,16
0,25	0,50	0,50	0,00	4,20	0,25
0,00	0,50	0,00	0,50	4,27	0,25
0,00	0,50	0,50	0,00	4,32	0,25
0,00	0,33	0,33	0,33	4,34	0,16
0,25	0,00	0,00	1,00	4,44	0,33
0,25	0,00	0,50	0,50	4,45	0,25
0,00	0,00	0,00	1,00	4,62	0,26
0,00	0,00	0,50	0,50	4,66	0,24
0,25	0,00	1,00	0,00	4,71	0,33
0,00	0,00	0,00	0,00	4,95	0,33
0,00	0,00	1,00	0,00	5,32	0,26

Tabla 6 - Efecto sobre b\* de los diferentes compuestos en el músculo de vaca joven mezclado con grasa de cerdo en atmósfera de alto oxígeno

Citrato	Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	b*	Desviación estándar
0,25	0,60	0,00	0,40	4,45	0,25
0,25	0,50	0,00	0,50	4,47	0,25
0,25	0,33	0,33	0,33	4,49	0,16
0,00	0,62	0,38	0,00	4,50	0,23
0,00	0,50	0,50	0,00	4,51	0,24
0,25	0,50	0,50	0,00	4,53	0,25
0,00	0,33	0,33	0,33	4,57	0,16
0,25	0,00	1,00	0,00	4,58	0,33
0,00	0,00	0,50	0,50	4,66	0,24

0,25	0,00	0,50	0,50	4,69	0,25
0,00	1,00	0,00	0,00	4,70	0,26
0,25	1,00	0,00	0,00	4,73	0,33
0,00	0,50	0,00	0,50	4,77	0,24
0,00	0,00	0,00	1,00	4,92	0,26
0,00	0,00	1,00	0,00	5,02	0,33
0,25	0,00	0,00	1,00	5,05	0,33
0,00	0,00	0,00	0,00	5,42	0,08

Tabla 7 - Efecto sobre b\* de los diferentes compuestos en el músculo de vaca vieja mezclado con grasa de vaca en atmósfera de alto oxígeno

Citrato	Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	b*	Desviación estándar
0,00	0,54	0,46	0,00	3,17	0,24
0,00	0,50	0,50	0,00	3,17	0,24
0,25	0,00	1,00	0,00	3,31	0,33
0,00	1,00	0,00	0,00	3,45	0,26
0,25	0,50	0,50	0,00	3,46	0,25
0,25	0,33	0,33	0,33	3,47	0,15
0,00	0,33	0,33	0,33	3,51	0,16
0,25	0,50	0,00	0,50	3,58	0,25
0,00	0,00	1,00	0,00	3,58	0,26
0,25	0,00	0,50	0,50	3,61	0,25
0,00	0,00	0,50	0,50	3,69	0,24
0,25	1,00	0,00	0,00	3,87	0,33
0,00	0,50	0,00	0,50	3,90	0,24
0,25	0,00	0,00	1,00	4,15	0,33
0,00	0,00	0,00	1,00	4,43	0,33
0,00	0,00	0,00	0,00	4,75	0,22

Tabla 8 - Efecto sobre b\* de diferentes compuestos en el músculo de vaca vieja mezclado con grasa de cerdo en atmósfera de alto oxígeno

Citrato	Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	b*	Desviación estándar
0,00	0,62	0,38	0,00	3,56	0,25
0,00	0,50	0,50	0,00	3,58	0,25
0,00	0,33	0,33	0,33	3,76	0,16
0,00	1,00	0,00	0,00	3,77	0,33
0,25	0,54	0,00	0,46	3,80	0,25
0,25	0,50	0,00	0,50	3,81	0,25
0,25	0,33	0,33	0,33	3,82	0,15
0,25	0,00	1,00	0,00	3,90	0,33
0,00	0,00	0,50	0,50	3,90	0,25
0,25	0,50	0,50	0,00	3,91	0,25
0,25	0,00	0,50	0,50	3,97	0,25
0,00	0,50	0,00	0,50	4,02	0,25
0,00	0,00	1,00	0,00	4,08	0,33
0,25	1,00	0,00	0,00	4,18	0,33
0,25	0,00	0,00	1,00	4,29	0,33
0,00	0,00	0,00	1,00	4,35	0,33
0,00	0,00	0,00	0,00	4,41	0,15

- 5 Los datos anteriores muestran el efecto de los diferentes compuestos sobre la coloración de la carne después del almacenamiento. Los valores más bajos de b\* son indicativos de una mejor estabilidad del color y de un menor grado de oxidación de la carne. Las muestras conservadas en atmósfera modificada (MAP) tienen valores globales de b\* más bajos porque la oxidación que tiene lugar es predominantemente por oxidación química mediante compuestos aparte del oxígeno y mediante procesos anaeróbicos, por ejemplo, mediados por bacterias. Por
- 10 contraste, las muestras conservadas en ambiente de alto oxígeno se oxidan en mucho mayor grado, como se indica por el aumento global del valor de b\*.

Los resultados anteriores indican los efectos sorprendentes y significativos de las mezclas de compuestos sobre la estabilidad del color de las muestras.

Ejemplo 2 - Análisis estadístico de los resultados

Análisis y métodos estadísticos

5 Se analizaron los datos del experimento descrito en el Ejemplo 1 utilizando un modelo ANOVA con todos los efectos, efecto principal y efectos de segundo orden y de órdenes más altos según el método descrito en Langsrud, Ø. ("50-50 Multivariate Analysis of Variance for Collinear Responses" The Statistician (2002) 51, pp. 305-317). Se realizó el análisis como un experimento que era factorial en la concentración de oxígeno, en la edad (dos grupos), en la composición de ácidos grasos (grado de insaturación, esto es, dos niveles), y en la mezcla de componentes (piruvato, glutamato/malato y succinato, citrato - en dos niveles - y una mezcla de glutamato/malato). El diseño de mezcla fue fraccional.

Superficie de respuesta

15 Los datos relativos a la variación de las cantidades de determinados compuestos de ensayo y a los efectos sobre los parámetros de color (en este caso, a\*) se analizaron como se ha descrito anteriormente. Se considera que un valor bajo de a\* indica carne de color marrón y un valor alto de a\* indica carne roja.

Los datos relativos a la superficie de respuesta que se muestran en la Figura 1 se generaron a partir de la siguiente tabla:

Tabla 9 - El efecto sobre a\* de la variación de las cantidades relativas de succinato, piruvato y (glutamato + malato)

Succinato	Piruvato	Glutamato/malato	a*	Desviación estándar
1,00	0,00	0,00	9,81	0,22
0,00	1,00	0,00	5,76	0,20
0,00	0,00	1,00	9,14	0,21
0,50	0,50	0,00	8,89	0,19
0,50	0,00	0,50	10,18	0,23
0,00	0,50	0,50	5,88	0,23
0,33	0,33	0,33	8,34	0,11

20 La superficie de respuesta que se muestra en la Figura 1 ilustra el cambio de a\* cuando las cantidades relativas de succinato, piruvato y glutamato+malato se variaron en el ambiente bajo en oxígeno (a concentración cero de citrato). El rectángulo sobre la figura muestra la parte en la que el valor de a\* es el más alto, esto es, a baja concentración de piruvato, alta concentración de succinato y concentración intermedia de glutamato + malato.

Estos datos indican que el succinato solo no es la mejor composición para tratar la carne para la estabilidad del color. Más bien, una mezcla con componentes que tienen una relación particular da los resultados óptimos.

25 El efecto de los aditivos sobre el grado de varianza

30 Se realizó un análisis adicional para determinar el efecto porcentual sobre la varianza de los tres parámetros de color para los diferentes aditivos a lo largo del tiempo. Las figuras 2 y 3 presentan el efecto de la mezcla de los componentes activos (incluyendo citrato) sobre la varianza. La Figura 2 presenta los resultados para las muestras en MAP (bajo nivel de oxígeno) y la Figura 3 presenta los resultados en atmósfera de alto oxígeno. La Figura 4 presenta el efecto del citrato solo sobre la varianza en el ambiente de alto oxígeno.

35 Los resultados mostrados en la Figura 2 indican que los aditivos tienen efectos dominantes hasta 6 días después del tratamiento. A partir de entonces, las bacterias comienzan a tener cierta influencia, que culmina en los resultados observados a los 13 días, cuando se reduce la influencia de los aditivos. Los resultados mostrados en la Figura 3 indican que los efectos más significativos con alto oxígeno se deben a las bacterias aerobias que estropean los alimentos (la carne es de color rojo desde el principio en la atmósfera de alto oxígeno y la función prevista de los aditivos es mantener la carne con un color rojo o púrpura y evitar que se desarrolle un color marrón). La Figura 4 muestra que el efecto a largo plazo del citrato es particularmente pronunciado en el ambiente de alto oxígeno.

Ejemplo 3 - Preparación de composiciones

40 Una composición líquida para aplicación a la carne en una atmósfera de bajo oxígeno se prepara mezclando 1,5 partes de succinato, 0,5 partes de malato; 1 parte de glutamato y 0,5 partes de citrato con agua y agitando hasta que se disuelva. El pH se ajusta a 5,8 utilizando HCl 1 M o NaOH.

Una composición sólida para aplicación a la carne en una atmósfera de alto oxígeno se prepara mezclando 5 partes de succinato, 2 partes de citrato, 1 parte de glutamato y 0,5 partes de piruvato con agua y agitando hasta que se disuelva. El pH se ajusta a 5,8 utilizando HCl 1 M o NaOH y después se separa el disolvente por atomización en un gas caliente utilizando un equipo convencional de secado por pulverización. La composición sólida es un polvo que fluye libremente.

#### Ejemplo 4 - Tratamiento de la carne con agentes activos

Se realiza un experimento en el que se preparan salmueras y se mezclan con la carne según el método del Ejemplo 1, excepto que las cantidades de agente activo (citrato, succinato, glutamato, malato y piruvato) se mezclan en porcentaje en peso utilizando los valores que se muestran en las tablas 1 a 8. Por lo tanto, un valor de 1 en las tablas 1 a 8 corresponde a 1 % de agente activo en la mezcla de salmuera/carne, esto es, para 4 g de agente activo en los 40 g de salmuera utilizados, un valor de 0,5 corresponde a 2 g de agente activo, etc.

Se espera que los resultados del tratamiento de la carne con las composiciones anteriores sean sustancialmente similares a los indicados en la Tabla 9, demostrando por ejemplo, que los resultados óptimos para el tratamiento de la carne a ser conservada en condiciones de bajo oxígeno se obtienen a baja concentración de piruvato, alta concentración de succinato y concentraciones intermedias de glutamato + malato.

#### Ejemplo 5 - Detección de color en la carne tratada

##### Objetivo

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto sobre el color de la carne de vaca triturada después de tratamiento con succinato, glutamato, malato, piruvato y citrato en presencia o ausencia de oxígeno. Se midió el color como los valores de L\*, a\*, b\* y se determinaron los estados de mioglobina.

##### Materiales y métodos

Los siguientes productos químicos fueron adquiridos de Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Alemania): sales de sodio de succinato hexahidrato, ácido succínico y ácido pirúvico. Los siguientes productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania): sales de sodio de piruvato, ácido glutámico, ácido málico y sales disódicas del ácido DL-málico. Las sales de sodio de hidrogenoglutamato monohidrato fueron adquiridas de VWR International BVBA (Lovaina, Bélgica). Las sales de sodio de ácido cítrico monohidrato y el citrato trisódico se adquirieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Todos los productos químicos eran de calidad analítica.

Se recogieron tejido de músculo semimembranoso (M.S.) de vaca y tejido de grasa de vaca cuatro días *post mortem* (Fatland A/S, Oslo, Noruega). El día de envasado se define como el día cero, sin embargo, los tejidos llevaban 4 días *post mortem* el día de envasado. Se cortó de cada músculo un trozo de carne del extremo proximal con el fin de medir el consumo de oxígeno, el pH y el color de la superficie. Los tejidos grasos de cerdos alimentados con colza y vitamina E para mejorar el contenido en ácidos grasos poliinsaturados eran de HKScan (Ruokatalo, Finlandia). El tejido graso se transportó envasado al vacío y congelado. Se tomaron muestras de tejido graso picado para el análisis de ácidos grasos.

Los músculos de vaca se cortaron en trozos de aproximadamente 10 x 5 cm y se mezclaron con el 14 % p/p de grasa utilizando los tejidos grasos. Los tejidos de grasa de vaca y de grasa de cerdo se trituraron dos veces, con carne de vaca cruda procedente de cuatro vacas jóvenes (16-19 meses) o de cuatro vacas viejas (46-81 meses). La carne tenía un pH de 5,65 y se trituró con un molino Seydelmann ME-130 (Seydelmann, Stuttgart, Alemania) a través de una placa con agujeros de 3 mm. La carne triturada se amasó manualmente con soluciones (todas a pH 5,8) con diferentes ingredientes de TCA (ácidos tricarbóxicos) e ingredientes glucolíticos (véase más adelante).

El experimento fue diseñado utilizando cuatro combinaciones de materias primas: carne de vaca joven y grasa bovina (experimento 1); carne de vaca joven y grasa de cerdo (experimento 2); carne de vaca vieja y grasa bovina (experimento 3); carne de vaca vieja y grasa de cerdo (experimento 4).

Se prepararon soluciones utilizando succinato, piruvato, glutamato, malato y citrato en diferentes combinaciones, como productos químicos puros a base de sodio o a base de ácido o como mezclas de 2, 3, 4 y 5 productos químicos de diferentes concentraciones. Para mantener el pH a 5,8 se prepararon las soluciones mezclando la forma ácida y la correspondiente sal de sodio de estos productos químicos.

Se añadieron 40 g de soluciones 0,1 M o 0,05 M a la mezcla triturada de carne de vaca y grasa (360 g) hasta un peso total de 400 g. Se agitó la solución de forma rápida y apropiada con la carne picada y posteriormente se envasó el sistema amasado. La concentración diluida final era de 0,1 o de 0,05 mol/kg. Se prepararon también dos muestras de referencia con 40 ml de agua destilada añadida a 360 gramos de carne de vaca triturada, cada uno de los cuatro días de producción, esto es, en total se prepararon 8 muestras de referencia. Se envasaron las muestras en atmósfera de bajo oxígeno o de alto oxígeno.

La carne de vaca triturada se envasó en bandejas de tereftalato de polietileno amorfo (APET) negro que se sellaron en la parte superior con películas de alcohol etilvinílico (EVOH). Las bandejas y las películas (Wipak Multipet y Wipak Biaxer, ambos Wipak, Nastola, Finlandia) tenían velocidades de transmisión de oxígeno de 7 y 5 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24 h a 23 °C en una humedad relativa del 50 %. Se llevó a cabo el envasado antes de 1 hora después de la trituración.

5 Se almacenaron las muestras en la oscuridad a 4 °C durante 8 días en una atmósfera de alto oxígeno (75 % de oxígeno y 25 % de CO<sub>2</sub>) y durante 13 días en una atmósfera de bajo oxígeno (60 % de CO<sub>2</sub> y 40 % de N<sub>2</sub>). Estas mezclas de gases de grado alimentario fueron suministrados por AGA (Oslo, Noruega).

Se utilizó una máquina de sellado de bandejas para el envasado (Promens 511VG, Kristiansand, Noruega). Las medidas de los contenidos de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se realizaron con un CheckMate 9900 (PBI Dansensor, Ringsted, Dinamarca) insertando una aguja a través de septos de goma autoadhesivos y autosellantes (Toray TO 125, Toray Engineering, Osaka, Japón). Las medidas de gas se realizaron los días 0 (día de envasado) y 13 para los envases con bajo contenido en oxígeno y los días 0, 1, 3, 6 y 8 para los envases con alto contenido en oxígeno. La relación de gas a carne era de aproximadamente 2:1.

10

La composición de ácidos grasos de los tejidos grasos seleccionados se determinó como ésteres metílicos, se analizó por GC-MS (7890A GC, Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Se llevó a cabo la transesterificación de los lípidos a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), como está descrita por Devle et al. (J Sep Sci (2009) 32(21): 3738-3745), con modificaciones menores. En resumen, se disolvieron 0,01 g de grasa en 2,0 ml de hexano y se añadieron 1,5 mL de solución de metanolato de sodio a 3,33 mg/ml, se pusieron en un agitador durante 30 min, antes de dejar sedimentar las muestras durante 10 min. Se transfirieron doscientos µL de la capa superior a un nuevo vial. Se realizó el análisis de ácidos grasos por autoinyección de 1 µL de cada muestra en una relación de división de 80/1, modo de caudal constante, velocidad de 20,4 cm/segundo. Se recogieron los datos como porcentajes de área. Se tomaron dos replicados.

15  
20

Para identificar los ésteres metílicos de ácidos grasos FAME, se compararon sus tiempos de retención con los de una mezcla conocida de ésteres metílicos de ácidos grasos estándar de 37 componentes, y se compararon los espectros de masas con los espectros disponibles en la base de datos del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología).

25

Las medidas de las tasas de consumo de oxígeno se llevaron a cabo a pH 7,1 sobre las fibras musculares permeabilizadas. Se separaron las fibras de la carne y tenían 3-5 mm de longitud. Las medidas de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se realizaron el día 0 (esto es, cuatro días *post mortem*) y el último día del experimento. Los productos químicos se añadieron siempre en el siguiente orden y las concentraciones finales fueron malato 4,0 mM, piruvato 5,0 mM, glutamato 10,0 mM, ADP 1,25 mM, octanoilcarnitina 0,50 mM, succinato 5,0 mM, carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-fenilhidrazona (FCCP) 0,5-1,5 µM, rotenona 2,5 µM, ácido malónico 5,0 mM y antimicina A 2,5 µM. Se llevó a cabo respirometría de alta resolución con instrumentos Oroboros Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) como se describe por Gnaiger {Respir Physiol. (2001) 128(3): 277-97}. El consumo de oxígeno de fondo después de la inhibición con antimicina A (Gnaiger, E. (2008) "Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function", en J. Dykens & Y. Will (Eds.), Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction (pp. 327-352). Innsbruck: John Wiley & Sons, Inc.) se reconoció como reacciones secundarias del consumo de oxígeno residual (ROX).

30  
35

Se realizaron cuatro medidas en cada lote. Sin embargo, falló una medida el día de envasado, y se extrapoló linealmente volviendo a tiempo cero a partir de las medidas consecutivas. Se calculó la actividad del complejo I como la suma de las respuestas provocadas por los correspondientes sustratos (glutamato, malato y piruvato). La actividad del complejo II se midió como la respuesta frente a succinato. La inhibición del ETS (sistema de transporte de electrones) se llevó a cabo en orden y empezó con rotenona (inhibición del complejo I), ácido malónico (inhibición del complejo II) y antimicina A (inhibición del complejo III).

40

El color de las muestras de carne triturada se midió con un Konica Minolta Chroma Meter CR 410 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japón), utilizando el tubo de vidrio de proyección de luz CR A 33e con una zona amplia de iluminación (61 mm) y el iluminador D65. Se calibró el instrumento cada día midiendo una placa de cerámica blanca (L\* = 97,9; a\* = 0,05; b\* = 2). Todas las medidas de color se hicieron con 3 replicados (CIE, 1976, "Recommendations on uniform colour spaces-colour difference equations" (Vol. Supplement No. 2 to CIE). Paris, France: Commission Internationale de l'Eclairage).

45  
50

Se hizo un barrido de las muestras a 400-100 nm, con un analizador Foss NIRSystems OptiProbe™ 6500 Analyzer (Foss NIRSystems Inc., Maryland, USA) sin abrir el envase. Se dio la vuelta al envase antes de las medidas para que la carne cayera sobre la película de envasado. Se hizo un barrido de las muestras con tres ubicaciones aleatorias de la sonda sobre la superficie del envase con el fin de aumentar el área de barrido y reducir los errores de medida. Se hicieron treinta y dos barridos, tanto para las referencias como para las muestras y se calculó la media sobre cada área medida. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) de acuerdo con Khatri, et al. (Meat Sci. (2012) 91(3): 223-231). Se utilizaron estos espectros para predecir los niveles de OMb, MMb y DMb. Se realizó la calibración utilizando carne triturada con un 10 % p/p de agua añadida.

55

Se midió el color de las muestras envasadas con alto nivel de O<sub>2</sub> después de 0, 1, 3, 6 y 8 días de almacenamiento desde el día de envasado, mientras que las muestras con bajo nivel de O<sub>2</sub> se midieron los días 0 a 13 de almacenamiento utilizando Minolta y medidas de reflectancia.

5 Se cortaron lonchas de la carne de vaca triturada congelada y se descongelaron en tampón de fosfato de sodio 40 mM pH 6,8 con una relación de peso a volumen (gramos a mililitros) de 1:10 y se mezclaron utilizando un procesador de alimentos (HR 1364 600W, Philips, Países Bajos). Después de la centrifugación se midió el sobrenadante (440-650 nm) con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Alemania). Se calculó la concentración total de la mioglobina según Faustman and Phillips ("Measurement of discoloration in fresh meat", Current protocols in food analytical chemistry: John Wiley & Sons, Inc., 2001).

10 Diseño experimental y análisis estadístico

15 El diseño experimental se visualiza en la Figura 5. Un diseño 2<sup>2</sup> (factores, la edad del animal y el tipo de tejido graso) se dividió en 4 días experimentales (Figura 5, y Tablas 10 y 11). En cada esquina de este diseño 2<sup>2</sup> se añadió un diseño de mezcla de red simple de 3 componentes (succinato, piruvato y adiciones de glutamato-malato; 0, 50 y 100 %) con 2 experimentos centrales adicionales como se muestra en la Figura 5. Cada uno de estos ocho puntos experimentales tenía 4 factores (relación glutamato-malato, niveles totales de mezcla añadida, concentraciones de citrato, concentraciones de oxígeno) en 2 niveles, esto es, un diseño 2<sup>4</sup>. Se debe observar a continuación que a pesar de ser el oxígeno una variable del diseño cuando se planificó el experimento, la naturaleza de los datos hizo necesario que se dividieran las observaciones en niveles bajos y altos de oxígeno para el modelado.

20 Tabla 10 - El diseño de mezcla centroide simplex de 8 puntos (Figura 5) con los respectivos productos químicos y mezcla en cada punto experimental

Punto experimental	Succinato (porcentaje)	Piruvato (porcentaje)	Glutamato-malato (porcentaje)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	0	50	50
5	50	0	50
6	50	50	0
7	33	33	33
8	33	33	33

Tabla 11 - El diseño 2<sup>6</sup> con los respectivos productos químicos y niveles

Efecto	Nivel 1	Nivel 2
Mezcla de componentes (mol/kg)	0,05	0,1
Citrato (mol/kg)	0	0,025
Nivel de glutamato-malato	25:75	75:25
Tipo de grasa	Cerdo	Vaca
Edad	Joven	Vieja
Oxígeno % v/v)	~0	75

25 Los ocho puntos experimentales del diseño de mezcla, después de fraccionamiento del diseño (véase más adelante), fueron considerados entonces las esquinas de un cubo. Para hacer esto, el diseño de mezcla de 8 puntos se registró como un experimento 2<sup>3</sup> mediante la introducción de las tres variables ficticias de la mezcla como variables de diseño factorial.

30 El diseño fue considerado como un diseño 2<sup>9</sup> (512 muestras). Con el fin de aumentar la viabilidad del diseño, se construyó la fracción un cuarto del diseño 2<sup>9</sup> con 128 experimentos (32 cada día, 4 días en total) utilizando la teoría de factorial fraccionado para diseños de dos niveles. El diseño real fue elegido entre los diseños estándar considerando tres aspectos; 1) un patrón de confusión óptimo para las variables ficticias de la mezcla, 2) buenos diseños individuales cada día, 3) modelos alternativos basados en las variables originales deberían comportarse bien según los criterios clásicos de diseño óptimo (D-optimalidad). Para optimizar la confusión los puntos de mezcla fueron diferentes para cada fracción de un cuarto. Las 128 muestras representaron un diseño equilibrado. Sin embargo, se añadieron 7 muestras adicionales cada día. Se distribuyeron manualmente cuatro replicados (esquinas y centro) de una manera que redujo al mínimo el desequilibrio causado por la adición de dichos replicados.

35 Finalmente, se prepararon 3 muestras en la esquina que consistían en trozos menudos con adiciones de soluciones

de glutamato puro, malato puro o citrato puro. Además se produjeron 2 muestras solamente con agua añadida después cada día.

5 El análisis estadístico se realizó de acuerdo con el método descrito por Langsrud et al. (J Appl Statist. (2007) 34: 1275-1296) e implementado en el software MANOVA 50-50 (<http://www.Jangsrud.com/stat/program.htm>). Este programa maneja diseños de mezcla como variables categóricas generalizadas (ANOVA generalizada). Cuando se utiliza este método siempre se pueden formular modelos equivalentes que utilizan las variables individuales de mezcla como variables de regresión ordinaria (un grado de libertad). Después tiene que ser omitida una variable arbitraria de mezcla (variable de holgura). Los resultados importantes del análisis son resultados significativos (valores p), varianzas explicadas (basadas en las sumas de cuadrados) y valores de la media ajustada (o predicciones de la media). Los valores de la media ajustada se pueden calcular sobre la región total de la mezcla y el resultado se puede presentar como superficies.

15 El análisis se basó en un modelo (las respuestas fueron: a\*, b\*, estados de mioglobina) que incluía los términos dados en la Tabla 12. Cuando la "mezcla" era el efecto lineal del diseño de mezcla de 3 componentes en las variables succinato, piruvato y glutamato-malato, "mezcla" era el efecto cuadrático del diseño de mezcla de 3 componentes, "mezcla x edad" era el término de interacción de segundo orden entre el diseño de mezcla de 3 componentes y la edad y así sucesivamente (Tabla 12). Se eligió este modelo relativamente complicado para asegurar que el modelo era útil para todas las variables de respuesta. Puesto que había tantos como 40 grados de libertad para el error y puesto que el análisis se basaba en un enfoque jerárquico no fue necesaria una reducción adicional del modelo.

20 Tabla 12 - Los términos del modelo utilizado para analizar el diseño descrito en la Figura 5. Se construyeron dos modelos separados para nivel alto y bajo de oxígeno

Términos de primer orden		Términos de segundo orden		Términos de tercer orden	
Efecto	DF	Efecto	DF	Efecto	DF
Tipo de grasa	1	Mezcla de componentes x tipo de grasa	2	Mezcla de componentes x edad x tipo de grasa	2
Edad	1	Mezcla de componentes x edad	2	Mezcla de componentes x tipo de grasa x citrato	2
Citrato	1	Mezcla de componentes x citrato	2	Edad x tipo de grasa x citrato	2
Mezcla total de componentes	1	Edad x tipo de grasa	1	Mezcla total de componentes x relación malato/glutamato	1
Relación malato/glutamato	1	Edad x citrato	1	Mezcla de componentes x edad x tipo de grasa	2
Mezcla de componentes	2	Tipo de grasa x citrato	1	Mezcla de componentes x Mezcla de componentes*citrato	3
		Mezcla de componentes x Mezcla de componentes	3		

DF: grados de libertad

Resultados - Composición de ácidos grasos del tejido graso

25 El músculo semimembranoso de los animales viejos (46-81 meses), tenía nominalmente 29 % más de mioglobina que el de los animales jóvenes (16-19 meses). La diferencia, sin embargo, no era estadísticamente significativa puesto que los dos músculos del grupo joven diferían profundamente. La composición de ácidos grasos del tejido graso de vaca y de cerdo era diferente (Tabla 13). El tejido graso porcino contenía 10 veces más ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), además de más ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) que el tejido graso de vaca, que a su vez era más rico en ácidos grasos saturados (SFA) (Tabla 13).

30 Tabla 13 - Composiciones de ácidos grasos en la grasa de cerdo y de vaca

	SFA %	MUFA %	PUFA %
Grasa de cerdo (1)*	26,6 ± 0,2	50,0 ± 0,0	22,0 ± 0,1
Grasa de vaca (2)*	48,6 ± 3,1	42,8 ± 1,8	2,0 ± 0,4

\* No se identificaron los ácidos grasos restantes.

SFA; ácidos grasos saturados,

MUFA; ácidos grasos monoinsaturados,

PUFA; ácidos grasos poliinsaturados.

5 Resultados - Tasa de consumo de oxígeno (OCR) de los músculos utilizados

Como se muestra en la Tabla 14 los sustratos mitocondriales que estimularon el complejo I, fueron glutamato, malato y piruvato. La oxidación del succinato llevó a la estimulación del complejo II mediante la producción de FADH<sub>2</sub>. La β-oxidación de octanoilcarnitina produjo equivalentes reductores que estimularon ambos complejos I y II. El complejo I fue posteriormente inactivado por la rotenona, y el complejo II por el ácido malónico. La inhibición completa del consumo de oxígeno por el ETS se alcanzó utilizando antimicina A para inactivar el complejo III, permaneciendo el ROX como la única reacción de consumo de oxígeno en este punto. Para todos los sistemas musculares, la respiración mitocondrial (medida como tasa de consumo de oxígeno) en la presencia de succinato (complejo II) tuvo mayor actividad que la respiración en presencia de glutamato-malato (complejo I, Tabla 14). Para los animales jóvenes la respuesta a la β-oxidación (octanoilcarnitina) fue el 60-67 % de la respuesta de complejo II mientras que la respuesta a la β-oxidación para los animales viejos fue solamente el 10-21 % de la respuesta de complejo II (Tabla 14). Estas diferencias fueron significativas (p<0,003). La materia prima muscular mostró la actividad dominante esperada del complejo II. La reducción nominal media (promedio de ambas edades) para la actividad del complejo I fue de 48 % a lo largo de 13 días de almacenamiento en frío. La reducción nominal media (promedio de ambas edades) en la β-oxidación fue del 58 % durante los mismos 13 días. El valor nominal medio para la respiración en el complejo II y I fue mayor para los animales jóvenes que para los viejos. Se obtuvieron grandes errores estándar (Tabla 14) puesto que los dos músculos de los animales jóvenes eran bastante diferentes. Sin embargo, las cuatro muestras de músculos presentaron la reducción esperada en OCR con el tiempo y el mayor consumo de oxígeno en el complejo II.

25 Tabla 14 – Media de consumo de oxígeno del tejido permeabilizado procedente de músculo semimembranoso de animales jóvenes y viejos antes de ser triturado y mezclado con grasa. Se hicieron cuatro medidas el día de envasado (día 0) y 13 días más tarde

		OCR (pmol de O <sub>2</sub> /segundo)/mg de proteína) – media ± error estándar					
Animal	Días	Complejo I <sup>a</sup>	β-oxidante	Complejo II (sin acoplar) <sup>b</sup>	I inhibido <sup>c</sup>	II inhibido <sup>d</sup>	ROX <sup>e</sup>
Joven	0	9,0 ± 5,2	13,8 ± 4,8	20,9 ± 6,1	19,2 ± 5,7	2,8 ± 1,4	11,3 ± 2,6
	13	7,0 ± 2,7	8,0 ± 3,3	13,5 ± 5,3	11,2 ± 3,8	0,3 ± 0,1	4,3 ± 1,2
Viejo	0	6,2 ± 1,0	3,5 ± 0,4	16,7 ± 3,5	15,2 ± 4,7	0,5 ± 0,6	10,3 ± 0,2
	13	0,9 ± 0,5	0,9 ± 0,5	8,6 ± 1,6	8,6 ± 0,9	-0,7 ± 0,1	10,3 ± 1,1

<sup>a</sup>La respuesta del Complejo I fue después de estimulación por el glutamato-malato y el piruvato.

<sup>b</sup>La respuesta del Complejo II estuvo en secuencia después del complejo I y fue iniciada por el succinato y desacoplada por la FCCP. El ADP estuvo presente después de la estimulación del Complejo I.

30 <sup>c</sup>I inhibido: complejo I inhibido por la rotenona,

<sup>d</sup>II inhibido: complejo II inhibido por el ácido malónico,

<sup>e</sup>ROX: reacción secundaria de consumo de oxígeno después de la inhibición completa del ETS con antimicina A.

Resultados –Cambio medio en L\* a\* y b\* con el tiempo

35 La rojez general (a\*) en la carne de vaca triturada fue lo que más cambió durante los experimentos y el envasado con alto oxígeno produjo más rojez que el envasado con bajo oxígeno (Figura 6A y B). Sin embargo, los valores de a\* en alto oxígeno fueron inestables y disminuyeron de manera constante desde el principio (Figura 6B), mientras que la rojez en el envasado con bajo oxígeno tuvo un aumento desde el día 1 hasta el día 6 y se estabilizó en una meseta (Figura 6A). Además, la carne de vaca triturada era la más amarilla (b\*) cuando se envasó con nivel alto de oxígeno en comparación con el nivel bajo de oxígeno (Figura 6A y B). Se produjo oscurecimiento de la superficie debido a la oxidación de la mioglobina y se produjo más rápidamente en el envasado con alto oxígeno que con bajo oxígeno (Figura 6A y B).

La figura 6 muestra un punto de interrupción sobre L\* el día 6 y el día 3 para el envasado con alto y bajo oxígeno, respectivamente. En estos puntos de interrupción se detectó un olor debido al crecimiento bacteriano (no se muestra), que se produce más pronto en el envasado con alto oxígeno que con bajo oxígeno. Además, según las medidas de concentración de oxígeno hubo una fuerte caída el día 6 en los envases con alto oxígeno lo que apoya la idea del crecimiento bacteriano (no se muestran los resultados).

Resultados - Cambios en a\* y b\* promovidos por la mezcla

La mezcla variable de diseño que contiene succinato, piruvato y/o glutamato-malato, tuvo la mayor influencia sobre la variable de color a\* (varianza explicada = 54,1 % en bajo oxígeno) el día 3. La superficie de respuesta a diferentes combinaciones de succinato, piruvato y glutamato-malato se puede ver en cada esquina respectiva en la Figura 7. Como los valores de L\* no cambiaron mucho y tuvieron poca influencia en el color (Fig. 6), los cambios de a\* y b\* fueron el centro de atención cuando se envasaron con nivel bajo de oxígeno (Fig. 7A y C) y con nivel alto de oxígeno (Fig. 7B y D). El piruvato no mejoró la rojez (a\*) en ninguna condición de envasado (Fig. 7A y B). Por otra parte, pareció incluso que el piruvato disminuía los valores de a\* y aumentaba los valores de b\* en los envases con bajo oxígeno (Fig. 7A y C). La superficie de respuesta en el envasado con bajo oxígeno el día 3 muestra que el succinato con glutamato-malato tiene los valores más altos de a\* mientras que el piruvato tuvo un efecto negativo sobre a\* (Fig. 7A). El piruvato promovió un aumento de la amarillez (aumentando b\*) y tuvo el efecto contrario al succinato (Fig. 7C). Fue evidente que el oxígeno alto lleva a valores altos tanto de a\* como de b\* para glutamato-malato (Fig. 7B y D). La dirección de a\* cambió cuando la carne fue envasada con alto oxígeno y reveló un desplazamiento gradual desde los valores altos de a\* con glutamato-malato y piruvato el día 0 hasta el glutamato-malato y succinato el día 8 (no se muestran resultados). En el envasado con alto oxígeno los valores altos de b\* se localizaron en gran medida en la esquina de glutamato-malato durante todo el experimento (Fig. 7D).

La concentración real de la mezcla química (cualquier composición) no fue significativa para el mantenimiento del color ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, el glutamato lleva a valores de a\* nominalmente más altos y el malato a valores de b\* nominalmente más altos cuando se envasó la carne con bajo oxígeno (no se muestra).

Resultados –Cambio medio en los estados de mioglobina con el tiempo

El cambio en el promedio de distribución porcentual de los diferentes estados de la mioglobina con el tiempo en la atmósfera de bajo y alto oxígeno se muestra en la Figura 8A y B, respectivamente. La prevalencia de la Omb (oximioglobina) y MMb (metamioglobina) disminuyó con el tiempo en el envasado con bajo oxígeno; la Omb quedó casi agotada el día 6 (Fig. 8A). Hubo un pico de MMb el día 1 (de acuerdo con a\*, Fig. 7A), lo que indica que la mioglobina se convirtió de Omb a MMb a DMb (desoximioglobina). Hubo pocos cambios después del día 6, lo que indica que el oxígeno en los envases se agotó rápidamente dentro de los primeros 5-6 días (Fig. 8A). La prevalencia de DMb tenía la tendencia opuesta a MMb y Omb y aumentó desde el principio hasta el día 10 cuando se estabilizó (Fig. 8A). Por otro lado, en un ambiente de alto oxígeno casi no hubo acumulación de DMb ( $< 2\%$ , Fig. 8B). La Omb era alta, pero disminuyó a lo largo del tiempo experimental con un aumento concomitante de la MMb (Fig. 8B), lo que indica una rotación directa desde la mioglobina ferrosa con oxígeno unido hasta la mioglobina férrica o que una transición a través de la DMb no fue limitante de la tasa. Más importante aún, se observó que la prevalencia de la MMb aumentó junto con una disminución de la Omb cuando se envasó con alto oxígeno (Fig. 8B), pero el contenido de la MMb no aumentó en los envases con bajo oxígeno (Fig. 8A).

Resultados - Cambios en DMb, Omb y MMb promovidos por la mezcla

La combinación de succinato y glutamato-malato fue responsable en gran parte de la acumulación de DMb en el envasado con bajo oxígeno (Fig. 9A). La superficie de respuesta a DMb, Omb y MMb no cambió la pendiente a lo largo del tiempo experimental de 13 días (no se muestra) con bajo nivel de oxígeno. Por otra parte, el piruvato aumentó la formación de Omb y de MMb (Fig. 9C y E). Bajo condiciones de alto oxígeno, la generación de DMb fue fuertemente apoyada por el succinato más una concentración más pequeña de piruvato (Fig. 9B). El glutamato-malato favoreció la formación de Omb, mientras que el piruvato favoreció la MMb en condiciones de alto oxígeno (Fig. 9D y F). La capacidad del glutamato-malato de mantener la Omb cambió poco con el tiempo (no se muestran resultados). El día 3 (y los días posteriores) el piruvato fue un desestabilizador del color en condiciones de alto oxígeno (Fig. 9F).

Resultados - El efecto de las variables del diseño factorial (2 niveles) sobre el color

La media ajustada de los efectos de la edad, la grasa animal, el citrato y el oxígeno sobre L\*, a\* y b\* se muestran en la Tabla 15, donde la edad (después del factor de mezcla) tuvo el mayor efecto sobre los valores de L\* en las medidas a todos los tiempos, tanto en envasado con bajo oxígeno como con alto oxígeno. Los animales jóvenes tuvieron los valores más altos de L\*, a\* y b\* a todos los tiempos, en ambas concentraciones de oxígeno (Tablas 15-16). El tejido graso de cerdos produjo mayores valores de L\* y a\* que la grasa de vaca en casi todos los puntos de tiempo en ambas concentraciones de oxígeno. El efecto del citrato fue pequeño pero mostró diferencias entre los

envases con bajo y alto oxígeno. Lo más importante fue el desarrollo de color después del día 1, donde a\* comenzó a aumentar hasta el día 8 y se estabilizó en el envasado con oxígeno bajo (Tabla 15).

5 El efecto de la edad sobre el estado de la mioglobina no fue significativo ( $P>0,05$ ), excepto para el día 1, donde los animales jóvenes tuvieron la más alta prevalencia de MMb y los animales viejos tuvieron el máximo de DMb (Tablas 17 y 18). En el envasado con bajo oxígeno, los animales jóvenes promovieron la prevalencia de MMb (Tabla 17). La grasa porcina dio la más alta prevalencia de DMb en todas las medidas y la grasa bovina la más alta prevalencia de OMb en las medidas con bajo oxígeno (Tabla 17). Además, la grasa bovina tuvo la mayor cantidad de MMb desde el día 8 al 10 en ambiente de bajo oxígeno mientras que la grasa porcina demostró estar implicada en la generación de MMb en ambiente de alto oxígeno los días 6 y 8, presumiblemente debido a la oxidación de los ácidos grasos (Tabla 18).

10 La adición de citrato en el envasado con bajo oxígeno aumentó la OMb y la MMb a la vez que se redujo la DMb. El contenido de MMb estaba en su punto más alto el día 1 (citrato añadido; Tabla 17). Bajo condiciones de alto oxígeno, el citrato llevó a valores nominales más altos para OMb (y a valores nominalmente más bajos para MMb), pero el efecto no fue significativo (Tabla 18).

15 Tabla 15 – Medias ajustadas (según el modelo de la Tabla 12) con errores estándar en los niveles alto y bajo de la edad, la grasa y el citrato sobre el desarrollo de los valores de L\*, a\* y b\* con el tiempo de almacenamiento en condiciones de bajo oxígeno

Efecto	Tipo	Variable	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13
Edad	Joven	L*	34,2 ± 0,1	34,0 ± 0,1	33,9 ± 0,1	33,8 ± 0,1	33,8 ± 0,1	34,0 ± 0,1
		a*	7,4 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,4 ± 0,2
		b*	2,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,0	2,3 ± 0,0	2,4 ± 0,0	2,4 ± 0,1
	Viejo	L*	33,1 ± 0,1	32,7 ± 0,1	32,8 ± 0,1	33,0 ± 0,1	33,2 ± 0,1	32,9 ± 0,1
		a*	6,1 ± 0,1	6,8 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,5 ± 0,2
		b*	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,1
Grasa	Cerdo	L*	34,1 ± 0,1	33,9 ± 0,1	33,9 ± 0,1	33,8 ± 0,1	33,9 ± 0,1	33,7 ± 0,1
		a*	7,1 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,3 ± 0,1	8,3 ± 0,1	8,2 ± 0,1
		b*	2,4 ± 0,1*	2,3 ± 0,1*	2,2 ± 0,0*	2,2 ± 0,0*	2,2 ± 0,0*	2,3 ± 0,1
	Ganado vacuno	L*	33,2 ± 0,1	32,8 ± 0,1	32,8 ± 0,1	33,1 ± 0,1	33,1 ± 0,1	33,1 ± 0,1
		a*	6,4 ± 0,1	7,17 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,7 ± 0,2
		b*	2,4 ± 0,1*	2,3 ± 0,1*	2,1 ± 0,0*	2,1 ± 0,0*	2,1 ± 0,0*	2,0 ± 0,1
Citrato	Bajo	L*	33,8 ± 0,3	33,71±0,3	33,4± 0,2*	33,5± 0,2*	33,6± 0,2*	33,6±0,3*
		a*	6,9 ± 0,3*	7,7 ± 0,2	8,2 ± 0,2	8,3 ± 0,2	8,3 ± 0,2	8,3 ± 0,3
		b*	2,5 ± 0,3	2,3 ± 0,1*	2,2 ± 0,1*	2,2 ± 0,1*	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,2*
	Alto	L*	33,5 ± 0,3	33,0 ± 0,3	33,3± 0,2*	33,4± 0,2*	33,4± 0,2*	33,2±0,3*
		a*	6,6 ± 0,3*	7,1 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,6 ± 0,2	7,6 ± 0,4
		b*	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1*	2,2 ± 0,1*	2,1 ± 0,1*	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,2*

\*La diferencia entre el nivel alto y bajo de los efectos a los tiempos especificados no fue significativa ( $P> 0,05$ )

20 Tabla 16 – Medias ajustadas (según el modelo de la Tabla 12) con errores estándar en los niveles alto y bajo de la edad, la grasa y el citrato sobre el desarrollo de los valores de L\*, a\* y b\* con el tiempo de almacenamiento en condiciones de alto oxígeno

Efecto	Tipo	Variable	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8
Edad	Joven	L*	35,0 ± 0,1	34,7 ± 0,1	34,7 ± 0,1	34,6 ± 0,1
		a*	13,6 ± 0,1	12,4 ± 0,1	11,1 ± 0,1	10,3 ± 0,1
		b*	5,1 ± 0,1	4,8 ± 0,1	4,5 ± 0,1	4,3 ± 0,0
	Viejo	L*	33,8 ± 0,1	32,8 ± 0,1	33,3 ± 0,1	33,6 ± 0,1

ES 2 548 510 T3

Grasa	Cerdo	a*	12,4 ± 0,1	12,1 ± 0,1	10,5 ± 0,1	9,5 ± 0,1
		b*	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,06 ± 0,1	0,0 ± 0,0
		L*	34,4 ± 0,1*	34,4 ± 0,1	34,4 ± 0,1	34,4 ± 0,1
		a*	13,2 ± 0,1	12,2 ± 0,1*	11,0 ± 0,1	10,0 ± 0,1*
		b*	4,7 ± 0,1	4,5 ± 0,1*	4,3 ± 0,1	4,1 ± 0,0
		L*	34,4 ± 0,1*	33,1 ± 0,1	33,7 ± 0,1	33,9 ± 0,1
Citrato	Ganado vacuno	a*	12,8 ± 0,1	12,3 ± 0,1*	10,6 ± 0,1	9,8 ± 0,1*
		b*	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1*	4,0 ± 0,1	3,8 ± 0,0
		L*	34,5 ± 0,2	33,9 ± 0,3*	34,8 ± 0,3	34,3 ± 0,2
		a*	13,0 ± 0,2*	12,17 ± 0,2*	10,6 ± 0,2	9,6 ± 0,2
		b*	4,6 ± 0,1*	4,5 ± 0,1*	4,20 ± 0,2*	4,0 ± 0,1*
		L*	34,2 ± 0,3	33,6 ± 0,3*	33,8 ± 0,3	33,9 ± 0,3
Citrato	Bajo	a*	13,0 ± 0,2*	12,3 ± 0,2*	11,0 ± 0,3	10,3 ± 0,2
		b*	4,5 ± 0,1*	4,4 ± 0,1*	4,1 ± 0,2*	4,0 ± 0,1*
		L*	34,2 ± 0,3	33,6 ± 0,3*	33,8 ± 0,3	33,9 ± 0,3
		a*	13,0 ± 0,2*	12,3 ± 0,2*	11,0 ± 0,3	10,3 ± 0,2
		b*	4,5 ± 0,1*	4,4 ± 0,1*	4,1 ± 0,2*	4,0 ± 0,1*
		L*	34,2 ± 0,3	33,6 ± 0,3*	33,8 ± 0,3	33,9 ± 0,3
Citrato	Alto	a*	13,0 ± 0,2*	12,3 ± 0,2*	11,0 ± 0,3	10,3 ± 0,2
		b*	4,5 ± 0,1*	4,4 ± 0,1*	4,1 ± 0,2*	4,0 ± 0,1*
		L*	34,2 ± 0,3	33,6 ± 0,3*	33,8 ± 0,3	33,9 ± 0,3
		a*	13,0 ± 0,2*	12,3 ± 0,2*	11,0 ± 0,3	10,3 ± 0,2
		b*	4,5 ± 0,1*	4,4 ± 0,1*	4,1 ± 0,2*	4,0 ± 0,1*
		L*	34,2 ± 0,3	33,6 ± 0,3*	33,8 ± 0,3	33,9 ± 0,3

\*La diferencia entre el nivel alto y bajo de los efectos a los tiempos especificados no fue significativa (P> 0,05)

Tabla 17 – Medias ajustadas (según el modelo de la Tabla 12) con errores estándar en los niveles alto y bajo de la edad, la grasa y el citrato sobre el desarrollo de los porcentajes de DMb, OMb y MMb (datos normalizados) con el tiempo de almacenamiento a baja concentración de oxígeno. Los valores están en % y no están normalizados.

Efecto	Tipo	Modo	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13	
Edad	Joven	DMb	40,6 ± 3,2	60,2 ± 3,3*	71,8 ± 3,1*	72,1 ± 3,2*	73,9 ± 3,1*	70,8 ± 4,1*	
		OMb	8,3 ± 0,4	4,7 ± 0,4*	2,8 ± 0,4*	2,7 ± 0,4	3,2 ± 0,3*	3,8 ± 0,5	
		MMb	51,2 ± 2,9	35,1 ± 3,0*	25,4 ± 2,9*	25,3 ± 2,8*	23,0 ± 2,8*	25,4 ± 3,7*	
	Viejo	DMb	49,3 ± 3,2	60,2 ± 3,3*	68,9 ± 3,1*	71,0 ± 3,2*	74,5 ± 3,1*	78,1 ± 4,1*	
		OMb	6,5 ± 0,4	4,4 ± 0,4*	3,2 ± 0,4*	3,6 ± 0,4	2,7 ± 0,3*	2,5 ± 0,5	
		MMb	44,3 ± 2,9	35,3 ± 3,0*	27,9 ± 2,9*	25,4 ± 2,8*	22,8 ± 2,8*	19,4 ± 3,7*	
	Grasa	Cerdo	DMb	48,9 ± 3,2*	65,8 ± 3,2	74,7 ± 3,0	76,7 ± 3,1	79,5 ± 3,0	76,0 ± 4,0*
			OMb	6,0 ± 0,4	2,6 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,5
			MMb	45,1 ± 2,9*	31,6 ± 3,0*	24,0 ± 2,9*	21,4 ± 2,8	18,9 ± 2,8	22,1 ± 3,7*
Ganado vacuno		DMb	40,7 ± 3,3*	54,1 ± 3,3	65,6 ± 3,2	65,8 ± 3,2	68,4 ± 3,2	72,9 ± 4,2*	
		OMb	8,8 ± 0,4	6,7 ± 0,4	4,8 ± 0,4	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,5	
		MMb	50,5 ± 3,0*	39,2 ± 3,1*	29,6 ± 2,9*	29,6 ± 2,9	27,2 ± 2,9	22,7 ± 3,8*	
Citrato	Bajo	DMb	47,6 ± 3,1*	64,6 ± 3,2*	75,3 ± 3,0	76,0 ± 3,1	78,2 ± 3,0	76,5 ± 4,0*	
		OMb	7,0 ± 0,4*	3,8 ± 0,4	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,4	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,5*	
		MMb	45,4 ± 2,9*	31,7 ± 2,9*	22,3 ± 2,8	21,7 ± 2,8*	19,7 ± 2,8*	21,0 ± 3,6*	
	Alto	DMb	42,1 ± 3,3*	55,5 ± 3,3*	64,9 ± 3,1	66,6 ± 3,1	69,9 ± 3,0	72,3 ± 4,1*	
		OMb	7,8 ± 0,4*	5,5 ± 0,4	3,7 ± 0,4	4,1 ± 0,4	3,8 ± 0,3	3,8 ± 0,5*	
		MMb	50,2 ± 3,0*	39,1 ± 3,1*	31,4 ± 3,0	29,3 ± 2,9*	26,3 ± 2,9*	23,9 ± 3,8*	

5 \*La diferencia entre los niveles alto y bajo de los efectos a los tiempos especificados no fue significativa (P> 0,05)

Tabla 18 – Medias ajustadas (según el modelo de la Tabla 12) con errores estándar en los niveles alto y bajo de la edad, la grasa y el citrato sobre el desarrollo de los porcentajes de DMb, OMb y MMb (datos normalizados) con el tiempo de almacenamiento a alta concentración de oxígeno. Los valores están en % y no están normalizados.

Efecto	Tipo	Modo	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8
Edad	Joven	DMb	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,2
		OMb	91,3±0,3	86,6±0,6	76,2±0,7*	66,3±0,7*
		MMb	8,7 ± 0,3	13,4± 0,6	23,4±0,6*	33,6± 0,7
	Viejo	DMb	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,4± 0,3	2,5 ± 0,2
		OMb	94,3±0,3	88,4±0,6	75,4±0,7*	69,0±0,7*
		MMb	5,7 ± 0,3	11,6 ± 0,6	23,2± 0,6*	28,5 ± 0,7
Grasa	Cerdo	DMb	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0*	0,8 ± 0,3	1,3± 0,2
		OMb	91,0±0,3*	88,2±0,6	73,7±0,7*	66,4±0,7
		MMb	9,0 ± 0,3	11,8 ± 0,6*	25,5 ± 0,6	32,3 ± 0,7
	Ganado vacuno	DMb	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0*	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,2
		OMb	94,5±0,3*	86,8±0,6	77,8±0,7*	68,8±0,7
		MMb	5,5 ± 0,3	13,1 ± 0,6*	21,2 ± 0,6	29,8 ± 0,7
Citrato	Bajo	DMb	0,0 ± 0,0*	0,1 ± 0,0	1,3 ± 0,3	2,0± 0,2
		OMb	92,3±0,3	85,7±0,6	72,8±0,7	63,1±0,7
		MMb	7,7 ± 0,3	14,2 ± 0,6	25,9 ± 0,6	34,9 ± 0,7
	Alto	DMb	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0	0,5± 0,3	0,6± 0,2
		OMb	93,4±0,6	89,5±0,6	79,1±0,7	72,7±0,8
		MMb	6,6 ± 0,3	10,5 ± 0,6	20,4 ± 0,6	26,7 ± 0,7

\*La diferencia entre los niveles alto y bajo de los efectos a los tiempos especificados no fue significativa (P> 0,05)

5 Resultados - Mezclas que dan el máximo y el mínimo en las variables de color

Las combinaciones que se encontraron que daban el máximo y el mínimo en los valores de a\* y b\* y en los estados de mioglobina para los dos métodos de envasado se muestran en las Tablas 19 y 20. Los valores son a partir del día 3 y las predicciones se hicieron sobre las muestras que contienen citrato y las que no contienen citrato.

10 Se obtuvo el valor máximo de a\* (9,7 ± 0,3) en el envasado con bajo oxígeno con el 41 % de succinato y el 59 % de glutamato-malato (sin citrato) y se obtuvo el valor máximo de b\* (4,0 ± 0,1) con el 78 % de piruvato y el 22 % de glutamato-malato (Tabla 19 y Fig. 7). Las muestras del envasado con alto oxígeno tuvieron los valores más altos de a\* y b\* con citrato y glutamato-malato de 13,3 ± 0,2 y 4,9 ± 0,1, respectivamente (Tabla 20 y Fig. 7B y D).

15 Las condiciones que dieron lugar a la cantidad relativa más alta de DMb en el envasado con bajo oxígeno, contenían combinaciones similares de aditivos como aquellas que produjeron los valores máximos de a\*. Además, las combinaciones en envasado con bajo oxígeno que se demostró que inducen valores altos de b\*, también estaban promoviendo la OMb y la MMb (Tabla 19 y Fig. 9). La prevalencia de DMb bajo atmósfera de alto oxígeno fue influenciada principalmente por el succinato y en menor medida por el glutamato-malato, correspondiendo a 70-80 % y 20-30 %, respectivamente (Tabla 20). La generación de fracciones de alta OMb se mantuvo únicamente por el glutamato-malato, independientemente de las concentraciones de citrato (Tablas 19 y 20). La situación fue bastante diferente para la acumulación de MMb ya que se demostró que el piruvato promovía la MMb en ausencia de citrato, mientras que el aumento de citrato llevaba a una mayor participación del succinato (Tablas 19 y 20). A la inversa, las condiciones que por lo general dieron como resultado valores mínimos de a\*, b\* o mioglobina, fueron inversas a las que dieron los valores máximos.

5 Tabla 19 - Combinaciones de sustratos que producen la respuestas máxima (max) o mínima (min) con las desviaciones estándar para a\*, b\* y los estados de mioglobina (no normalizados). Los resultados se muestran como % de cada adición de los respectivos productos químicos (cantidades totales de 0,05 mol/kg o de 0,1 mol/kg). Las afirmaciones se basaron en valores no ajustados (Tabla 12) del efecto del componente de la mezcla el día 3. Se muestran el envasado con alto nivel de oxígeno y nivel bajo y alto de citrato.

Variable	Citrato	Succinato	Piruvato	Glu-Mal	Magnitud de la variable
a*	Bajo	40	0	60	9,7 ± 0,2 <sup>c</sup>
	Alto**	60	0	40	9,2 ± 0,2 <sup>c</sup>
	Bajo	0	80	20	4,8 ± 0,2 <sup>b</sup>
	Alto	0	80	20	5,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
b*	Bajo	0	80	20	4,0 ± 0,1 <sup>c</sup>
	Alto	0	80	20	3,5 ± 0,1 <sup>c</sup>
	Bajo	70	0	30	1,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
	Alto	50	0	50	1,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
DMb <sup>a</sup>	Bajo	50	0	50	105,0 ± 9,0 <sup>c</sup>
	Alto	50	0	50	100,0 ± 9,0 <sup>c</sup>
	Bajo	0	70	30	-1,0 ± 8,0 <sup>b</sup>
	Alto	0	80	20	6,0 ± 7,0 <sup>b</sup>
OMb <sup>a</sup>	Bajo	0	80	20	9,0 ± 1,0 <sup>c</sup>
	Alto	0	80	20	1,0 ± 1,0 <sup>c</sup>
	Bajo	40	0	60	-2,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
	Alto	60	0	40	-2,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
MMb <sup>a</sup>	Bajo	0	70	30	87,0 ± 8,0 <sup>c</sup>
	Alto	0	80	20	81,0 ± 7,0 <sup>c</sup>
	Bajo	50	0	50	-8,0 ± 9,0 <sup>b</sup>
	Alto	50	0	50	-3,0 ± 0,0 <sup>b</sup>

Glu-Mal = glutamato-malato. Los valores mínimo y máximo de color obtenidos se designan como <sup>b</sup> y <sup>c</sup>, respectivamente. Cuando está presente el citrato (alto) representa el 25 % de las cantidades totales por lo que los otros aditivos se deben multiplicar por 0,75.

10 Tabla 20 - Combinaciones de sustratos que producen la respuestas máxima (max) o mínima (min) con las desviaciones estándar para a\*, b\* y los estados de mioglobina (no normalizados). Los resultados se muestran como % de cada adición de los respectivos productos químicos (cantidades totales de 0,05 mol/kg o de 0,1 mol/kg). Las afirmaciones se basaron en valores no ajustados (Tabla 12) del efecto del componente de la mezcla el día 3. Se muestran el envasado con alto nivel de oxígeno y nivel bajo y alto de citrato.

Variable	Citrato	Succinato	Piruvato	Glu-Mal*	Magnitud de la variable
a*	Bajo	0	0	100	13,4 ± 0,2 <sup>c</sup>
	Alto**	0	0	100	13,2 ± 0,3 <sup>c</sup>
	Bajo	60	40	0	11,4 ± 0,2 <sup>b</sup>
	Alto	50	50	0	11,4 ± 0,2 <sup>b</sup>
b*	Bajo	0	0	100	5,0 ± 0,1 <sup>c</sup>
	Alto	0	0	100	4,8 ± 0,2 <sup>c</sup>
	Bajo	60	20	20	4,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
	Alto	50	50	0	4,1 ± 0,1 <sup>b</sup>

DMb <sup>a</sup>	Bajo	80	0	20	-5,0 ± 1,0 <sup>c</sup>
	Alto	70	30	0	-6,0 ± 1,0 <sup>c</sup>
	Bajo	0	100	0	-10,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
	Alto	0	0	100	-12,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
OMb <sup>a</sup>	Bajo	0	0	100	91,0 ± 2,0 <sup>c</sup>
	Alto	0	0	100	98,0 ± 2,0 <sup>c</sup>
	Bajo	60	40	0	77,0 ± 2,0 <sup>b</sup>
	Alto	60	40	0	81,0 ± 2,0 <sup>b</sup>
MMb <sup>a</sup>	Bajo	0	90	10	17,0 ± 1,0 <sup>c</sup>
	Alto	50	50	0	15,0 ± 2,0 <sup>c</sup>
	Bajo	0	0	100	9,0 ± 2,0 <sup>b</sup>
	Alto	20	0	80	7,0 ± 2,0 <sup>b</sup>

\*Glu-Mal =-glutamato-malato. Los valores mínimo y máximo de color obtenidos se designan como <sup>b</sup> y <sup>c</sup>, respectivamente. Cuando está presente el citrato (alto) representa el 25 % de las cantidades totales por lo que los otros aditivos se deben multiplicar por 0,75.

Resultados - El efecto de la mezcla en comparación con la adición de sólo agua

- 5 En comparación con el promedio de los cambios de b\* en la Figura 6A, fue evidente que b\* disminuyó más rápidamente con la mezcla. Se obtuvo un valor bajo de b\* con el succinato y el glutamato-malato en el envasado con bajo oxígeno. El valor más bajo de b\* en la Tabla 15 (2,3 ± 0,1) fue menor que el más bajo de b\* en la Tabla 21 (3,1 ± 1,2). Por lo tanto había una razón válida para pensar que estos ingredientes en el envasado con bajo oxígeno reducían el sistema rápidamente y proporcionaban más DMb. La situación en el envasado con alto oxígeno fue menos pronunciada. El día 3 el sistema de alto oxígeno con agua tenía un valor de a\* igual a 12,8, mientras que el valor de a\* más alto obtenido después fue de 13,3 (Tabla 20 y 22).

- 10 En comparación con el promedio de los cambios de DMb en la Figura 8A, fue evidente que la DMb aumentó más rápidamente y alcanzó un valor más alto cuando sólo se añadió agua. Sin embargo, si se compara con la mezcla óptima de succinato y glutamato-malato en el envasado con bajo oxígeno el día 3, el contenido de DMb fue mucho más alto (Tabla 19 y 21) que en el agua.

- 15 La Omb en la muestra con agua añadida en el envasado con alto oxígeno fue inferior a la media de la muestra con aditivos (Figura 8B y Tabla 21). La Omb más alta (con glutamato-malato) el día 3 en la Tabla 20 (1,0 ± 0,0) fue superior a la más alta Omb en la Tabla 22 (80 ± 6). Así pues, tanto en el envasado con bajo oxígeno como con alto oxígeno, se alcanzó y se estabilizó el estado deseado más pronto con aditivos.

- 20 Tabla 21 - Muestras control que indican los valores de L\*, a\*, b\* y los estados de la mioglobina. A la carne de vaca triturada se añadió solamente agua y se variaron el nivel de oxígeno (bajo nivel de oxígeno), la edad (jóvenes y viejos) y el tipo de grasa (grasa de vaca y de cerdo). Se tomaron dos muestras para cada combinación con 3 medidas en cada muestra, lo que resultó en un total de 8 muestras control. Se presentan la media y las desviaciones estándar (no hay datos normalizados para los porcentajes de mioglobina)

	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13
L*	35,5 ± 0,4	35,2 ± 0,4	34,4 ± 0,4	34,5 ± 0,8	34,5 ± 0,5	34,3 ± 0,9
a*	12,0 ± 1,3	8,6 ± 2,4	10,1 ± 1,3	10,3 ± 1,2	10,3 ± 0,7	10,4 ± 0,7
b*	4,6 ± 0,8	3,1 ± 1,2	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,2
DMb	25,0 ± 17,0	65,0 ± 38,0	88,0 ± 19,0	67,0 ± 31,0	94,0 ± 7,0	97,0 ± 6,0
OMb	5,0 ± 3,0	-1,0 ± 3,0	-6,0 ± 5,0	0,0 ± 6,0	-2,0 ± 2,0	-6,0 ± 6,0
MMb	67,0 ± 17,0	30,0 ± 7,0	10,0 ± 10,0	22,0 ± 22,0	3,0 ± 1,0	4,0 ± 2,0

Tabla 22 - Muestras control que indican los valores de L\*, a\*, b\* y los estados de la mioglobina. A la carne de vaca triturada se añadió solamente agua y se variaron el nivel de oxígeno (alto nivel de oxígeno), la edad (jóvenes y viejos) y el tipo de grasa (grasa de vaca y de cerdo). Se tomaron dos muestras para cada combinación con 3 medidas en cada muestra, lo que resultó en un total de 8 muestras control. Se presentan la media y las desviaciones estándar (no hay datos normalizados para los porcentajes de mioglobina)

	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8
L*	36,4 ± 1,1	36,5±1,1	36,6 ± 1,1	35,7 ± 1,6
a*	14,7 ± 1,1	12,8 ± 0,9	11,3± 0,7	10,7 ± 0,9
b*	5,9 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,2± 0,3	5,3 ± 0,2
DMb	-17,0 ± 8,0	-4,0± 6,0	0,0 ± 12,0	6,0 ± 7,0
OMb	102,0±8,0	80,0±6,0	65,0±12,0	50,0±7,0
MMb	10,0 ± 10,0	13,0 ± 5,0	24,0±15,0	30,0 ± 4,0

Discusión y conclusiones

La carne de vaca triturada se envasó en atmósfera de bajo y de alto oxígeno, con la adición de una variedad de sustratos y concentraciones para aumentar la prevalencia de la mioglobina reducida.

Los resultados dan a entender que, en condiciones de bajo oxígeno, lo más importante será mantener la DMb en el valor máximo para esta atmósfera. La mezcla de succinato y glutamato-malato fue la variable individual más importante que afecta a los valores de DMb y de a\* (Tabla 19). A lo largo del experimento (13 días en el envasado con bajo oxígeno), la formación de DMb se estabilizó mediante el glutamato/succinato (días > 3 días que no se muestran). Las medidas de los estados de la mioglobina indican una fuerte superficie de respuesta hacia DMb cuando se utilizó una mezcla de succinato y glutamato-malato.

En condiciones de alto oxígeno, los resultados dan a entender que lo más importante será mantener la Omb en el valor máximo para esta atmósfera. La Omb máxima estuvo mediada principalmente por el glutamato-malato y el citrato. Parece por tanto, que el complejo I mitocondrial fue el que mejor mantuvo la prevalencia de Omb. A pesar de que la magnitud fue 0,0 para DMb, el succinato todavía fue importante y relevante para la DMb en condiciones de alto oxígeno, similarmente a su papel en el envasado con bajo oxígeno. Esto puede sugerir que el succinato esté actuando como un mediador entre MMb y Omb. Además, el gran efecto del succinato (que es el 70 % y 80 % de la mezcla, con y sin citrato) en atmósfera de alto oxígeno, en comparación con la atmósfera de bajo oxígeno (que es el 50 % de la mezcla) indican que la reducción mitocondrial de la mioglobina que se produce a través del complejo II fue más fuerte en el envasado con alto oxígeno que con bajo oxígeno (Tablas 19 y 20). Estos resultados indican que el metabolismo del succinato estaba influenciado por la concentración de oxígeno y que la actividad podría llegar a ser regulada por incremento en un ambiente de alto oxígeno. La acumulación de MMb por lo tanto, supera la capacidad mitocondrial de reducción de la mioglobina en esta atmósfera y el color de la carne se vuelve marrón. Las adiciones de glutamato-malato desaceleraron la acumulación de MMb.

El piruvato provocó la formación de MMb tanto en el envasado con bajo oxígeno como con alto oxígeno. El piruvato es un producto de la glucólisis y puede llegar a convertirse en acetil-coenzima A y atraviesa la membrana mitocondrial en el ciclo TCA siempre que haya disponible suficiente coenzima A (CoA). Ramanthan et al. {Meat Sci. (2010) 86 (3): 738-741} demostraron que el piruvato puede mejorar significativamente el color de la carne a pH 5,6 y 7,4. También ha sido publicado por Messer et al. {Am J Physiol Cell Physiol (2004) 286 (3): C565-572} que la oxidación del piruvato contribuye poco (2,1 %) a la fosforilación oxidativa. Con el fin de que el piruvato funcione como una fuente de electrones en el ciclo TCA, es necesario que sea aplicado junto con el malato que se condensa a oxaloacetato (todavía requiere que esté presente suficiente CoA) para que suceda. En condiciones anaeróbicas como en la carne, el piruvato parece que es metabolizado fuera de las mitocondrias a lactato por medio de la lactato-deshidrogenasa. En el presente sistema, el piruvato puede, por tanto, haber contribuido a la disminución de pH y en consecuencia haber interferido con el sistema reductor y de ese modo generar indirectamente MMb. Además, se analizó el piruvato en el presente sistema, pero no indujo el consumo de oxígeno (no se muestran resultados).

En general, las condiciones que dieron la máxima cantidad de DMb en el sistema de bajo oxígeno contenían principalmente mezclas de succinato y glutamato-malato, mientras que las condiciones que promovían Omb y MMb contenían piruvato y glutamato-malato. Sin embargo, el piruvato no promovió mucho tiempo la formación de Omb en el envasado con alto oxígeno (al menos no después del día uno). El glutamato-malato fue el componente más importante para regular la Omb y el succinato para la formación de DMb en el envasado con alto oxígeno.

Los resultados del día 3 en ambiente de alto oxígeno sugieren el aumento de la estabilidad de la Omb con el citrato presente. Por otra parte, la influencia del citrato en el mantenimiento de la Omb aumentó notablemente el día 8 en el envasado con alto oxígeno en relación con la importancia de la mezcla.

Se ha demostrado que el succinato, glutamato, malato y citrato eliminan el oxígeno residual y reducen la mioglobina en la carne. Para el almacenamiento con alto oxígeno de la carne triturada, se ha encontrado que el glutamato-

malato es el que mejor conservaba la OMB y que el citrato se hacía cada vez más importante con el tiempo de almacenamiento. En atmósfera de bajo oxígeno, el malato-glutamato más succinato indujo rápidamente un estado de DMb pura, mientras que el piruvato promovió la formación de MMb.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de envasado de un producto alimentario que comprende carne cruda, comprendiendo el método poner en contacto dicho producto o la carne cruda a ser utilizada en el mismo con una composición que comprende como componentes activos: (i) succinato y glutamato y/o malato; o (ii) glutamato, malato y, opcionalmente, citrato; y envasar dicho producto.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además almacenar la carne durante un período de tiempo y en donde dicho método es efectivo para aumentar la estabilidad del color y/o reducir la aparición y/o la extensión de la ranciedad de la carne cruda.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho envasado se realiza en una atmósfera modificada.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la atmósfera modificada es una atmósfera gaseosa de bajo oxígeno que contiene menos de aproximadamente 1 % en moles de oxígeno molecular, o una atmósfera gaseosa de alto oxígeno que contiene hasta aproximadamente 80 % de oxígeno molecular.
- 15 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición o bien comprende succinato, glutamato y al menos uno de citrato, isocitrato y aconitato,
- o bien
- la composición comprende succinato, glutamato, malato y citrato, preferiblemente succinato, glutamato, malato y citrato en una relación de aproximadamente 11:4:2:3 en peso.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición comprende componentes activos seleccionados de ácido succínico, ácido glutámico, glutamato monosódico, ácido cítrico, citrato trisódico, ácido isocítrico, isocitrato trisódico, ácido aconítico, ácido málico, malato de sodio, ácido pirúvico, piruvato sódico y piruvato cálcico.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición comprende 30-75 % de succinato en peso del total de los componentes activos.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición comprende 10-30 % de glutamato en peso del total de los componentes activos, y/o en donde la composición comprende 5-25 % de malato en peso del total de los componentes activos, y/o en donde la composición comprende 10-30 % de citrato en peso del total de los componentes activos.
- 30 9. El método de la reivindicación 1, en donde la composición comprende como componentes activos (i) succinato y glutamato y/o malato; y dicho producto se envasa en un ambiente gaseoso de bajo oxígeno que contiene menos de 2 % en moles de oxígeno molecular, preferiblemente en donde la composición comprende 25-95 % de succinato en peso del total de los componentes activos, 15-30 % de glutamato en peso del total de los componentes activos, y/o 15-30 % de malato en peso del total de los componentes activos;
- o
- 35 en donde la composición comprende como componentes activos (ii) glutamato, malato y citrato; y dicho producto se envasa en un ambiente gaseoso de alto oxígeno que contiene más de 2 % en moles de oxígeno molecular, preferiblemente en donde la composición comprende 25-75 % de glutamato en peso del total de los componentes activos, 25-75 % de malato en peso del total de los componentes activos, y hasta el 30 % de citrato en peso del total de los componentes activos (por ejemplo 10-30 % de citrato en peso del total de los componentes activos).
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición comprende menos de aproximadamente 10 % de piruvato en peso del total de los componentes activos.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la carne se pone en contacto con una cantidad de composición que contiene entre 7,5 y 20 g de dichos componentes activos por kg de carne.
- 45 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición comprende ácido succínico y una sal de ácido succínico, por ejemplo, en una relación de aproximadamente 4:1.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición comprende ácido glutámico y una sal de ácido glutámico, y/o en donde la composición comprende ácido málico y una sal de ácido málico, y/o en donde la composición comprende ácido cítrico y una sal de ácido cítrico.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la composición es una composición líquida que tiene un pH entre 5 y 6, por ejemplo aproximadamente 5,8.

15. Una composición que comprende o bien succinato y glutamato y/o malato como componentes activos, en donde el succinato está presente en una cantidad de 25-95 % en peso del total de los componentes activos,

5 o bien

que comprende glutamato, malato y, opcionalmente, citrato como componentes activos, en donde el malato está presente en una cantidad de 5-25 % en peso del total de los componentes activos, preferiblemente en donde la composición comprende glutamato, malato y citrato como componentes activos.

10 16. Un método o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde los componentes activos se proporcionan en la forma de L-glutamato, D-isocitrato, cis-acnitato o L-malato.

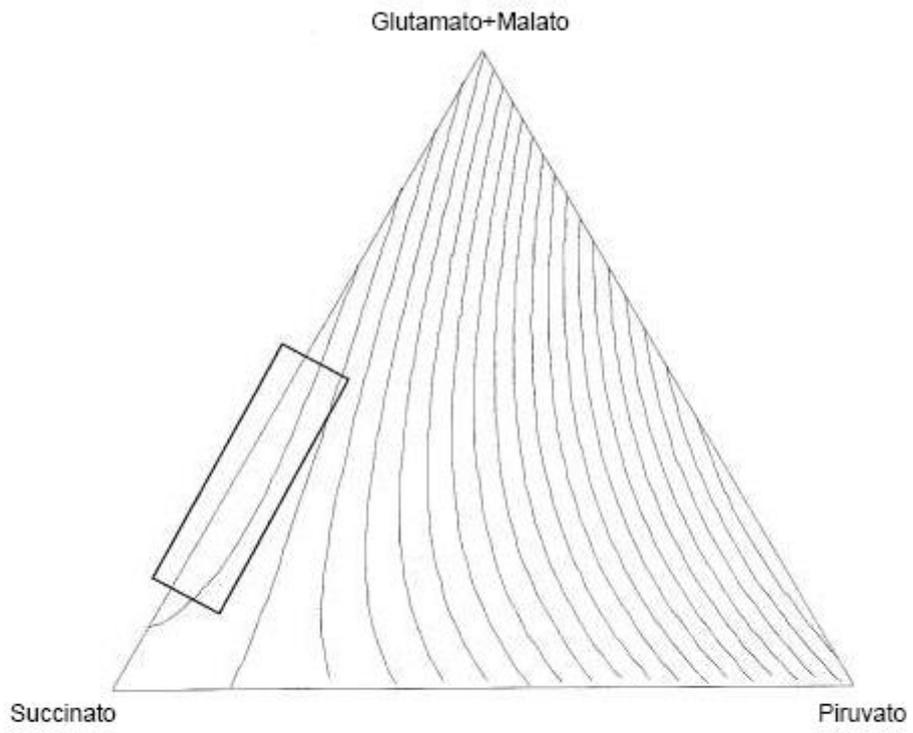


FIG. 1

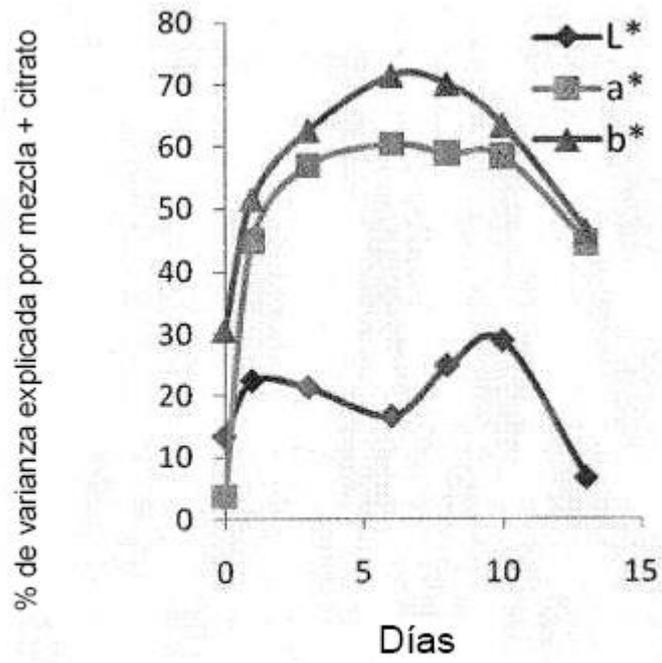


FIG. 2

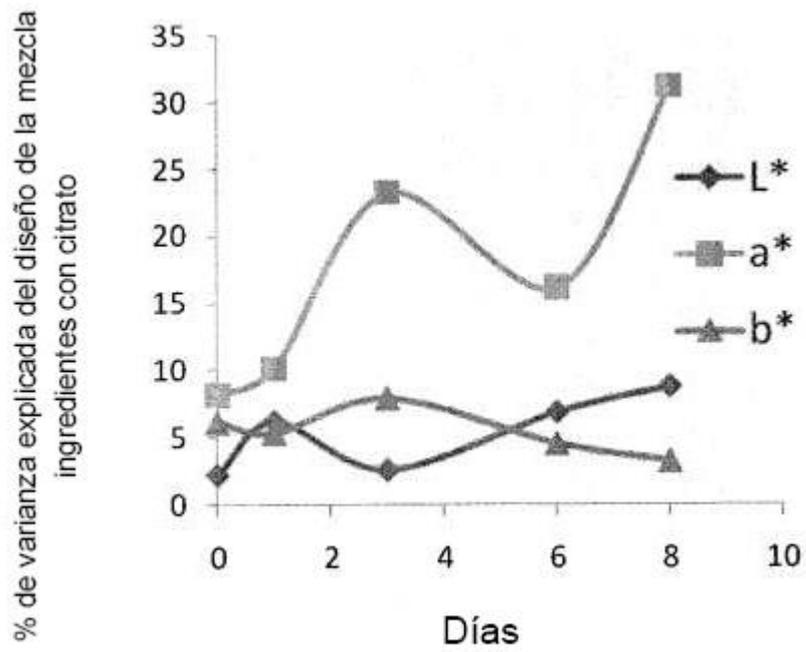


FIG. 3

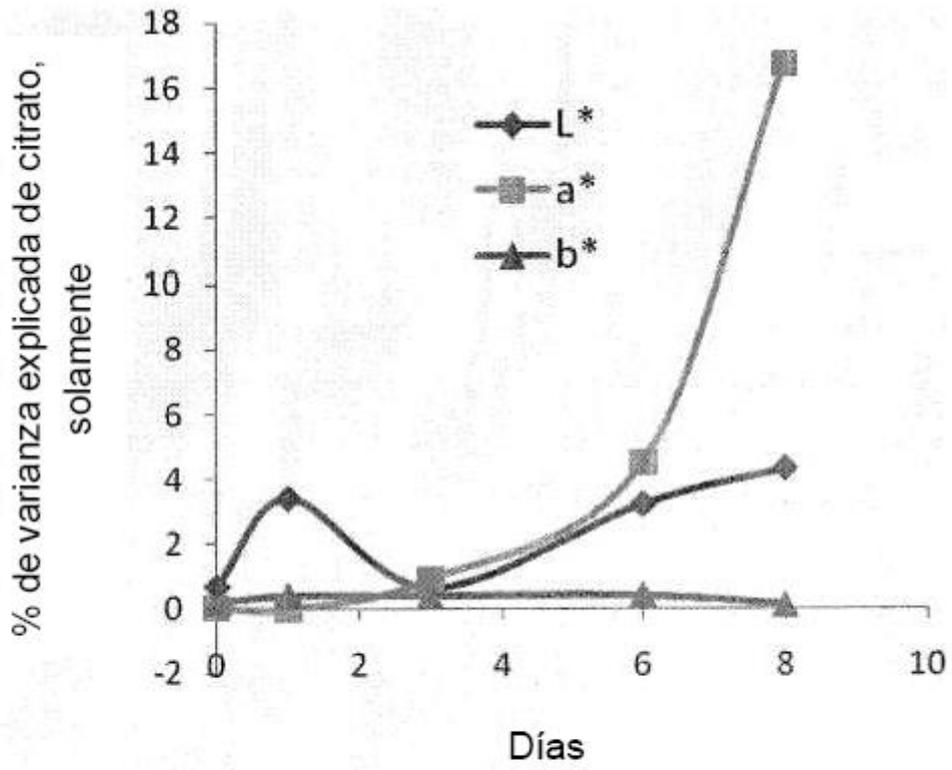


FIG. 4

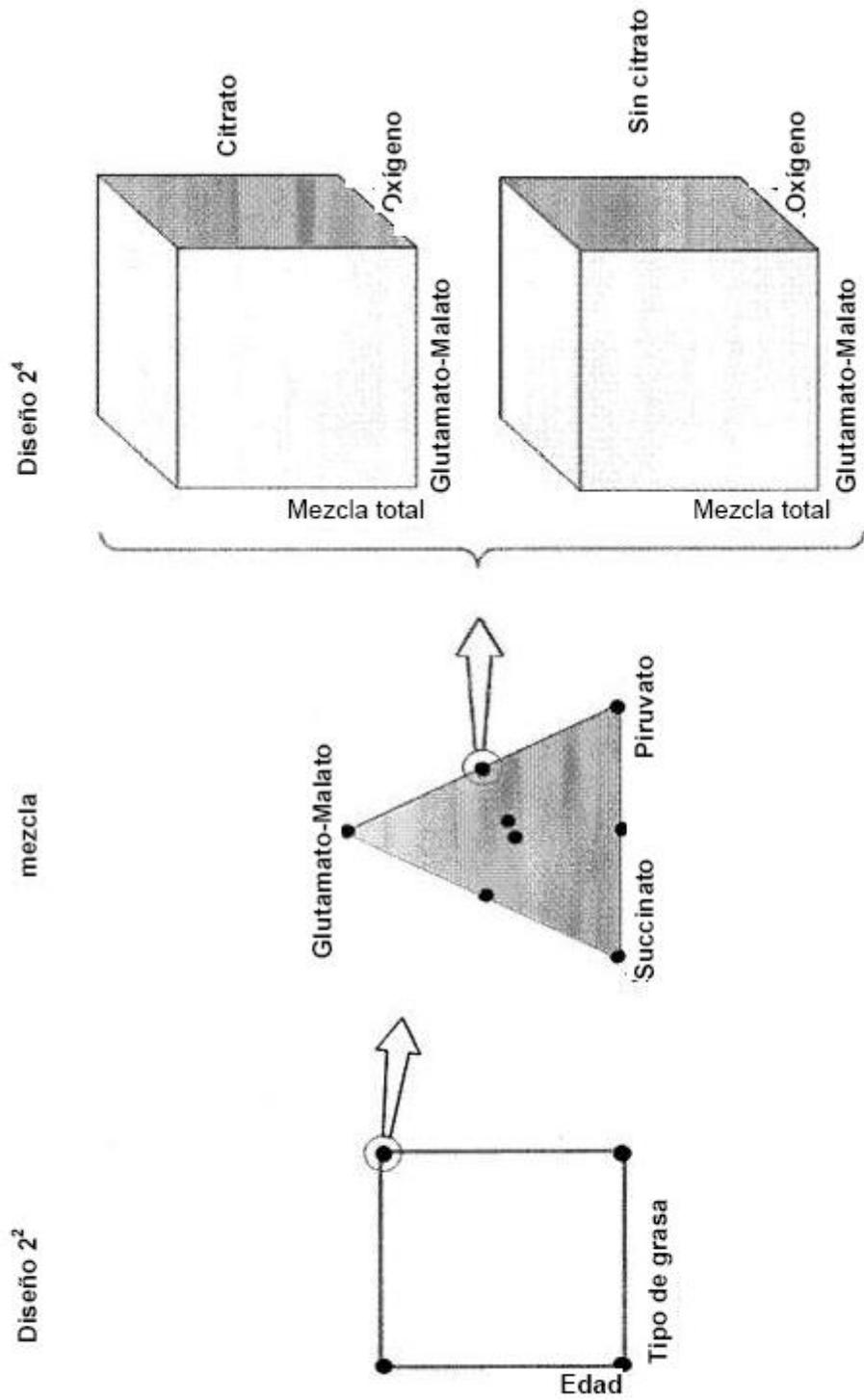


FIG. 5

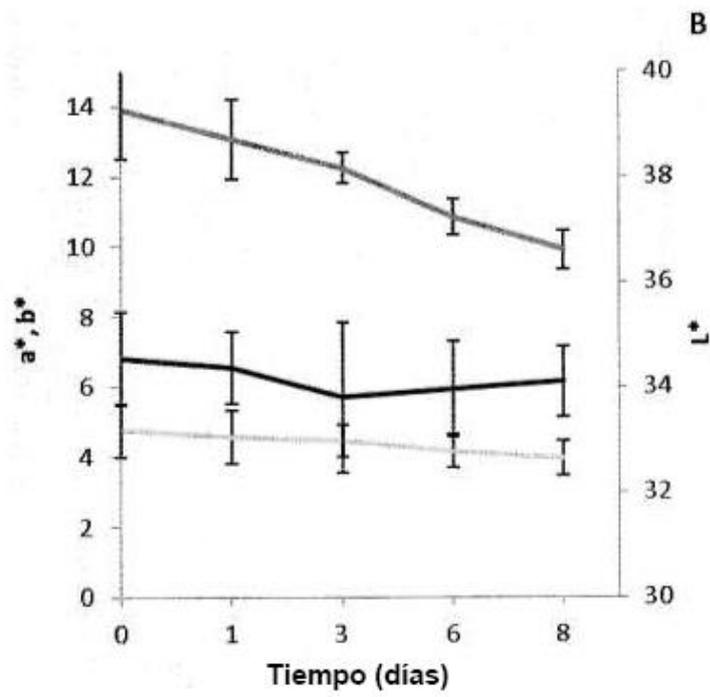
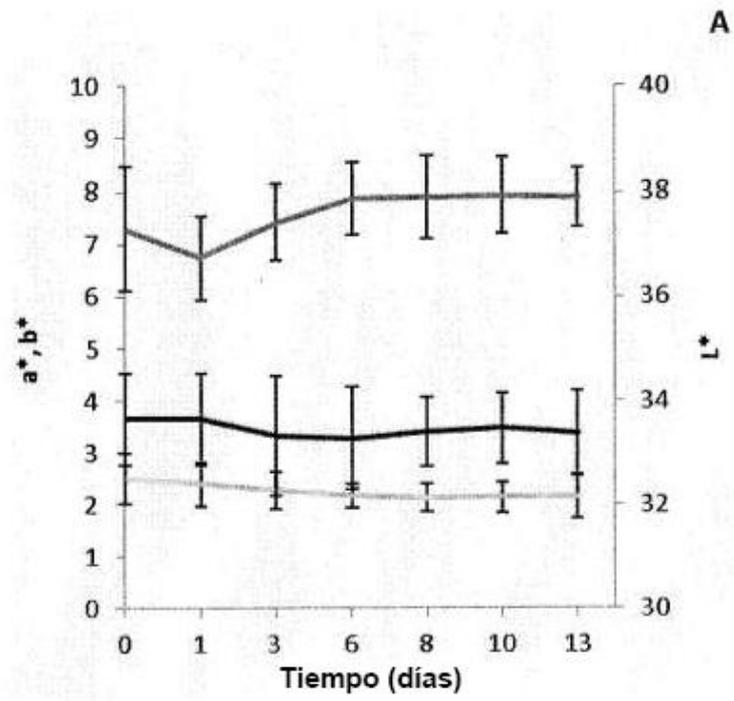


FIG. 6

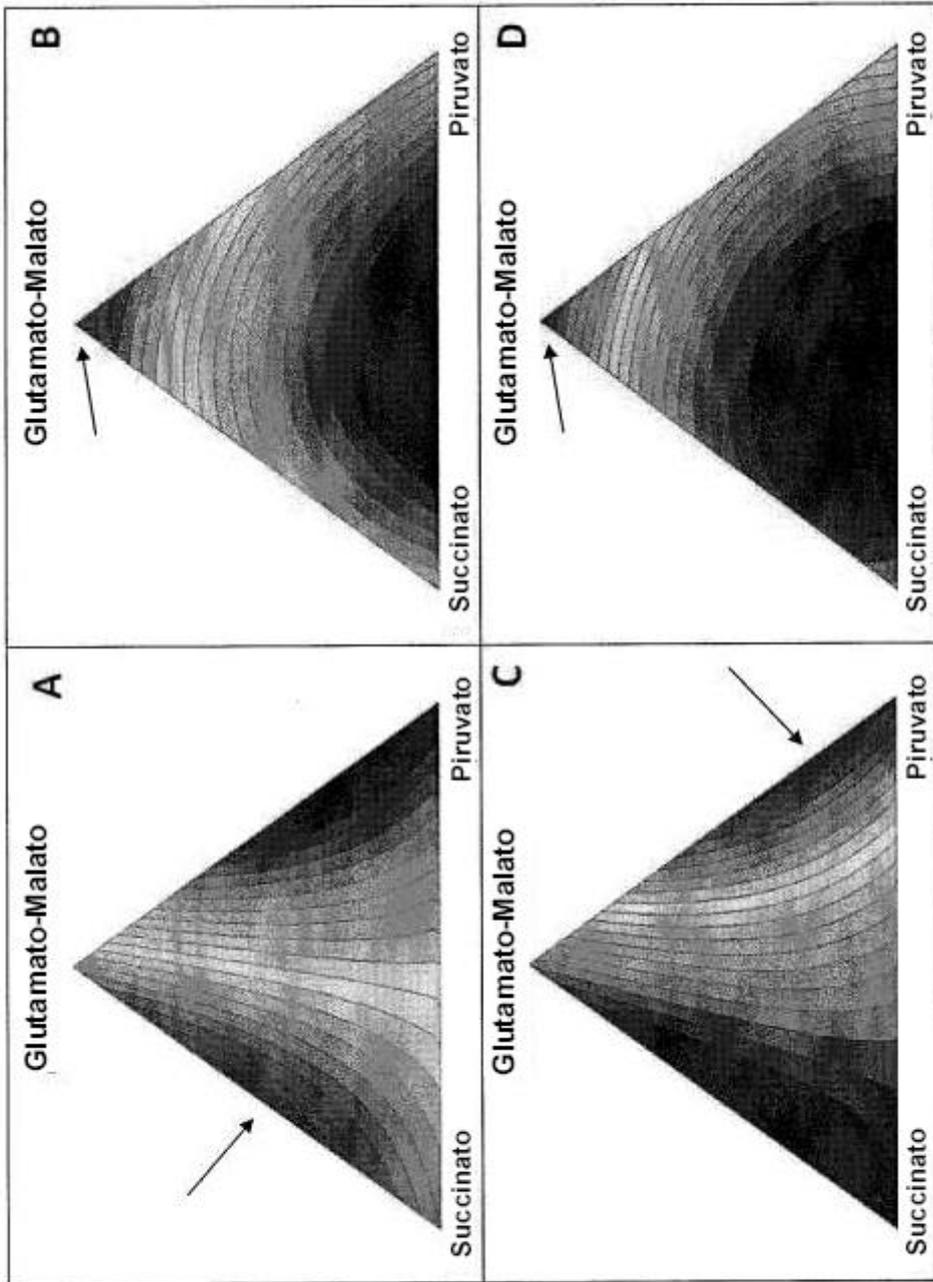


FIG. 7

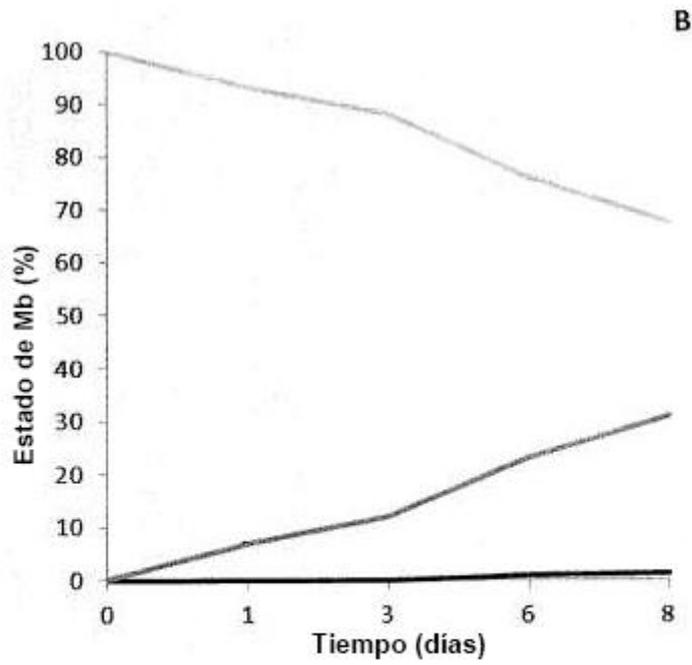
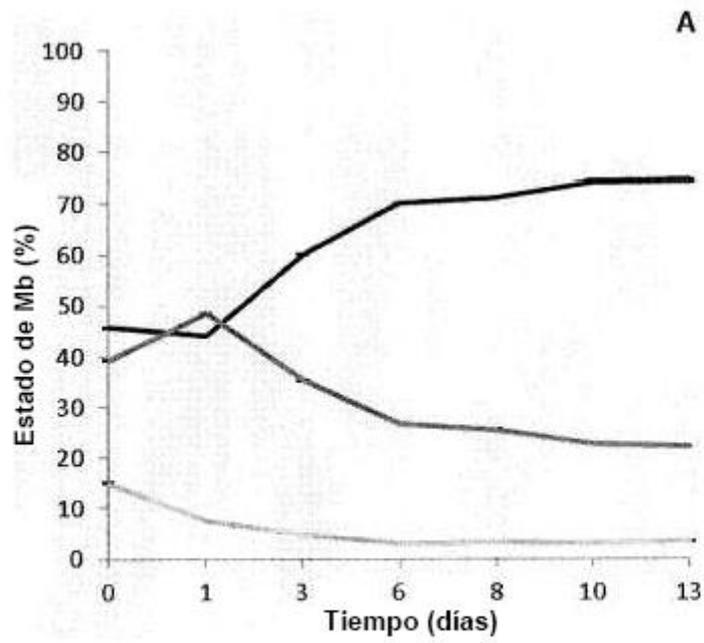


FIG. 8

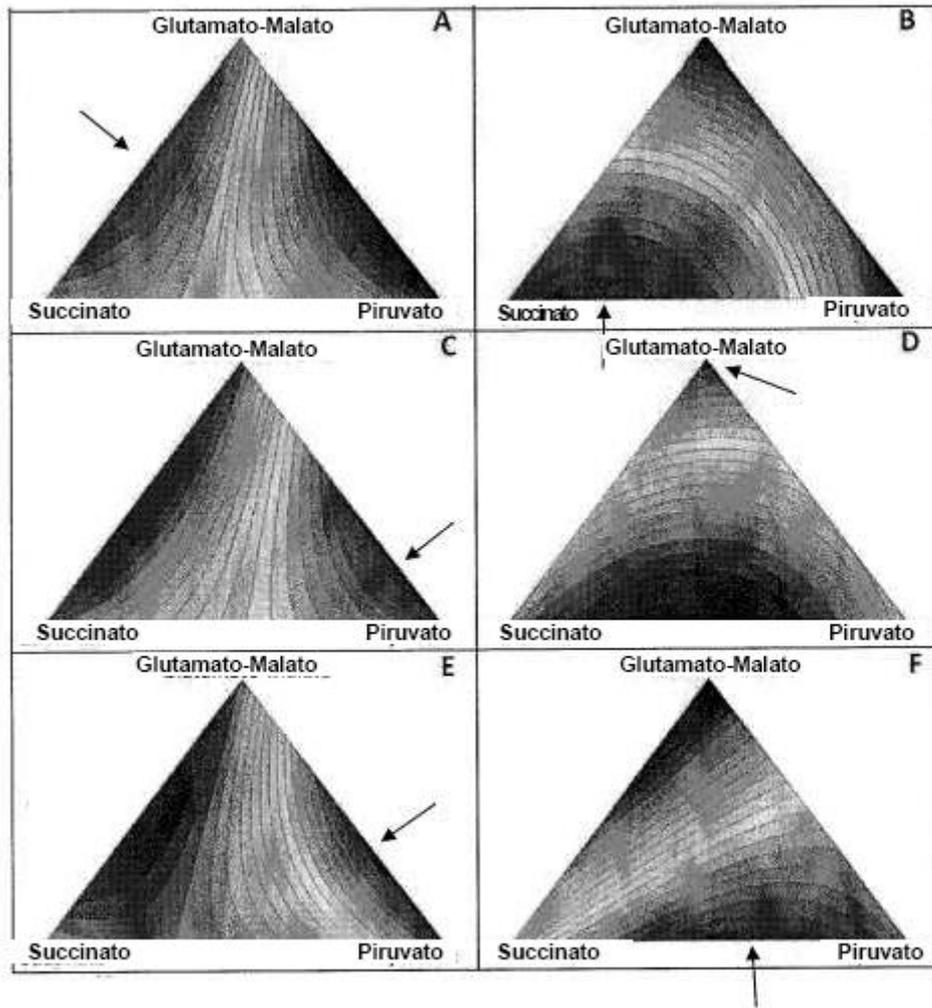


FIG. 9