

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Titulo de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

DIETA PRE-SACRIFICIO QUE INCLUYE METIONINA

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:

ADISSEO FRANCE
S.A.S.

**Dirección
Electrónica:**

sic@castellanosyco.co

Dirección:

Immeuble Antony
Parc II, 10, place du
Général de Gaulle,
92160 Antony,
FRANCIA

**Domicilio/País de
constitución:**

FRANCIA - HAUTS-DE-
SEINE - ANTONY

Identificación:

☐ CEDULA DE
CIUDADANIA

☒ EMPRESA
EXTRANJERA

☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE
EXTRANJERIA

☐ NIT

Número:

516861770652-

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1. ADISSEO FRANCE S.A.S.

NN

516861770652

4 Datos del Inventor

Nombre:	STEFAN PIERZYNOWSKI	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	Alfagelgranden 24, S- 231 32 Trelleborg, SUECIA	Domicilio/País de constitución:	SUECIA - SKÅNE - TRELLEBORG
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica Número: -			
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres 1. PIERZYNOWSKI STEFAN		Domicilio SUECIA	
6	Datos Inventor(es)		
País de Residencia 1. SUECIA		Departamento/Estado SKÅNE	Ciudad TRELLEBORG
Dirección Alfagelgranden 24, S- 231 32 Trelleborg, SUECIA			
7	Datos del Representante Legal / Apoderado		
Nombre:	MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	CALLE 94A 7A 09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación:			

☒ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número: 39779654-

Presentación de Poder

Año de Radicación

Número de Radicación

8

Datos Solicitud: PCT / WO

Número Solicitud:

PCT/EP2012/072241

Fecha Solicitud:

09/11/2012

Número Publicacion:

WO 2013/068525

Fecha Publicacion:

16/05/2013

9

Declaraciones de prioridad

☒ SI ☐ NO

(33) País de origen

Codigo del país

(31) No. Solicitud

(32) Fecha

1. SUECIA

SE

1151056-7

09/11/2011

10

Reivindicaciones

Número reivindicaciones:

15

Pago Reivindicaciones:

Si

11

Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas

☐ Universidades públicas o privadas

☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12

Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones

☒ Descripción

☐ Dibujos y/o Figuras

☐ Resumen

☐ Certificado Depósito Material Biológico

☐ Uso de Conocimiento tradicional

☐ Listado de secuencias

- ☐ Artes finales 12 x 12 cm
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Otros Anexos

DIETA PRE-SACRIFICIO QUE INCLUYE METIONINA

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere al campo de la calidad de la carne fresca, de e.g.,
cerdo. Particularmente, la presente invención se refiere a la atmósfera de empaque de
carne fresca y su efecto sobre la calidad de la carne, particularmente la estabilidad a la
oxidación y la textura, y cómo mejorar la calidad de la carne fresca empacada en una
atmosfera modificada o al vacío mediante una dieta de pre-sacrificio por suplementación
10 de metionina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La carne fresca a menudo se empaca en empaques con atmósfera modificada alta
15 en oxígeno. Esta atmósfera de empaque suele consistir en una mezcla de alrededor de
80% O₂ y 20% CO₂. La alta concentración de CO₂ inhibe el crecimiento bacteriano aerobio
y prolonga la vida útil de la carne. El alto nivel de O₂ proporciona al consumidor el color de
la carne deseado rojo estable, pero también promueve la oxidación de macronutrientes en
la carne. La oxidación de macronutrientes puede afectar la calidad comestible de la carne.
20 La oxidación lipídica es conocida por afectar el sabor y la oxidación de proteínas se
asocia con la disminución de la ternura.

El empaque es importante para prolongar la vida útil de la carne y hacer la
distribución de los productos más eficiente. Protege un producto dado contra el ambiente
25 exterior y efectos de deterioro, tales como; patógenos, cambios de color, mal sabor, mal
olor, cambios en la textura, y la pérdida de nutrientes.

El Empaque, como se mencionó anteriormente, ha demostrado que tiene un efecto
sobre calidad de la carne como el color, sabor, capacidad de retención de agua y el
30 crecimiento microbiano. El MAP alto en oxígeno promueve la oxidación de lípidos y
floración de los pigmentos de mioglobina a oximioglobina, y se sospecha que influye
negativamente en la ternura de la carne. El empaque al vacío influye en el color de la
carne, la carne empacada al vacío a menudo es de color púrpura debido a que la falta de
oxígeno hace que los pigmentos de mioglobina formen desoximioglobina. Si se deja una

pequeña cantidad de oxígeno en el empaque al vacío, la carne se vuelve marrón debido a la formación de metmioglobina.

Después del sacrificio las células musculares son más susceptibles a los procesos oxidativos, de lo que serían en el animal vivo. La disponibilidad de oxígeno y la exposición a la luz son dos factores principales en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, por tanto en la oxidación de la carne. El proceso, de empaque en oxígeno alto, y almacenamiento pueden contribuir a la formación de ROS y por lo tanto el potencial de oxidación del producto. Los ROS significativos en la carne son el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo, perhidroxilo, superóxido y el oxígeno singlete.

Los procesos oxidativos en la carne afectan a casi todas las moléculas biológicas y por lo tanto a la calidad global de la carne. Los pigmentos, ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos son las moléculas biológicas más afectadas por los procesos oxidativos (McMillin, K. W, "¿Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat." Meat Science 2008, vol. 80, p. 43-65 2008). La oxidación de estas moléculas se sabe que afecta los aspectos de calidad, como el color, el sabor y el olor de la carne (Kanner, J. (1994): "Oxidative processes in Meat and Meat Products: Quality Implications". Meat Science 1994, vol. 36, p. 169-189). La oxidación lipídica es conocida por alterar el color de la carne y dar a la carne un sabor rancio. La oxidación de proteínas se sugiere que influencia la digestibilidad de la carne, por lo tanto, el valor nutricional, la ternura, el sabor, y la capacidad de retención de agua.

WO2009/032276 proporciona un método para mejorar la ternura de la carne que comprende la administración de al menos una forma de beta-agonistas de al menos un animal bovino. Sin embargo, actualmente estos tipos de beta-agonistas están prohibidos en varios países y regiones, como Europa.

El documento WO 2005/002358 proporciona un método para mejorar la calidad de la carne de los animales, en el que el método comprende alimentar al animal con una dieta suplementada con tocotrienoles mezclados. Sin embargo, los tocotrienoles sólo evitarán la oxidación de lípidos y no la oxidación de proteínas.

U.S. 6.042.855 proporciona un método para mejorar la ternura de la carne y los productos cárnicos. El método incluye la administración de dosis excesivas de vitamina D

a los animales productores de carne pre-sacrificio. La dosis excesiva de vitamina D se cree que mejora la calidad de la carne por un contenido de calcio intramuscular superior, que, por otra parte, debilita las miofibrillas en los músculos.

5 El efecto de la atmósfera de empaque en el sabor y la ternura de la carne proporciona un dilema para los fabricantes y los consumidores, ya que hay ventajas y desventajas con el empaque en atmósfera modificada alta en oxígeno. La inhibición del crecimiento bacteriano es importante para la seguridad alimentaria y la vida útil, y los consumidores prefieren la carne roja, ya que asocian esto con la carne virgen fresca. La oxidación cambia la calidad de consumo de la carne. El sabor rancio causado por la oxidación de los lípidos y la ternura disminuida causada por la oxidación de proteínas no son deseables, ya que los consumidores tienden a preferir la carne tierna sin mal sabor. Por lo tanto, es altamente deseable poder inhibir la oxidación de proteínas asociadas con la ternura de la carne.

15

Existe, pues, una necesidad urgente de desarrollar medios y métodos para mejorar la calidad de la carne, tal como la ternura de la carne fresca, sobre todo cuando se empaca en atmósfera modificada. Por consiguiente, la presente invención busca proporcionar medios y métodos para abordar estas necesidades e intereses para el empaque de carne fresca.

20

RESUMEN DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención proporciona el uso de la metionina para mejorar la calidad de la carne, tal como la ternura y la estabilidad oxidativa de color y estabilidad de la vida útil de la carne. Tal uso puede ser cuando la metionina se administrada como una dieta pre-sacrificio.

25

La carne además puede ser carne fresca o carne congelada. Sin embargo, toda la carne es carne no humana y puede ser la carne de mamífero no humano, carne de ave o carne de pescado. Por lo tanto la carne puede se puede seleccionar del grupo que consiste de carne de cerdo, carne de vaca, gallina, pollo, pavo, pescado.

30

La metionina puede ser una formulación de suplementos de metionina que comprende al menos otros forrajes, tales como L-metionina. Otros ejemplos son en los

35

que la metionina es DLM (i.e., DL-metionina) o HMTBA (i.e., ácido 2-hidroxi-4- (metiltio) butanóico). La metionina puede estar en la forma de L-metionina, tal como en la forma de fuentes sintéticas de metionina. Puede ser L-metionina en todas sus formas de sales, sus análogos (e.g., ácido 2-hidroxi-4-Metil Tio Butanóico o todas sus formas de sal), derivados
5 (e.g., ésteres isopropilo del ácido 2-hidroxi-4-Metil Tio Butanóico o cualquier otro éster), o mezclas de los mismos.

Dicha carne puede ser almacenada en condiciones al vacío o de oxígeno alto.

10 Dicha metionina se puede administrar como 0.1-1g, tal como 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g de la metionina total por kg de peso corporal por día pre-sacrificio.

En otro aspecto, la metionina se administra como 0.3-0.6% por encima de la dosis
15 diaria recomendada. La dosis diaria puede variar entre las diferentes especies. Sin embargo, tales recomendaciones están fácilmente disponibles para alguien versado en el arte de la alimentación animal para diferentes especies.

Por lo tanto, la dosis de metionina adicional como parte de los usos, métodos y dietas pre-sacrificio de acuerdo con la invención en el presente documento se calcula
20 fácilmente con base en este para tener un efecto sobre la calidad de la carne como la terneza, la estabilidad oxidativa de color de la carne fresca y la vida útil de dicha carne fresca. La metionina se puede administrar en el día -30 a -1 pre-sacrificio.

25 Por lo tanto, la metionina es, en cierto aspecto más utilizada para mejorar la calidad de la carne, como la terneza y la estabilidad oxidativa del color y la estabilidad de la vida útil de la carne.

Las dosis y días de alimentar dicha metionina se han dado anteriormente y
30 también son para todas las implementaciones en el uso para la mejora de la calidad de la carne. Particularmente, la metionina se utiliza en dosis de 0.1-1g, tal como 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g del total de metionina por kg de peso corporal por día pre-sacrificio. En otro aspecto, la metionina se utiliza en una dosis de 0.3 a 0.6% por encima de la dosis diaria recomendada. Para
35 ambos aspectos de dosificar la metionina se administra en el día -30 a -1 pre-sacrificio.

En un aspecto adicional, se incluye un método de mejora de la calidad de la carne, tal como la terneza y la estabilidad oxidativa de color y estabilidad de vida útil de la carne en animales. Dicho método comprende las etapas de administrar pre-sacrificio, metionina en una cantidad la cocción a un mamífero no humano o una especie de ave. La
5 administración a dicho mamífero no humano o especie de ave se puede hacer vía oral y, preferentemente, se pueden hacer a través de una administración en el agua que bebe. La metionina se puede administrar en el día -30 a -1 pre-sacrificio. La metionina también se administra en el método en la misma dosis que se usan en este documento, i.e., en una dosis de 0.2-1g, tal como 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75,
10 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g por kg de peso corporal por día de la metionina total. Puede que, en otro aspecto se administre como una dosis de 0.3-0.6% por encima de la ingesta de la dosis diaria recomendada.

Además, una dieta de pre-sacrificio animal, que comprende metionina se describe
15 en este documento.

En la dieta de pre-sacrificio la metionina se alimenta en los días -30 a -1 pre-sacrificio en una dosis de 0.1-1g, tal como 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g por kg de peso corporal por día como
20 metionina total a un animal no humano o en una dosis de 0.3-0.6% por encima de la dosis recomienda para la ingesta diaria. La dieta de pre-sacrificio puede comprender además al menos otro alimento para mamíferos no humanos o especies de aves. Aún un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar carne de un animal sacrificado, dicho animal se alimenta con una dieta de pre-sacrificio que comprende metionina de acuerdo
25 con la invención o de acuerdo con cualquiera de los métodos usados en este documento.

Aún un aspecto adicional de la presente invención proporciona un producto que comprende la carne, al menos parcialmente a partir de un animal sacrificado, dicho animal se alimenta con una dieta de pre-sacrificio que comprende metionina de acuerdo con la
30 invención o de acuerdo con cualquiera de los métodos y usos de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para mejorar la terneza de la carne que comprende la etapa de administrar la metionina como una dieta de pre-sacrificio a un animal. La carne puede ser carne de ave o carne de pescado o carne de
35

mamífero no humano. Más precisamente, la carne se puede seleccionar del grupo que consiste de carne de cerdo, carne de vaca, gallina, pollo, pavo, pescado.

De acuerdo con el método de la presente invención, la metionina se puede
5 administrar en forma de una formulación de suplementos de metionina.

La metionina se puede administrar en forma de L-metionina, o en la forma de fuentes de metionina sintéticas tales como DLM (i.e., DL-metionina) o la totalidad de sus formas de sal, sus análogos (e.g., ácido 2-hidroxi-4-metil tio butanóico o todas sus formas
10 de sal), sus derivados (e.g., éster isopropílico del ácido 2-hidroxi-4-metil tio butanóico o cualquiera de otros ésteres), o mezclas de los mismos.

De acuerdo con el método de la presente invención, la metionina se puede administrar como 0.1-1g, tal como 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65,
15 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g, de la metionina total por kg de peso corporal por día pre-sacrificio del animal.

De acuerdo con el método de la presente invención, la metionina se puede administrar al animal como 0.3-0.6% por encima de la dosis diaria recomendada.
20

De acuerdo con el método de la presente invención, la metionina se puede administrar en los días -30 a -1 pre-sacrificio. Y más preferiblemente, la administración de la metionina se realiza por vía oral al animal.

25 La presente invención proporciona una dieta pre-sacrificio animal que comprende metionina y en la que la metionina se alimenta en el día -30 a -1 pre-sacrificio en una dosis de 0.1 a 1g por kg de peso corporal por día al animal o en una dosis de 0.3-0.6% por encima de la dosis diaria de ingesta recomendada. La dieta de pre-sacrificio puede comprender además al menos otro alimento para el animal.

30 La presente invención proporciona una carne de un animal sacrificado, dicho animal se alimenta con una dieta de pre-sacrificio que comprende la metionina como se describió anteriormente.

La presente invención proporciona un producto que comprende carne por lo menos parcialmente de un animal sacrificado, dicho animal se alimenta con una dieta de pre-sacrificio que comprende la metionina como se describió anteriormente.

5 La presente invención se refiere al uso de la metionina para mejorar la terneza de la carne de ave o carne de pescado o mamífero no humano. Y más preferentemente, la metionina puede estar en la forma de L-metionina, o en la forma de fuentes de metionina sintética tal como DLM o la totalidad de sus formas de sal, sus análogos (e.g., ácido 2-hidroxi-4-metil tio butanóico o todas sus formas de sal), sus derivados (e.g., éster
10 isopropílico del ácido 2-hidroxi-4-metil tio butanóico o cualquier otro éster), o mezclas de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La figura 1 muestra las amplitudes (mV) sEMG pico a pico medidas en varias frecuencias (60, 150 y 200 Hz) para cerdos en los grupos de CONTROL (n=3) (no DLM) como cuadrados abiertos, los DLM *pre* n=6 como círculos rellenos; *post* n=6 como círculos negros y los HMTBA (n=3) como cuadrados negros.

20 La figura 2 muestra los valores promedios de la fuerza de corte de los grupos DLM (1), de control (2), y HMTBA (3).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 **Definiciones**

Como se usa en este documento “antes de la cosecha” se entiende como pre-cosecha o pre-sacrificio del animal.

30 Como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “y”, y “el” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento “al menos una” se entiende como uno o más, i.e., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.

35

Tal como se usa en el presente documento “animal” se entiende que signifique mamíferos no humanos, especies aviarias, e.g., aves de corral, y/o pescado en función del contexto. Otros ejemplos se dan en el presente documento.

5 Tal como se usa en el presente documento, un “alimento de dosis completa” se entiende que significa un alimento que está completo respecto de nutrientes, proteínas, vitaminas y minerales y se utiliza como alimento diario para un animal. Normalmente, un animal come un determinado porcentaje, %, de la alimentación de la dosis completa por día por kg de peso corporal (pc). Se dan ejemplos en el presente documento.

10

Como se usa aquí, “carne” incluye la carne como materia prima, carne fresca y congelada cualquiera que sea la situación lo permita. Además, “carne” es carne animal que se utiliza como alimento. “Carne” además significa el músculo esquelético y la grasa asociada y otros tejidos, pero también puede describir otros tejidos comestibles tales como órganos y despojos.

15

Para los anglosajones, “carne” se utiliza generalmente en la industria de carne empacada en un sentido más restrictivo carne de las especies de mamíferos (cerdos, vacas, corderos, etc.) levantados y preparados para el consumo humano. Como cuestión de aclaración, como se usa aquí “carne” no debe interpretarse de manera restrictiva, sino que incluya más carne de otras especies como las aves de corral, pescado y otros animales. Además, la carne como materia prima se utiliza para el procesamiento de la carne y se incluye en el término “carne” en el presente documento.

20

25 Es un objetivo de la presente invención proporcionar medios y métodos para mejorar la calidad de la carne, tal como la terneza y la estabilidad oxidativa de la carne y los productos cárnicos.

Además, es un objetivo proporcionar medios y métodos para mejorar la terneza de la carne de mamíferos no humanos, tal como carne de res, carne de cerdo y de aves de corral, i.e., especies de aves, carne y productos cárnicos de porcino, aves de corral (no rumiantes) y ganado (rumiantes).

30

Es además un objetivo de la presente invención proporcionar medios y métodos para mejorar la terneza de dicha carne que no afecte el sabor de la carne.

35

Es además un objetivo de la presente invención proporcionar medios y métodos para mejorar la terneza de la carne y los productos cárnicos que sean seguros, simples y rentables.

5 Es un objeto adicional proporcionar medios y métodos para proporcionar una dieta antiestrés a un animal pre-sacrificio para mejorar la calidad, tal como la terneza y la estabilidad a la oxidación, de la carne. La mejora de la estabilidad a la oxidación aumentará aún más la vida útil de la carne. La carne a ser mejorada es carne fresca procedente de animales sanos, i.e., los animales de sacrificio.

10

También es un objeto adicional de la presente invención proporcionar medios y métodos para reducir el estrés oxidativo en los animales, animales tal como, i.g., un cerdo, aves de corral o pescado, mediante el uso de metionina en una dieta. Este tipo de situaciones altamente estresantes pueden ser e.g., por situaciones de sacrificio, destete, enjaulado y/o de transporte o cualquier otra situación que causa estrés.

15

Así, la dieta con metionina claramente parece tener un efecto calmante/anti-estrés sobre estos animales tales como, e.g., un cerdo, aves de corral o pescados sacrificados, cerdos de peso o cerdos de sacrificio, que están expuestos a exactamente el mismo nivel de manejo y el estrés de medición como los animales no tratados, tales como cerdos. Tal dieta antiestrés utilizaría cualquiera de las dosis sugeridas en este documento para la dieta de pre-sacrificio, i.e., en una dosis total de aproximadamente 0.5-1g, tal como e.g., 0.6-0.9g por 100g de alimento para el animal, e.g., un cerdo, aves de corral o pescado, e.g., 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g por cada 100 gramos de alimento como una dosis. Esto es cerca de 0.6-0.9% en el alimento. De esta cantidad, aproximadamente 0.25%, i.e., 0.25g/100g de alimento, representa la metionina de las proteínas en el alimento.

20

25

Por lo tanto, la adición de metionina extra en cantidades de cerca de 0.3-0.6g/100g o 3-6g/1000kg de alimento, i.e., 0.3-0.6% por encima de la dosis normal de alimentación afecta la terneza de la carne. Tal dieta anti-estrés de manera similar se alimenta en el día -30 hasta el día -1, i.e., 30 días antes hasta 1 día pre-sacrificio, es decir pre-sacrificio, e.g., -30, -29, -28, -27, -26, -25, -24, -23, -22, -21, -20, -19, -18, -17, -16, -15, -14, -13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, -1 día de pre-sacrificio, o -25 hasta -1 días pre-sacrificio, o -20 hasta -1 día pre-sacrificio o -14 hasta -1 día previo al sacrificio, en una

30

35

dosis de alrededor de 0.3-0.6% sobre la dosis recomendada de metionina/día/kg por peso corporal para tener un efecto sobre el estrés oxidativo mediante la reducción del estrés oxidativo.

- 5 La calidad de la carne se puede medir por el pH, color de la carne y características sensoriales, Tales como la oxidación de lípidos y proteínas que afectan la terneza de la carne.

10 La presente invención mide la calidad de la carne a partir de e.g., el color de la carne empacada así como el color de la carne por cocción, terneza y estado oxidativo almacenado bajo diferentes condiciones, tales como oxígeno bajo, vacío o alto oxígeno tal como en atmósferas modificadas, e.g., empaque con oxígeno modificado (MAP). En MAP el aire se elimina primero por vacío o inyección de gas y luego se reemplaza por otra mezcla de gases antes de sellar los materiales de barrera. En el empaque al vacío (VP) 15 se elimina el aire y no se reemplaza, antes de que el producto se selle en los materiales de barrera.

 Como se usa en el presente documento, el empaque en atmósfera modificada, MAP, se entiende que significa que la atmósfera que rodea el producto se retira y/o 20 reemplaza antes de sellar los materiales de barrera al vapor. Las diferentes opciones de MAP se contemplan y ejemplifican en este documento, tales como paquetes master, MAP con bajo oxígeno y con alto oxígeno. Muchas formas de MAP también son empaques casi listo, por lo que el corte y empaque de la carne pasa al sitio centralizado antes de su transporte a las tiendas al por menor. Este tipo de empaque casi listo, por supuesto, 25 también se beneficiaran de la presente invención y por lo tanto se contempla en este documento.

 Además, el MAP de oxígeno bajo puede ser empaque al vacío o MAP con un espacio de cabeza anóxica. El vacío es casi completamente libre de aire, mientras que 30 una mezcla de N₂ y CO₂ comúnmente se puede utilizar como espacio de cabeza anóxica en MAP de oxígeno bajo. El monóxido de carbono (CO), también se puede utilizar en algunos MAP de oxígeno bajo para evitar el pardeamiento de la carne, pero el CO es de uso ilegal en la Unión Europea.

El MAP de oxígeno alto tiene un espacio superior con alta concentración de O₂ en comparación con el aire atmosférico (aire atmosférico: ~78% N₂, 20.99% O₂, 0.94% argón, 0.03% CO₂). Las mezclas de gases en MAP con oxígeno alto suelen tener una mezcla de 80% O₂ y 20% CO₂, pero se pueden variar en torno a 25-90% O₂, y 15-80% CO₂.

5

Después de empacar no hay manipulación adicional del medio interno, a pesar de que la atmósfera de gas puede cambiar debido a cambios en el entorno y el producto.

El MAP también puede ser utilizado en empaques master, donde se colocan una serie de paquetes individuales en una barrera más grande de empaque con atmósfera modificada.

Además, los paquetes individuales pueden ser permeables al aire, pero el paquete master es MAP. Por lo tanto, cuando se abre el paquete master, un paquete individual con los materiales de empaque permeable al aire ya no se considera MAP. Los sistemas de bandeja en la manga son otra manera de combinar las ventajas del MAP y empaque permeable al aire. En lugar de un paquete master, el paquete individual tiene una envoltura de barrera extraíble, que se puede eliminar, cuando sea conveniente, dejando una envoltura permeable al aire subyacente.

20

La metionina a ser usada en los métodos, usos, dieta de pre-sacrificio de acuerdo con la invención se puede añadir en forma de L-metionina, tal como en la forma de fuentes sintéticas de metionina. Puede ser L-metionina en todas sus formas de sales, sus análogos (e.g., ácido 2-hidroxi-4 -metil tio butanóico o todas sus formas de sal), derivados (e.g., éster isopropílico del ácido 2-hidroxi-4-metil tio butanóico o cualquier otro éster), o mezclas de los mismos.

La dosis de metionina para alimentar al animal por ejemplo, mediante la adición a un alimento de dosis completa de una dieta pre-sacrificio o sola, debe estar en una cantidad que afecte la calidad de la carne, tal como la ternura y la estabilidad oxidativa de la carne de acuerdo con la invención. La metionina normalmente es parte de un alimento para animales, pero no en una cantidad la cocción.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, el animal se alimenta con la dieta de pre-sacrificio en una dosis que afecte la ternura de la carne de acuerdo con los métodos y

35

usos y regímenes de dosis propuestos en el presente documento y dentro del alcance de la invención.

La calidad de la carne luego se puede medir según la terneza, la textura y la estabilidad a la oxidación de los lípidos o proteínas de la carne. Los métodos se dan en el presente documento. Tanto la textura y la estabilidad a la oxidación afectan la terneza de la carne. El color también es un indicativo de la calidad de la carne. Uno de ellos es la base meramente visual de la carne fresca empacada, i.e., un comprador prefiere un color particular de la carne fresca empacada, normalmente el color rojo de la carne. La oxidación hace que la carne de un color más marrón y es por lo tanto menos atractivo para un comprador. Una dieta de pre-sacrificio que comprende metionina de acuerdo con la invención dará lugar a menor consumo de oxígeno en el paquete debido al mecanismo de protección de la metionina. De esta manera, la vida útil de la carne se incrementará y el color durante el almacenamiento se preservará.

15

Sin embargo, el color también es una indicación de la temperatura de cocción de la carne; refleja la coagulación de las proteínas por un cambio de color (pardeamiento). Normalmente, la carne cambia de color durante la cocción y la coagulación se refleja en un proceso de pardeamiento. La carne empacada en atmósfera modificada con alto contenido de oxígeno cambia de color a una temperatura inferior durante la cocción; i.e., alrededor de 20°C por debajo de la temperatura de la carne empacada en una atmósfera normal. Esto, por supuesto, en detrimento de la persona que prepara la carne y confía por el cambio de color, que la carne está lista para comer. En particular, el aspecto de matar las bacterias y desnaturalizar las sustancias tóxicas durante la cocción se pierde si la carne cambia de color para mostrar la coagulación en cerca de 52°C en lugar de cerca de la temperatura correcta de 72°C. Por lo tanto, el consumidor de la carne estará en riesgo de comer carne cruda con las bacterias aún vivas y las sustancias tóxicas aun trabajando aunque la carne parece cocinada al mirar el cambio de color.

30

Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención es que el pardeamiento de pre-maduración visto durante la cocción de la carne almacenada en el empaque con alto oxígeno también se evitará usando metionina pre-sacrificio, sola o en una dieta de pre-sacrificio.

Por lo tanto, en consecuencia, la dieta de pre-sacrificio que comprende metionina aumentará aún más la calidad de la carne mediante la mejora de la estabilidad de vida útil de la carne fresca, la mejora de la estabilidad del color de la carne fresca durante el almacenamiento, así como también evita el pardeamiento de pre-maduración durante la cocción.

El uso de metionina pre-sacrificio también afecta la vida útil de la carne. El uso de la metionina pre-sacrificio aumentará la estabilidad oxidativa de la carne, por lo tanto se consume menos oxígeno durante el almacenamiento. Y con menos consumo de oxígeno se puede almacenar la carne durante más tiempo con la misma cantidad de oxígeno. Lo mismo es cierto para el color de la carne empacada en atmósferas modificadas con oxígeno alto, donde la carne de los animales alimentados con metionina será más estable a la oxidación y por lo tanto preserva el color de la carne roja más tiempo con la misma cantidad de oxígeno.

15

La presente invención afecta la terneza de la carne, de tal manera que mejora la terneza. La oxidación de proteínas afecta negativamente la terneza de la carne.

La terneza se puede medir como "la dureza instrumental" utilizando el método de la fuerza de corte Warner- Bratzler (WBSF; Newton, ver e.g., Bouton, PE y Harris PV (1972) Acomparision of some objective methods used to asses meat tenderness. J. Food Sci. 37, 218-221). La oxidación de proteínas puede medirse como la pérdida de grupos tiol libres en proteínas (μM Tiol por mg de proteína) usando el reactivo de Ellman, ver, e.g. Lund and Baron (2010) Protein Oxidation in foods and food quality. En: Skibsted *et al* (ed): Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. Páginas 33-69, Woodhead Publishing Limited ISBN 978-184569-495-1.

La oxidación lipídica se puede medir como el incremento en las sustancias reactivas al ácido 2Tiobarbiturico (TBARS; Malondialdehído mg por kg de carne, ver e.g. Creed, P.G (2010) Chemical deterioration and physical instability in ready-to-eat meals and catered foods. En Skibsted *et al* (ed): Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. Páginas 608-661, Woodhead Publishing Limited ISBN 978-1-84569-495-1).

La invención se cree que es efectiva en el ganado de rumiantes, e.g., vaca, así como caballo, cordero, bisonte, cerdos y aves de corral, e.g., gallina, pollo, pavo, emú, avestruz, y además en pescado, e.g., salmón.

5 Por lo tanto, la dieta de pre-sacrificio que comprende la administración de metionina, así como sus métodos y usos para mejorar la terneza de acuerdo con la invención se puede practicar en cualquier animal, i.e., animales no humanos, e.g., bovinos, e.g., vacas, animales porcinos, e.g., cerdos, animales equinos, e.g., caballos, animales caprinos, e.g., cabras, animales ovinos, e.g., ovejas, aves de corral, e.g., gallina,
10 pollo, pavo, emú, avestruces o pescado.

La metionina se administra preferiblemente o alimenta por vía oral en e.g., un alimento por sí solo o como complemento de un alimento de engorde típico, incluyendo forrajes, tales como heno o ensilaje y concentrados tales como granos, e.g., maíz,
15 cebada, sorgo, centeno, avena y trigo, y mezclas de los mismos, junto con e.g., melaza y otros suplementos y aditivos para ganado.

Sin embargo, la metionina se puede administrar también por otras vías, tal como por inyecciones intraperitoneal, intravenosa o subcutáneas, aplicación transdérmica, o por
20 dosimetría acuosa.

Para la administración oral puede ser en forma de polvo, granos, gránulos, una pequeña esfera, o cualquier otra bola pequeña, sólida o empacada densamente, masa o tableta.
25

En otra forma de implementación de la invención, la administración de la metionina puede hacerse a través de una administración en el agua para beber.

En consecuencia, un objeto de la presente invención es el uso de la metionina, en
30 su forma natural o sintética, sus análogos, derivados, o mezclas de los mismos para mejorar la terneza de la carne, sola o en una dieta de pre-sacrificio. La metionina, en su forma natural o sintética, sus análogos, derivados o mezclas de los mismos, está disponible comercialmente de varias fuentes. La terneza puede ser evaluada como la textura o WBSF utilizada como una medida de la dureza instrumental (N). El uso de

metionina mejorará la calidad de la carne como de ternera y hace que la carne más tierna. La metionina se alimenta como una dieta pre-sacrificio.

5 La carne afectada puede ser tanto carne fresca o carne congelada, y cuando la carne fresca está empacada o envasada al vacío en una atmósfera modificada con alto contenido de oxígeno.

10 En una implementación, la metionina, suministrada como una dieta pre-sacrificio afecta la ternera de la carne fresca. La carne puede, como se describe en el presente documento, ser de cualquier animal no humano o carne de mamíferos. e.g., puede ser carne de cerdo, ganado, carne de ave, e.g., la carne de aves de corral o carne de pescado. También puede ser cualquier carne seleccionada del grupo que consiste de carne de cerdo, carne de vaca, gallina, pollo, pavo.

15 La metionina puede, como se describe en otra parte en el presente documento, ser cualquier metionina, natural o sintética, sus análogos (e.g., ácido 2-hidroxi-4 -metil Tio butanóico o todas sus formas de sal), derivados (e.g. éster isopropílico del ácido 2-hidroxi-4-metil Tio butanóico o cualquier otro éster), o mezclas de los mismos, o una formulación de suplementos de metionina. Puede ser L- metionina en todas sus formas de sal. Por ejemplo, puede ser DLM (i.e., DL-metionina) o HMTBA (i.e., ácido 2-hidroxi-4-(metiltio) butanóico).

25 Dicha carne se puede almacenar bajo condiciones con alto oxígeno o al vacío, o cualquier empaque en atmósfera modificada. Las diferentes opciones de MAP se contemplan en este documento y se ejemplifican, e.g., paquetes master, bajo oxígeno y MAP con alto oxígeno, e.g., como se ejemplifica adicionalmente en este documento.

30 Según lo descrito anteriormente, el animal se alimenta con la dieta de pre-sacrificio en una dosis efectiva para la ternera de la carne de acuerdo con los métodos y usos y los regímenes de dosis dados en el presente documento y dentro del alcance de la invención.

35 La cantidad de consumo de alimento varía de especie a especie. Un cerdo que crece hasta unos 100 kg de peso corporal, por ejemplo, come alrededor de 3-5%, como e.g., 4% de su peso corporal por día, mientras que un pollo de engorde, e.g., un pollo puede comer hasta 10% de su peso corporal por día. Por lo tanto, un animal comerá

alrededor de 1-10% de su peso corporal por día en el consumo de alimento. Por lo tanto, la dosis de metionina por kg de peso corporal y por día se define y se ajusta en la concentración para adaptarse a la ingesta diaria de alimento incluido como un alimento de la dieta total pre-sacrificio con metionina.

5

Ejemplos de este tipo de dietas pre-sacrificio, cuando las dietas completas, que afectan a la calidad de la carne, como la terneza y la estabilidad oxidativa de la vida útil y el color de la carne se dan a continuación.

10

La metionina puede, por supuesto, darse separadamente, y no en la ración diaria de la dieta completa, administrando la misma dosis de metionina. Sin embargo, esto necesitara mano de obra adicional para administrar al animal en adición al alimento de la dieta diaria y es por lo tanto menos deseable. Sin embargo, dará el mismo efecto en la terneza de la carne.

15

La metionina de acuerdo con la invención se alimenta en una dosis total de aproximadamente 0.5-1g, tal como e.g., 0.6-0.9g por 100g de alimento para el animal, e.g., un cerdo, las aves de corral o pescado.

20

Ejemplo de una dieta completa estándar para cerdos se da aquí más adelante, excluyendo la metionina extra de acuerdo con la invención.

Contenido: trigo 54,9%; Cebada 16,9%; salvado de trigo 10,0%; avena 9,5%; soya 4,4%; extracto de colza 1,5%; carbonato de calcio 1,5%; sal común 0,34%.

25

Contenido Nutritivo

30

Proteína bruta 12,5%; Grasa bruta 2.8%; Cenizas 4,6%; Fibra bruta 5.0%; Ca 0,6%; P 0,4%; K 0,6%; N 2,0%; Na 0.15%; Metionina 2,49 (a partir de proteínas por 1000g de alimento); Lisina 7,9g por 1000g de alimento); de los cuales el análogo hidroxí es 0,5g; Energy acc. Swedish Board of Agriculture, (Jordbruksverket), SJV, 12.2 MJ; Energy acc. to Swedish University of Agricultural Science, (Sveriges lantbruksuniversitet), SLU, NEvax 9.3 MJ; Energy acc. to Swedish University of Agricultural Science, (Sveriges lantbruksuniversitet), SLU, NEsugg 9.5 MJ.

35

Diferentes tipos de aditivos y ejemplo de cantidades:

Selenio (selenito de sodio) 0,4 mg; Cobre (sulfato de cobre) 15 mg; Vitamina E 60 mg; Vitamina D3 400IE; Vitamina A 4000IE; L-lisina tekniskt rent; L-treonina tekniskt rent; 5 Fytas monomersyrhalt EC 3.1.3.26 415 FTU de fósforo total, P. Una dosis de metionina adicional de acuerdo con la invención se añade entonces como 0.3-0.6% sobre la dosis de metionina/día/kg de peso corporal (bwt) recomendada o alrededor de 12-24g de metionina extra adicionada/1000g de alimento.

10 La dosis por kg de peso del animal por lo tanto se relaciona a la cantidad de alimento que el animal come, si no cambia la concentración de metionina, que es la cantidad de metionina/1000g de ración de alimento. Ambas opciones están, por supuesto, disponibles en los métodos, los usos y las dietas pre-sacrificio de acuerdo con la invención.

15

Por ejemplo, un cerdo de 100 kg que come 2-6% de su peso corporal (bwt), por ejemplo, que come 4% de su peso corporal por día de la dieta pre-sacrificio, según la invención, i.e., 4 kg de la dieta pre-sacrificio si es el 4%. El cerdo tendrá una dosis total de 24g a 36g de metionina por día. De esta cantidad, 12-24g/1000g de alimento, i.e., 0.3 a 20 0.6% del peso total del alimento, se añade como metionina extra, por ejemplo, L-metionina, al alimento para tener un efecto sobre la calidad de la carne, e.g., terneza y estabilidad oxidativa de color y estabilidad de vida útil de la carne.

La dosis de metionina pre-sacrificio para otras especies se calcula a partir de la 25 cantidad del alimento consumido diariamente enriquecido con 0.3 a 0.6% de metionina extra sobre la dosis de metionina/día/kg bwt recomendada para tener una efecto sobre la calidad de la carne, tal como la terneza y la estabilidad oxidativa de color y la vida útil de la carne fresca.

30 Por lo tanto la metionina es alimentada como 0.1 a 1g por kg de peso corporal por día del total de la metionina, i.e., tanto la metionina en el alimento a partir de las proteínas, así como también la metionina extra de 0.3-0.6% sobre las dosis de metionina/día/kg bwt recomendadas, tales como 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.90, 0.95 o incluso 1g por kg de peso corporal por día antes del sacrificio 35 de la ingesta total de metionina.

Además, la metionina se alimenta en el día -30 a -1, i.e., 30 días antes a 1 día antes del sacrificio, es decir, e.g., -30, -29, -28, -27, -26, -25, -24, -23, -22, -21, -20, -19, -18, -17, -16, -15, -14, -13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, hasta -1 día pre-sacrificio, o -25 hasta -1 días pre-sacrificio, o -20 hasta -1 días pre-sacrificio o -14 hasta -1 día pre-sacrificio, en una dosis de alrededor de 0.3-0.6% sobre la dosis de metionina/día/kg bwt recomendada para tener un efecto sobre la calidad de la carne, como la terneza y la estabilidad a la oxidación de color y vida útil de la carne fresca empacada al vacío o en cualquier atmósfera modificada tal como atmósfera modificada con alto oxígeno.

10

Por lo tanto, la metionina se utiliza para mejorar la terneza de la carne y un objetivo adicional es la metionina para uso en el mejoramiento de la calidad de la carne, e.g., terneza de la carne, utilizando la metionina como se describe en este documento en los métodos, los usos y las dietas pre-sacrificio.

15

También se incluye el uso de la metionina para la preparación de una dieta pre-sacrificio para mejorar la calidad de la carne y el uso de la metionina para la preparación de un medicamento o alimento animal para reducir el estrés oxidativo en un animal.

20

Por consiguiente, otro de los objetos de la presente invención es un método para mejorar la terneza de la carne de mamíferos no humanos o de las especies de aves, dicho método comprende la etapa de administrar pre-sacrificio metionina en una cantidad efectiva a un mamífero no humano o especies aviares. Ejemplos de cantidades efectivas se dan en el presente documento, e.g., 0.1-1g por kg de peso corporal por día, tales como 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g por kg de peso corporal por día pre-sacrificio.

25

Además, la metionina se alimenta en el día -30 a -1, i.e., 30 días antes a 1 día antes del sacrificio es decir pre-sacrificio.

30

Por ejemplo, en los siguientes ejemplos dados en este documento se prueba una estrategia de suplementación de metionina de modo sencillo y directo.

Para probar la estabilidad oxidativa de los lomos de cerdo se puede hacer de la siguiente manera.

35

Un aumento de la estabilidad a la oxidación debido a las estrategias de suplementación con metionina en la alimentación pre-sacrificio mejorará la terneza de la carne, tal como e.g., lomos de cerdo.

5 Uno puede optar por un número adecuado de animales, como los cerdos, para realizar un estudio con sus grupos de control, por ejemplo, veintidós cerdos asignados aleatoriamente a uno de los tres grupos de alimentación (n=7). El grupo de control puede recibir una dieta estandarizada de engorde solamente. Los grupos de la prueba con la
10 dieta pre-sacrificio son alimentados con metionina en su forma natural o sintética, e.g., L-metionina, su análogos, derivados, o mezclas de los mismos, para mejorar la calidad de la carne, aquí evaluada como la terneza de la carne. Ejemplos de L-metionina son DLM (DL-metionina) y HMTBA (DL ácido-2-hidroxi-4-metiltio butanólico). Los grupos recibirán la
15 dieta de engorde estandarizado y un suplemento alto en metionina, e.g., ya sea DLM (i.e., DL-metionina) o HMTBA (i.e., ácido 2-hidroxi-4-(metiltio) butanólico), durante el período de acabado antes del sacrificio- de 1 a 30 días. Para probar diferentes condiciones de
almacenamiento, e.g., al vacío y con alto oxígeno, y luego analizar el efecto de la metionina alimentada pre-sacrificio en la terneza de la carne, la carne se empaca bajo las
diferentes condiciones especificadas. Si, por ejemplo, se analiza cerdo, las chuletas de cerdo ya sean empacadas al vacío o empacadas en atmósferas modificadas (MA; 80%
20 O₂) y almacenadas por 7 días adicionales a 2°C 48h post mortem. Por ejemplo, chuletas de cerdo de 3 cm de grueso se pueden empacar bien sea al vacío o empacar en
atmósfera modificada (MA; 80% O₂) y almacenados por 7 días adicionales a 2°C antes de analizar la calidad de la carne mediante la evaluación de, e.g., la terneza de la carne.

25 La terneza puede entonces ser analizada como dureza instrumental usando el método de la fuerza de corte Warner-Bratzler (WBSF; Newton). La oxidación de proteínas se puede medir como la pérdida de grupos tiol libres en proteínas (μM tiol por mg de proteína) utilizando el reactivo de Ellman. La oxidación de lípidos se puede medir como el
aumento en las sustancias reactivas al ácido 2 Tiobarbiturico (TBARS; mg de
30 malondialdehído por kg de carne).

Los experimentos, cuyos resultados se muestran en este documento, dejan ver que ambas estrategias de suplementación con metionina lograron carne marcadamente
más tierna, i.e., los valores WBSF son menores cuando se mide, que los de la dieta de
35 control cuando se almacena al vacío. Este también es el caso de las carnes almacenadas

bajo atmosfera modificada, i.e., la carne MAP, sin embargo, la diferencia en los valores WBSF entre los grupos DLM y HMTBA fueron más grandes, lo que indica un mejor ablandamiento de las muestras DLM durante el almacenamiento en condiciones oxidativas.

5

El método de acuerdo con la invención puede ser un método en el que la administración a dicho mamífero no humano o especies de aves se realiza por vía oral, o en cualquier manera adicional ejemplificada en este documento, como por otras vías, tal como inyecciones intraperitoneales, intravenosas o subcutáneas, aplicación transdérmica o por dosimetría acuosa. Para la administración oral puede ser en polvo, granos, gránulos, una pequeña esfera, o cualquier otra bola pequeña, sólida o empacada densamente, masa o tableta. La metionina se puede administrar sola, o como un suplemento a un alimento de engorde típico, incluyendo forrajes, tales como heno o ensilaje y concentrados tales como granos, e.g., maíz, cebada, sorgo, centeno, avena y trigo, y mezclas de los mismos, junto con e.g., melaza y otros suplementos y aditivos para ganado.

Además, la administración de la metionina de acuerdo con la invención se puede hacer en el día -30 a -1 pre-sacrificio, como se ejemplifica aquí con más detalle. Además, la metionina se puede administrar en una dosis de 0.1-1g por kg de peso corporal por día pre-sacrificio, tal como 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g por kg de peso corporal por día pre-sacrificio, o cualquier dosis por día que corresponde a cerca de 0.3-0.6% en dosis de metionina/día/kg bwt recomendada para tener un efecto sobre la calidad de la carne tal como la terneza y la estabilidad a la oxidación de color y la vida útil de la carne fresca.

Un objetivo adicional de la invención es por lo tanto proporcionar a un animal, e.g., mamífero no humano o ave, una dieta pre-sacrificio que contiene metionina y en el que la metionina se alimenta en el día -30X hasta -1Xx pre-sacrificio en una dosis de 0.2-1g por kg de peso corporal por día pre-sacrificio, como 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 o incluso 1g por kg de peso corporal por día pre-sacrificio, o cualquier dosis por día correspondiente a cerca de 0.3-0.6% sobre la dosis de metionina/día/kg bwt recomendada para tener una efecto sobre la calidad de carne, como la terneza y la estabilidad oxidativa de color y la vida útil de la carne fresca. La dieta pre-sacrificio puede comprender, además, una alimento adicional para los

mamíferos no humanos o especies aviares. Tal alimento se ejemplifica además en este documento y puede ser, e.g. forrajes, tales como heno o ensilaje y concentrados tales como granos, e.g. maíz, cebada, sorgo, centeno, avena y trigo, y mezclas de los mismos junto con, e.g., melaza y otros suplementos y aditivos para el ganado.

5

Otro de los objetivos de la presente invención es proporcionar carne de un animal sacrificado, dicho animal se alimenta con una dieta pre-sacrificio que comprende metionina de acuerdo con la invención, e.g., la dieta pre-sacrificio, los métodos y usos descritos en el presente documento en todas sus implementaciones.

10

Toda vía, un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un producto que comprende carne, por lo menos parcialmente de un animal sacrificado, dicho animal que se alimenta con una dieta pre-sacrificio que comprende metionina de acuerdo con la invención e.g. la dieta pre-sacrificio, los métodos y usos descritos en el presente documento en toda sus formas de implementación.

15

La administración de la metionina, sus análogos, derivados, o mezclas de los mismos, en el horario de dosificación pre-sacrificio de acuerdo con la invención y como se describe en este documento en todas sus formas de implementación ha demostrado mejorar la terniza de la carne fresca, empacada al vacío o en una atmósfera modificada (MAP).

20

Por lo tanto, la presente invención en todos sus objetivos e implementaciones afecta la terniza de la carne animal no humana. Esto se logra a través de la administración de metionina, sus análogos, derivados, o mezclas de los mismos, (i.e., la metionina puede estar en la forma de L-metionina, tal como en la forma de fuentes de metionina sintética, en todas sus formas de sal, sus análogos (e.g. ácido 2-hidroxi-4- – metil tio butanóico o todas sus formas de sal), derivados (e.g., éster isopropílico del ácido 2-hidroxi-4–Metil Tio Butanóico o cualquier otro éster), o mezclas de los mismos), al ganado en una cantidad efectiva para mejorar la terniza de la carne y sin ser tóxica para el ganado antes de la cosecha del animal.

25

30

EJEMPLOS

El Ejemplo 1 muestra la relación entre las estrategias de suplementación con metionina y la estabilidad oxidativa de las chuletas de cerdo. Los resultados muestran que las estrategias de suplementación con metionina aumentan la estabilidad a la oxidación y mejoran la terniza de los lomos de cerdo.

5

Ejemplo 1

En el Ejemplo 1 veintiún cerdos fueron asignados aleatoriamente a uno de tres grupos de alimentación (n=7). El grupo de control recibió sólo una dieta estandarizada. Los grupos DLM y HMTBA recibieron la dieta estándar, más un suplemento alto en metionina (ya sea DLM (i.e., DL-metionina) o HMTBA (i.e., ácido 2-hidroxi-4-(metiltio) butanóico)) durante el periodo de acabado. A las 48h post mortem, chuletas de cerdo de 3 cm de grueso se empacaron al vacío o se sellaron en atmosfera modificada (MA; 80% O₂) y se almacenaron por 7 días adicionales a 2°C. Se midió la dureza instrumental utilizando el método de la fuerza de corte Warner- Bratzler (WBSF; Newton). La oxidación de la proteína se midió como la pérdida de los grupos tiol libres en proteínas (nmol de tiol por mg de proteína) usando el reactivo de Ellman. La oxidación de los lípidos se midió como el aumento en las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS mg; malondialdehído por kg de carne).

20

La estrategia de suplementación DLM tendía a disminuir la dureza instrumental en ambos ambientes no oxidativos (al vacío) y oxidativos (MAP).

El DLM mostró el más alto nivel de tiol libre en el medio ambiente no oxidante y el nivel más bajo de tiol libre en el entorno oxidativo. Una significativa disminución en el nivel de tiol libre sólo se observó para este grupo. La estrategia de suplementación DLM parece poseer la capacidad de mejorar la terniza de chuletas de cerdo almacenadas en condiciones oxidantes en el mismo nivel que las chuletas de cerdo del grupo de control almacenado en condiciones al vacío.

30

La dieta parece no tener ningún efecto sobre la oxidación de los lípidos en la carne. La falta de una dieta efectiva puede ser causada por un deterioro de la confiabilidad del método de medición del nivel de TBARS. Los niveles de TBARS estuvieron en el mismo nivel de las chuletas de cerdo empacadas al vacío y fueron más bajos que los niveles de TBARS vistos durante el almacenamiento MA (atmósfera

35

modificada). Durante el almacenamiento MA, los dos tratamientos con metionina tuvieron un nivel similar TBARS, que fue notablemente más bajo que el nivel de las muestras de control.

5 **Material y Métodos del Ejemplo 1**

Animales y estrategias de alimentación

10 Veintiún cerdos de sacrificio ([Yorkshire x Landrace sueco] x Hampshire) fueron criados con una dieta comercial. Los cerdos fueron asignados aleatoriamente a uno de tres grupos (n=7). Los grupos representaron tres estrategias de alimentación, a saber, un grupo de control que recibió una dieta estandarizada que contiene 0.27% de metionina total, y ambos grupos el DLM y HMTBA, recibieron la misma dieta que el grupo de control durante el período de alimentación, excepto por el hecho de que fueron alimentados con
15 un nivel más alto de metionina (1.1% de metionina total) durante el periodo de siete días de acabado pre-sacrificio. Los suplementos se dieron en dos formas, como DL- metionina (DLM) o ácido DL-2-hidroxi-4-metiltiobutanoico (HMTBA). Los cerdos fueron alimentados dos veces al día con 2% de su peso corporal con las respectivas dietas y tenían acceso libre al agua.

20

Procedimientos de sacrificio y de muestreo

El sacrificio se realizó en una casa comercial de sacrificio en Suecia después de un tiempo de 5 horas en reposo. A los 45 minutos post mortem, se midió el pH (Knick
25 Portamess 751 pH-metro con un electrodo de vidrio Ingold LOT, Tech Instrumentering ApS, Dinamarca) y la temperatura (termómetro digital, Weber, Stephen nórdico, Dinamarca en el m. Longissimus dorsi (LD) a nivel de la décima costilla a las 48 horas *post-mortem*, toda la parte posterior de la res muerta fue disecada y transportada en condiciones controladas a la Universidad de Copenhague para otras mediciones.

30

Empaque y envejecimiento

Las chuletas de cerdo se cortaron perpendicularmente al eje longitudinal de cada músculo LD. Chuletas de cerdo de 3 cm de grueso se cortaron a partir de cada LD. Tres
35 se empacaron al vacío y tres se empacaron en atmósfera modificada con alto oxígeno.

Las chuletas se colocaron en bandejas de plástico (blanco M71-43A/PS; 195 x 144 x 43 mm de dimensión; Faerch Plast, Dinamarca) y se colocaron en bolsas al vacío (EM-628862; tasa de transmisión de $O_2 = 40\text{-}50 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}/\text{bar}$, tasa de transmisión $CO_2 = 150 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}/\text{bar}$, la tasa de transmisión de vapor de agua = $2,6 \text{ g}/\text{m}^2/24\text{h}$; LogiCon Nordic A/S, Dinamarca). El aire del ambiente se eliminó de todas las bolsas al vacío usando una máquina al vacío (tipo, fabricante, país). Las bolsas destinadas al almacenamiento al vacío se llenaron primero con una mezcla de gases (80% oxígeno/20% dióxido de carbono) antes de ser selladas por completo, mientras que las bolsas destinadas para el MAP solo fueron selladas parcialmente. Este procedimiento dio lugar a una relación espacio de cabeza-a-carne en las muestras MAP de aproximadamente 8:1. Las chuletas se exponen a plena luz (LUX) durante 7 días a 2°C (hasta los 9 días post mortem). La composición del gas se comprobó (CheckMate 9900, PBI Dansensor, Dinamarca) antes de empacar y de nuevo antes de abrir, al final del período de la exposición simulada con el fin de verificar fugas. El ambiente enriquecido con oxígeno estaba bien cuidado (83,4%) durante todo el período de exposición para todos los paquetes MA.

Pérdidas por almacenamiento y pérdidas por cocción

La pérdida de almacenamiento se determinó como el porcentaje de pérdida de peso al final del período de exposición (9 días post mortem) en relación con el peso en el día del empacado (dos días post mortem). La pérdida por cocción se determinó como el porcentaje de pérdida de peso entre las chuletas de cerdo antes y después de la cocción. Los resultados se dan como el promedio de las tres chuletas de cerdo en cada paquete de carne.

Color de la carne (CIE $L^* a^* b^*$)

El color de la carne instrumental se midió con un Minolta Chroma Meter (CR-300; D_{65} y ángulo del observador 2° , 8 mm de diámetro del área de medición; Minolta, Japón). Antes del empacar, como se describió previamente, se llevaron a cabo registros del color de las chuletas de cerdo. Al final del período de exposición, las chuletas de cerdo se dejaron florecer por lo menos durante 30 minutos a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ una vez que habían sido retiradas de las bolsas al vacío. Las mediciones de color siguieron la convención de color CIE, donde las tres salidas fundamentales son L^* , a^* y b^* . L^* es la luminosidad en un

escala de 0 (toda la luz absorbida; negro) a 100 (toda la luz reflejada; blanco); a^* abarca desde +60 (rojo) a -60 (verde) y b^* abarca de +60 (amarillo) a -60 (azul). El índice de saturación, también conocido como croma, se calculó como la raíz cuadrada de $a^{*2} + b^{*2}$ (MacDougall, 1977). Se hicieron tres registros en cada costilla de cerdo, y el valor promedio se usó para el análisis estadístico.

Fuerza de corte Warner Bratzler (WBSF)

La dureza instrumental se midió utilizando el método de la fuerza de corte Warner-Bratzler (WBSF). En resumen, al final del período de exposición las muestras frescas se calentaron en un baño de agua en un horno (tipo, fabricante, país). El aumento de la temperatura se controló para una muestra y a las muestras restantes se les dio el tiempo para alcanzar una temperatura interna de 75°C, más de cinco minutos.

Las muestras se enfriaron antes de extraer núcleos de 1 cm x 1 cm x 2,5 cm para el análisis de la fuerza de corte. Para cada animal, se midieron 8 núcleos y la carga máxima media (Newton) se utilizó para el análisis adicional. En el caso que cualquiera de las muestras tuviera una carga máxima en exceso de dos desviaciones estándar de la media, entonces se consideraron como valores atípicos y se sacaron del cálculo.

Tioles de proteína libre

La oxidación de la proteína se midió como la pérdida de grupos tiol libres en las proteínas, por lo tanto, los valores altos indican una baja oxidación y viceversa. En resumen, las muestras congeladas de carne de cerdo fueron parcialmente descongeladas a temperatura de almacenamiento en frío por 30 minutos. La grasa y el tejido conectivo se retiraron y 1.0g de carne magra se homogeneizó con 25 ml de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 5.0% en buffer de Tris (tris (hidroxiamino) metano), 0.10M, pH 8.0 utilizando un Ultra Turrax (Ultra Turrax T-25, Janke y Kunkel IKA- Labortechnik, Alemania). Los homogeneizados se colocaron en un baño de agua a 80°C durante 30 minutos, y posteriormente se enfriaron y se filtraron. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente (Helios Omega Single Beam UV-VIS, Fisher Scientific Biotech Line, Dinamarca) a una longitud de onda de 280 nm utilizando una curva estándar preparada a partir de albúmina sérica de bobino (BSA). La concentración de tiol se determinó en un lector de placa de ELISA (SLT Spectra Rainbow, FO 39046,

Labstruments SLT, Austria) después de la derivación mediante el reactivo de Ellman; 5,5'-Ditiobis- (ácido 2-nitrobenzoico = DTNB) (Ellman, 1959) en buffer de Tris 0.10 M (pH 8.0). El filtrado (25 µl), el buffer de Tris (100 µl) y el DTNB (25 µl) se agregaron a los pozos de una placa microtituladora de pozo. Se midió la absorbancia a 410 nm antes de la adición del DTNB ($ABS_{410_{meat}}$) y después de la reacción con DTNB ($ABS_{410_{meat+DTNB}}$). De la misma manera, también se midió la absorbancia a 410nm de una solución blanco (25 µl 5% SDS disueltos en buffer Tris 100 mM y 100 µl 0.10M de buffer Tris). Después de la adición del DTNB, la placa microtituladora se almacenó en la oscuridad y se midió la absorbancia exactamente 30 minutos después. La absorbancia correspondiente a la concentración de Tiol en la muestra fue $CorrABS_{410} = ABS_{410_{meat+DTNB}} - ABS_{410_{meat}} - ABS_{410_{blanco}}$. La concentración de tiol se calcula con base en una curva estándar con 7 puntos que va desde 2 a 150 µg/ml de glutatión preparado a partir de glutatión diluido en 5.0% de SDS en buffer de Tris 0.1 M, pH 8.0. La concentración de los grupos tiol libres se determinó como nmol de Tiol por mg de proteína. Se hicieron homogenizados por duplicado para cada muestra de carne y cada homogenizado se midió por triplicado, y el valor promedio se utilizó para el análisis estadístico.

Sustancias reactivas al ácido Tiobarbiturico (TBARS)

La oxidación de lípidos se midió como las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) y se expresa como mg de malondialdehído por kg de carne. La oxidación de lípidos se evaluó usando ácido 2-tiobarbitúrico (TBA; 4,6- dihidroxi-2-mercapto-pirimidina) como se describe por (Vyncke, 1970; Vyncke, 1975) con modificaciones de acuerdo con Sørensen & Jørgensen, 1995). En resumen, 5.0g de carne se homogenizaron en 15 ml de TCA al 7.5% con propil galato al 0.10% y ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) al 0.10% utilizando un Ultra Turrax (Ultra Turrax T-25, Janke y Kunkel IKA-Labortechnik, Alemania) por 45 segundos a 13.500 rpm y se filtró. Se mezclaron 5.0 ml del filtrado con 5.0 ml de ácido tiobarbitúrico 0.020M (TBA) y se incubó a 100°C en baño de agua por 40 minutos. La absorbancia se midió a 532 nm y 600 nm a temperatura ambiente. Los resultados de TBARS se calcularon utilizando una curva estándar preparada a partir de malondialdehídobis-(dietilacetal) (TEP). Los valores promedio de dos determinaciones independientes se utilizaron para el análisis estadístico.

Extracción de lípidos

35

La cantidad de lípidos extraíbles se utilizó para el cálculo del contenido total de lípidos de las muestras de carne fresca y se expresó como un porcentaje. Una muestra de carne (10g) se homogeneizó en 100 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v) usando un Ultra Turrax (Ultra Turrax T-25, Janke y Kunkel IKA- Labortechnik, Alemania) durante 1 minuto a 13.500 rpm. A este homogeneizado se añadió 25 ml de una solución de CaCl_2 1.0 nM y el material se homogenizó una vez más antes de la centrifugación (MSE Mistral 2000, Inglaterra) durante 20 minutos a 1000 rpm. La fase de cloroformo se retiró y el procedimiento de extracción se repitió. La fase de cloroformo que contiene los lípidos extraídos se secó por evaporación al vacío (Büchi RE 11, Büchi Laboratoriums-Technik AG, Suiza). Por último, se agregaron 2 x 2 ml de cloroformo/metanol y 2.0 de CaCl_2 a la muestra seca y luego se mezclaron (Vortex-mixer VF2, Janke y Kunkel IKA_Labortechnik, Alemania) y se centrifugó por 20 minutos a 2500 rpm. La fase lipídica se retiró, se secó por evaporación al vacío y se pesó. El porcentaje de grasa intramuscular se calculó a partir del peso de los lípidos totales obtenidos después de la extracción con solvente y el peso de la muestra de carne.

Análisis estadístico

Los datos de pérdida por almacenamiento, pérdida por cocción, color, dureza y oxidación de proteína se analizaron utilizando un diseño de parcelas divididas en ANOVA con efecto aleatorio de animales ID. Para los efectos fijos se adoptó un diseño factorial completo (dieta, empaque).

Los mínimos cuadrados para todas las características de interés se separaron utilizando la menor diferencia significativa (test F, $P < 0.05$). La validación del modelo se realizó para cada modelo para asegurar el cumplimiento de los supuestos del modelo. Todas las combinaciones promedio-LS se ajustaron para múltiples comparaciones utilizando el test Tukey. Los datos de la oxidación lipídica se analizaron usando una muestra pareada test-t. La validación del modelo se llevó a cabo para asegurar el cumplimiento de los supuestos del modelo.

Resultados Ejemplo 1

Pérdidas por almacenamiento y cocción

Los datos sobre las pérdidas de almacenamiento y cocción se determinaron como la reducción de peso (g) antes y después del período de exposición, así como antes y después de la cocción. Los mínimos cuadrados promedio de los efectos principales se muestran en la Tabla 1. Mientras que los empaques y dieta mostraron una ligera
5 tendencia hacia una interacción ($P = 0.098$) con respecto a la pérdida por almacenamiento, la pérdida por almacenamiento fue significativamente afectada por las condiciones de empaque ($P<0.0001$) en la exposición al vacío dando lugar a una menor pérdida por almacenamiento que por exposición MAP. Sin embargo, la pérdida por almacenamiento de las muestras HMTBA almacenadas bajo vacío no fueron
10 significativamente diferentes de las almacenadas en atmósfera con alto oxígeno ($P=0.58$). No hubo efecto global de la dieta ($P = 0.14$).

La pérdida por cocción no se vio afectada por una interacción entre el empaque y la dieta ($P = 0.54$) o la dieta sola ($P = 0.68$). Sin embargo, no hubo un efecto general de
15 condiciones de empaque ($P = 0.0011$), los cuales no se reflejan en la Tabla 1.

Numéricamente, la exposición a vacío dio lugar a unas pérdidas por cocción más altas que la exhibición en MAP.

20 Tabla 1: Datos de pérdidas por almacenamiento y cocción de cerdos sacrificados alimentados con una dieta estándar con (DLM y HMTBA) o sin (control) suplementación con metionina. Los datos se expresan como la reducción en peso (g) antes y después del período de exposición y antes y después de la cocción. Los resultados se presentan como el promedio de los mínimos cuadrado $\pm$ el error estándar del promedio.

25

	Vacío	MAP ¹
Pérdida por almacenamiento		
Control	4.94 $\pm$ 0.83 ^B	9.64 $\pm$ 0.83 ^A
HMTBA	4.63 $\pm$ 0.83 ^B	6.37 $\pm$ 0.83 ^{A,B}
30 DLM	4.56 $\pm$ 0.89 ^B	9.34 $\pm$ 0.83 ^A
Pérdida por Cocción		
Control	23.34 $\pm$ 1.73 ^A	17.51 $\pm$ 1.73 ^A
HMTBA	21.35 $\pm$ 1.73 ^A	18.49 $\pm$ 1.73 ^A
DLM	21.52 $\pm$ 1.86 ^A	15.82 $\pm$ 1.86 ^A

¹ Empaque con atmósfera modificada (80% O₂ + 20% CO₂).
^A, BLS-promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.,
 BLS-promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

5 **Color de la carne**

Las características de color de las muestras de carne se determinaron utilizando el sistema de color CIE L* a* b*. El promedio de mínimos cuadrados de los efectos principales se muestran en la Tabla 2. El empaque y la dieta interactúan (*P* = 0,037) con respecto a la reflexión de la luz. La reflexión de la luz a los dos días *post mortem* (inicial) no fue significativamente diferente de la reflexión de la luz después de siete días de almacenamiento refrigerado (vacío y MAP) para las muestras de control y HMTBA. Excepto en las condiciones, durante el envejecimiento a vacío (un ambiente no oxidante). La dieta de control mostró una reflexión de luz inicial numéricamente más baja que la de las DLM y HMTBA suplementadas con metionina. Durante el envejecimiento a vacío, la reflexión de la luz aumentó en los grupos de control y DLM pero disminuyó en el grupo HMTBA. Durante el almacenamiento en frío en atmósfera modificada con alto oxígeno, la reflexión de la luz aumentó para todos los tres grupos.

20 Tabla 2: Propiedades del color de la carne procedente de cerdos para sacrificio alimentados con una dieta estándar con (DLM y HMTBA) o sin suplementos con metionina (Control). Los resultados se informan como el promedio de mínimos cuadrados ± el error estándar del promedio.

Inicial ¹	Vacío ¹	MAP ¹
(2 días post Mortem)	(9 días post Mortem)	(9 días post mortem)

Reflexion de la luz (L*)

Control	54.64 ± 1.25 ^{A,B}	57.80 ± 1.44 ^{A,B}	57.78 ± 1.25 ^{A,B}
HMTBA	56.89 ± 1.25 ^{A,B}	55.34 ± 1.25 ^{A,B}	58.73 ± 1.30 ^{A,B}
DLM	55.75 ± 1.25 ^B	57.83 ± 1.25 ^{A,B}	59.19 ± 1.30 ^A

Enrojecimiento (a*)

Control	7.56 ± 0.58 ^{A,B,C,D}	8.51 ± 0.63 ^{A,B,C,D}	8.09 ± 0.58 ^{A,B,C,D}
HMTBA	7.58 ± 0.58 ^{B,D}	8.86 ± 0.58 ^{A,C}	7.43 ± 0.59 ^{B,D}
DLM	6.69 ± 0.58 ^{C,D}	8.21 ± 0.58 ^{A,B}	7.83 ± 0.59 ^{A,B,C,D}

Amarillamiento (b*)

Control	3.00 ± 0.46 ^C	8.76 ± 0.57 ^{A,B}	6.91 ± 0.46 ^{A,B}
HMTBA	3.71 ± 0.46 ^C	8.39 ± 0.46 ^A	6.35 ± 0.49 ^B
DLM	2.92 ± 0.46 ^C	8.11 ± 0.46 ^{A,B}	7.10 ± 0.49 ^{A,B}

Indice de Saturación

Control	8.16 ± 0.67 ^{D,E}	12.23 ± 0.76 ^{A,B}	10.70 ± 0.67 ^{A,B,C}
HMTBA	8.46 ± 0.67 ^{C,D,E}	12.22 ± 0.67 ^A	9.81 ± 0.69 ^{B,C,D,E}
DLM	7.33 ± 0.67 ^E	11.55 ± 0.67 ^{A,B,C}	10.55 ± 0.69 ^{A,B,C,D}

¹ **Determinación del color inicial a los dos días post mortem. Empacado al vacío y MAP = empaque en atmósfera modificada** (80% O₂/20% CO₂) de las chuletas de cerdo que se almacenan en frío durante 7 días adicionales.

- 5 A, B, C, D, E Superíndices diferentes entre promedios (en función de cada propiedad de color por separado) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

No hubo interacción significativa entre el empaque y la dieta para el enrojecimiento ($P = 0.16$).

10

Sin embargo, el enrojecimiento se vio afectado significativamente por el empaque ($P < 0.0001$), pero no por la dieta ($P = 0.82$). Las muestras de control mostraron lecturas de enrojecimiento similar al comienzo del período de almacenamiento y después de 7 días de almacenamiento refrigerado, independientemente del sistema de empaque aplicado.

15 Las muestras HMTBA y DLM tuvieron enrojecimiento similar al comienzo del período de almacenamiento y después de siete días de almacenamiento refrigerado en el MAP con alto oxígeno. Por otro lado, el enrojecimiento aumentó significativamente en las muestras HMTBA ($P = 0.033$) y DLM ($P = 0.0058$) después de siete días de almacenamiento

refrigerado al vacío. Además, las muestras HMTBA mostraron una diferencia significativa en el enrojecimiento entre los dos sistemas de empacado aplicados ($P = 0.020$).

No hubo interacción significativa entre el empacado y la dieta para la amarillez ($P = 0.21$). Sin embargo, la amarillez se vio afectada significativamente por el empaque ($P < 0.0001$) pero no por la dieta ($P = 0.94$). La amarillez de las muestras aumentó significativamente durante el almacenamiento refrigerado, más aún que durante el almacenamiento al vacío con MAP.

Las muestras HMTBA también difirieron significativamente entre el vacío y el almacenamiento con alto oxígeno ($P = 0.0092$), mientras que las muestras control sólo mostraron una tendencia hacia una diferencia entre el vacío y el almacenamiento con MAP ($P = 0.075$) y las muestras de DLM no mostraron diferencias entre los sistemas de empacado aplicados ($P = 0.56$).

No hubo interacción entre el empacado y la dieta para el índice de saturación ($P = 0.15$).

Sin embargo, el índice de saturación se vio afectado significativamente por el empacado ($P < 0.0001$) pero no por la dieta ($P = 0.81$). El índice de saturación del control y las muestras DLM aumentó significativamente desde el índice inicial hasta el índice después de los períodos al vacío y de exposición MAP ($P < 0.001$). Sin embargo, la suplementación HMTBA no aumentó significativamente el índice de saturación durante el almacenamiento MAP, pero en lugar condujo a una diferencia significativa entre las dos condiciones de almacenamiento ($P = 0.0014$).

Fuerza de corte Warner- Bratzler (WBSF)

La WBSF se utilizó como una medida de la dureza instrumental (N). los valores WBSF fueron significativamente más bajos para las chuletas de cerdo empacadas al vacío que para las chuletas de cerdo almacenadas en MAP con alto oxígeno durante el período de exposición de 7 días ($P < 0.0001$). No hubo un efecto significativo de la dieta, sin embargo, se observó una tendencia hacia un efecto de la dieta ($P = 0.059$). Numéricamente, tanto los grupos DLM y HMTBA mostraron valores WBSF marcadamente más bajos que los del grupo de control dentro de cada sistema de empacado. De hecho,

la estrategia de la suplementación DLM mostró una fuerte tendencia hacia valores WBSF más bajos comparados con los de la dieta Control ($P = 0,055$). Además, se encontró que la "dureza" de las muestras tratadas con metionina almacenadas en MAP con alto de oxígeno era igual a la "dureza" obtenido a partir de las muestras de control empacadas al vacío, ver Tabla 3.

Tabla 3: Datos de dureza instrumental de cerdos sacrificados alimentados con una dieta estándar con (DLM y HMTBA) o sin suplementación de metionina (Control). Los datos se expresan como valores WBSF (Newton, N) y los resultados se informan como el promedio de mínimos cuadrados $\pm$ el error estándar del promedio.

	Vacío	MAP ¹
Control	39.90 $\pm$ 3.65 ^{B,C,D}	51.69 $\pm$ 3.65 ^A
HMTBA	30.55 $\pm$ 3.65 ^{C,D}	43.64 $\pm$ 3.65 ^{A,B}
DLM	28.80 $\pm$ 3.65 ^D	38.58 $\pm$ 3.65 ^{A,B,C}

¹ Empacado en atmósfera modificada (80% O₂ + 20% CO₂).
A, B, C, D, promedios-LS con la misma letra no son significativamente diferentes.

Proteína libre de tiol

La oxidación de proteínas se midió como la disminución en el nivel de tiol libre (nmol tiol/mg de proteína). Los promedios de los mínimos cuadrados de los principales efectos se muestran en la Tabla 4. El empacado y la dieta mostraron una tendencia hacia una interacción ($P = 0.091$). La suplementación con metionina parece aumentar el nivel de tiol libre en la proteína cuando las muestras de carne han sido almacenados al vacío (un ambiente no oxidativo), pero disminuyen el nivel de tiol libre en la proteína cuando las muestras de carne han sido almacenadas en MAP (condiciones oxidantes). Por lo tanto, la carne de cerdos suplementada con DLM difieren significativamente en el nivel de tiol libre entre las dos estrategias de empacado ($P = 0,0012$). Si bien hubo una tendencia fuerte similar hacia una diferencia dentro del grupo HMTBA, esta se mantuvo insignificante con el actual tamaño de la muestra ($P = 0.056$), por otra parte, no se encontró diferencia para el grupo de control ($P = 0.51$). Se puede concluir a pesar de que el contenido de los grupos tiol libres se vio afectado significativamente por el método de empacado aplicado

(P < 0,0001), en que las muestras almacenadas bajo vacío mostraron una cantidad significativamente más alta de los grupos tiol libres que las muestras almacenadas en MAP.

5 Tabla 4: Datos de oxidación de proteínas de cerdos sacrificados alimentados con una dieta estándar con (DLM y HMTBA) o sin suplementación de metionina (Control). Los datos se expresan mediante el nivel de tiol libre (tiol nmol/mg de proteína) y los resultados son reportados como el promedio de mínimos cuadrados ± el error estándar del promedio.

		Vacío	MAP ¹
10	Control	60.56 ± 1.13 ^{AB}	58.49 ± 1.19 ^{AB}
	HMTBA	62.60 ± 1.13 ^A	59.15 ± 1.13 ^{AB}
	DLM	62.16 ± 1.19 ^A	56.27 ± 1.13 ^B

15 ¹ Empacado en atmósfera modificada (80% O₂ + 20% CO₂).
^{A, B,} promedios-LS con la misma letra no son significativamente diferentes.

Sustancias reactivas al ácido Tiobarbiturico (TBARS) y contenido de grasa muscular. El TBARS se utilizó como una medida de la oxidación de lípidos (mg de malondialdehído/kg de carne). No hubo un efecto significativo de la dieta (P= 0.41).

20 ***Discusión y conclusiones del Experimento 1***

Todas las reacciones y ensayos químicos son propensos a algún grado de especificidad o interferencia, y el presente estudio no es la excepción. En las condiciones utilizadas, el DTNB también se conoce por reaccionan con sulfito, tiosulfato, sulfito de hidrógeno, cianuro y sulfuro, por lo tanto, todos pueden haber interferido con la determinación del SH (Ref). Del mismo modo, en principio, cualquier sustancia que lleva un sulfuro que contiene un anión a pH 8 también reaccionará con DTNB (Hofmann y Hamm, 1978).

30 Por otra parte, se ha encontrado que la metionina (10 µg) da un color amarillo en presencia del DTNB y por lo tanto, interfiere con la determinación de grupos tiol a pH 8.0 en un buffer de fosfato 0.5 M (Owens & Belcher, 1965).

Se encontró que las chuletas de cerdo almacenadas al vacío tienen valores WBSF más bajos (e.g., eran más tiernas) que las chuletas de cerdo almacenados en MAP con alto oxígeno. De muchas maneras esto se esperaba como el fenómeno bien conocido de menor terneza de la carne fresca almacenada en MAP con alto oxígeno (Tørnqren, 2003; Sørheim *et al*, 2004.; Clausen *et al*, 2009.; Lund *et al.*, 2007). Sin embargo, este estudio ha tratado de establecer si dos tipos de formulaciones de suplementación con metionina, DLM y HMTBA, son capaces de mejorar la estabilidad oxidativa y la terneza de las chuletas de cerdo almacenadas en una atmosfera con alto oxígeno. No hubo ningún efecto de la dieta en relación con la dureza determinada instrumentalmente.

10

Sin embargo, numéricamente, tanto los grupos DLM y HMTBA mostraron marcadamente valores WBSF marcadamente más bajos que los del grupo de control (>8 Newton), dentro de cada sistema de empacado (Tabla 3). La estrategia suplementación DLM mostró una fuerte tendencia hacia valores WBSF más bajos que los de la dieta control (P = 0,055). Esto indica que el tratamiento DLM produce una mejor ablandamiento post mortem independientemente de las condiciones de almacenamiento aplicadas. Además, se encontró que la "dureza" de las muestras tratadas con DLM almacenadas en una MAP con alto oxígeno era igual a la "dureza" obtenida en las muestras control empacadas al vacío (Tabla 3). Esto pareciera indicar que la estrategia de suplementación DLM tiene la capacidad de mejorar la terneza de las chuletas de cerdo almacenadas bajo condiciones oxidativas al mismo nivel que las chuletas de cerdo de cerdos no suplementados almacenados bajo condiciones óptimas, a saber al vacío.

El nivel de tiol libre fue el más alto en la carne almacenada al vacío y la más baja en la carne almacenada en MAP, indicando un mayor nivel de oxidación de proteínas en este último. En Adición, el nivel de Tiol libre de los grupos DLM y HMTBA fue numéricamente más alto que el del grupo de control cuando las muestras se almacenaron sin oxígeno. Cuando la carne se almacenó en un entorno oxidativo, el nivel de tiol libre se redujo en todas las estrategias de dieta. El grupo de control mostró una diferencia de 1,8 unidades entre el vacío y MAP. El nivel de tiol libre en los grupos HMTBA y DLM disminuyó en 3.5 y 6.0 unidades, respectivamente, desde el almacenamiento sin oxígeno hasta el almacenamiento MAP con alto oxígeno.

Puede parecer contradictorio que el DLM resulte en la carne más tierna tanto expuesta al vacío como almacenada en MAP y al mismo tiempo exhiba tanto el nivel más

alto (al vacío) y el más bajo (MAP) de tiol libre, respectivamente. Sin embargo, la metionina es capaz de barrer de ROS, a proteínas diana para la degradación proteolítica, participa en la señalización celular y es probable que participe en la regulación de la actividad de las enzimas (Stadtman K., 2003). Estos procesos biológicos pueden afectar tanto la estabilidad oxidativa de la carne fresca y el proceso de ablandamiento de la carne post mortem. Se puede especular que el mayor nivel de tiol libre visto en las muestras DLM almacenadas sin oxígeno refleja una susceptibilidad proteolítica mejorada de las proteínas de la carne, la cual daría lugar a la mejora de ablandamiento. Durante el almacenamiento en un medio oxidativo, la focalización de proteínas para la degradación proteolítica por la metionina puede ser eclipsada por su comportamiento antioxidante. Como la metionina actúa como antioxidante a través de un mecanismo de barrido de radicales (Stadtman *et al.*, 2003), lo que significa que se oxida fácilmente con el fin de prevenir o retrasar la oxidación de proteínas clave, el nivel de grupos tiol libres debe disminuir en un grado mayor cuando la carne se almacena en un entorno oxidativo si están presentes niveles elevados de metionina. Esto coincide bien, con los resultados encontrados en el presente estudio. Sin los efectos antioxidantes de la metionina, pueden ocurrir cambios conformacionales en las proteínas (Stadtman *et al.*, 2003). Esto podría ayudar a explicar por qué la dureza aumentó durante el almacenamiento en MAP con alto oxígeno en comparación con el almacenamiento al vacío.

20

En cuanto a la oxidación lipídica, no se obtuvo ningún efecto de la dieta a partir de la validación de las muestras emparejadas del test t. No fue posible determinar el efecto del empackado puesto que los datos sin procesar mostraron varianza heterogénea. La heterogeneidad parecía estar relacionada con los sistemas de empackado aplicados, y por lo tanto el nivel de oxígeno en el sistema de empackado. Se considera probable que la varianza difirió entre los sistemas de empackado al vacío (sin oxígeno) tendría una baja varianza porque el material de la muestra esta no oxidado mientras que MAP (nivel alto de oxígeno) daría lugar a una variación bastante grande debido a la (desigual) oxidación que tiene lugar. Al consultar los datos sin procesar, es evidente que los niveles de TBARS fueron iguales para las chuletas de cerdo empackadas al vacío, independientemente de la estrategia de alimentación aplicada (1.47 a 1.72 mg de malondialdehído/kg de carne) y éste es menor que los niveles de TBARS vistos durante el almacenamiento MA. Durante el almacenamiento MA, los dos tratamientos con metionina produjeron niveles iguales de TBARS (4.99 mg malondialdehído/kg de carne), que fue numéricamente inferior al nivel de la muestras de control (7.08 mg malondialdehído/kg de carne)

35

Ejemplo 2

sEMG (electromiografía de superficie), la SEMG (electrocardiografía de superficie) y mediciones de respiración.

5

Animales y alimentos- metionina baja, normal y alta

Dieta 007-baja en metionina: cantidad de material en %:

Trigo 37.17; Cebada 35.0; Salvado de Soya (Hipro 46% de proteína) 15.0; Salvado de
10 trigo 10.0; Fosforan 0,5; NaCl 0.35; Aditivos Minerales 0.3; Aditivos Vitamínicos 0.03; L-
lisina (tecnología limpia) 0.15. Total: 100.0

Cantidad del componente en 1000 g, en g: materia seca 881; Lisina 9.67;
15 **Metionina 2.52**; Triptofano 2.23; Treonina 6.39; Arginina 11.4; Proteína Bruta 169; Ca
8.98; Na 1.58; Fibra 32.5; histidina 4.57; Iso-leucina 6.89; Leucina 13.0; Valina 8.33;
Fenilalanina + tirosina 14.3; Mg 1.94; K 7.69; Mg 155 mg; J 2.45 mg; Cu 36.3 mg; Fe 273
mg; S 1.97 g; Zn 214 mg; Co 1308 mg; Se 0.636 mg; Vit A 15080 U Int.; Vit D3 3000 U.Int;
Vit E 60.3 mg; Vit K3 1.5 mg; Vit B1 6.98 mg; Vit B6 8.15 mg; Vit B12 30.6 mg; Biotina
0.237 mg; ácido fólico 1.53 mg; ácido nicotínico 88.2 mg; ácido Pantoténico 21.3 mg;
20 Colina 1564 mg; ácido linólico 2805 mg; ceniza 42.9 g.

Dieta 008-normal en metionina cantidad de material %: Trigo 37.17; Cebada
35.0; Salvado de Soya (Hipro 46% de proteína) 15.0; Salvado de Trigo 10.0; Fosforan 0.5;
NaCl 0.35; Aditivos minerales 0.3; Aditivos vitamínicos 0.03; L-lisina (tecnología limpia)
25 0.15; total 100.0

Cantidad del componente en 1000 g, en g: materia seca 881; Lisina 9.67;
Metionina 3.99; Triptofano 2.23; Treonina 6.39; Arginina 11.4; Proteína Bruta 169; Ca
8.98; Na 1.58; Fibra 32.5; histidina 4.57; Iso-leucina 6.89; Leucina 13.0; Valina 8.33;
30 Fenilalanina + tirosina 14.3; Mg 1.94; K 7.69; Mg 155 mg; J 2.45 mg; Cu 36.3 mg; Fe 273
mg; S 1.97 g; Zn 214 mg; Co 1308 mg; Se 0.636 mg; Vit A 15080 U Int.; Vit D3 3000 U.Int;
Vit E 60.3 mg; Vit K3 1.5 mg; Vit B1 6.98 mg; Vit B6 8.15 mg; Vit B12 30.6 mg; Biotina
0.237 mg; ácido fólico 1.53 mg; ácido nicotínico 88.2 mg; ácido Pantoténico 21.3 mg;
Colina 1564 mg; ácido linólico 2805 mg; ceniza 42.9 g.

35

Dieta 009-alta en metionina cantidad de material %: Trigo 37.17; Cebada 35.0; Salvado de Soya (Hipro 46% de proteína) 15.0; Salvado de Trigo 10.0; Fosforan 0.5; NaCl 0.35; Aditivos minerales 0.3; Aditivos vitamínicos 0.03; L-lisina (tecnología limpia) 0.15; total 100.0

5

Cantidad del componente en 1000 g, en g: materia seca 881; Lisina 9.67; **Metionina 7.41**; Triptofano 2.23; Treonina 6.39; Arginina 11.4; Proteína Bruta 169; Ca 8.98; Na 1.58; Fibra 32.5; histidina 4.57; Iso-leucina 6.89; Leucina 13.0; Valina 8.33; Fenilalanina + tirosina 14.3; Mg 1.94; K 7.69; Mg 155 mg; J 2.45 mg; Cu 36.3 mg; Fe 273 mg; S 1.97 g; Zn 214 mg; Co 1308 mg; Se 0.636 mg; Vit A 15080 U Int.; Vit D3 3000 U.Int; 10 Vit E 60.3 mg; Vit K3 1.5 mg; Vit B1 6.98 mg; Vit B6 8.15 mg; Vit B12 30.6 mg; Biotina 0.237 mg; ácido fólico 1.53 mg; ácido nicotínico 88.2 mg; ácido Pantoténico 21.3 mg; Colina 1564 mg; ácido linólico 2805 mg; ceniza 42.9 g.

15 **Primer ensayo**

Cerdos ([Yorkshire x Landrace sueco] x Hampshire) (n = 10 x 3 fueron alimentados dos veces al día con 2% de su peso corporal con las dietas respectivas (ya sea dieta baja o alta en metionina), agua *ad libitum*.

CERDOS	N=10	N=10	N=10
Peso corporal inicial ca 40kg	Metionina baja LM	Metionina alta DLM	Metionina alta HMTBA
Jaula de adaptación (peso corporal ca 40kg)	Dieta estándar SE	Dieta estándar SE	Dieta estándar SE
Día 1 inicio del tratamiento (peso corporal ca 70 kg)	Dieta LM Registro sEMG (N=7) en el último día de adaptación (día 1) y ultimo día del tratamiento (día 7) en todos los cerdos	Dieta DLM Registro sEMG (N=7) en el último día de adaptación y último día del tratamiento en todos los cerdos	Dieta HMTBA Registro sEMG (N=7) en el último día de adaptación y último día del tratamiento en todos los cerdos
Día 8 final del tratamiento	Dieta LM 7 animales	Dieta DLM 7 animales	Dieta DLM 7 animales

(peso corporal ca 75kg)	sacrificados	sacrificados	sacrificados
-------------------------	--------------	--------------	--------------

Segundo ensayo

5 Cerdos ([Yorkshire x Landrace sueco] x Hampshire) (n = 10 x 3 fueron alimentados dos veces al día con 2% de su peso corporal con las dietas respectivas (ya sea dieta baja o alta en metionina), agua *ad libitum*.

CERDOS Peso corporal inicial ca 40kg	N=10 Metionina baja LM	N=10 Metionina alta DLM	N=10 Metionina alta HMTBA
Jaula de adaptación (peso corporal ca 40kg)	Dieta estándar SE	Dieta estándar SE	Dieta estándar SE
Día 1 inicio del tratamiento (peso corporal ca 70 kg)	Dieta LM Muestra de sangre (7ml con heparina + 7ml en tubo con EDTA	Dieta DLM Muestreo de sangre	Dieta HMTBA Muestreo de sangre
Día 8 final del tratamiento (peso corporal ca 75kg)	Dieta LM Muestreo de sangre	Dieta DLM Muestreo de sangre	Dieta DLM Muestreo de sangre

10

Mediciones sEMG:

15 Las mediciones sEMG se realizaron en cada cerdo después de la comida de la mañana. Un área de la mano derecha del músculo M. Longissimus dorsi se afeitó y empapeló con arena, después de lo cual, dos electrodos de registro se colocaron justo en

frente de la última costilla, y por encima de la mayor parte de la M. Longissimus dorsi, y un electrodo de referencia se colocó en la parte posterior de la oreja de los cerdos.

Se colocaron dos electrodos estimulantes cuadrados uno junto al otro (no tocando) y enfrente de los electrodos de registro, después de lo cual el músculo se estimuló a los 10, 20, 60, 150 y 200 Hz y las respuestas posteriores fueron registradas. Se colocaron dos cables a cada lado del abdomen en la posición de la última costilla para formar un "triángulo" con el electrodo de referencia y ayudar a grabar tanto los movimientos respiratorios, como la señal sECG.

MÉTODOS

Registros sEMG

Este estudio usó tanto una configuración de electrodo diferencial único y doble, con electrodos (N-00-S & R-00-S; Sensor Azul, Medicotest A/S, Ølstykke, Dinamarca) configurados como se ha descrito previamente por Harrison *et al.* (Harrison, A. P., AH Nielsen, 1. Eidemak, S.Molsted, & E.M. Bartels. El entorno urémico y la disfunción muscular en el hombre y la rata. Nephron. Vol. 103: 33-42, 2006).

Los registros de electromiografía de superficie fueron tomadas a través de un amplificador ML 132 conectado a un convertidor A/D ML780 PowerLab/8s (AD Instrumentos, Chalgrove, Oxfordshire, Reino Unido) con una conexión adicional a un MacBook Air con un software de análisis grafico v.3.6.3/s, parámetros de pico y extensiones de histograma de espiga. La impedancia de entrada fue de 200 MΩ diferencial, y se utilizó un filtro de paso alto y bajo de 3 Hz y 500 Hz, respectivamente. Se estableció la velocidad de muestreo 40.000 por segundo.

Mediciones sEMG

Las directrices establecidas en las recomendaciones europeas en materia de superficie electromiográfica como se detalla en el proyecto SENIAM por Hermens *et al.* (1999, Hermens HJ, Freriks B, Merletti R, *et al.*: SENIAM 8 European Recommendations for Surface ElectroMyoGraphy. Publicada por Roessingh Research and Developmen b.v. ISBN 90-75452-15-2), que documentan la colocación óptima de los sensores, incluyendo

el tamaño del sensor, localizaciones en el músculo individual y procedimientos, tanto de registro y análisis, se siguieron de cerca.

Las grabaciones diferenciales de señales sEMG se hicieron a través de electrodos de superficie del músculo L.dorsi como se describió previamente por Andersen *et al.* (2008, Andersen NK, Ravn LS, Guy JH, Edwards SA y Harrison AP, Postnatal changes in electromyographic signals during piglet growth, and in relation to muscle fibre types. Livestock Science 115: 301-312). Se obtuvieron mediciones sEMG evocadas no invasivas utilizando una frecuencia de estimulación de 60, 150 y 200 Hz, que a su vez dieron lugar a potenciales de acción evocados por el musculo compuesto (CMAP's). También referidos como ondas M, que son la actividad recogida de un gran número de ondas motoras. En resumen, se unió una configuración de electrodo bipolar diferencial, con electrodos de electromiografía de registro Ag-AgCl desechables a la superficie de la piel expuesta por encima del músculo L.dorsi, con una distancia inter-electrodo establecida en 16-19 mm (Andersen *et al.*, 2008). El electrodo de tierra, que se utiliza para minimizar cualquier señal de perturbación en modo común, fue colocado en los oídos de los cerdos. La estimulación se llevó a cabo en un rango de frecuencias establecido (Hz) (simulador aislado Digitimer DS3, Digitimer LTD, Reino Unido), con 2 pulsos ms de 32 mA vía electrodos Palsflex (Danmeter, DK).

Análisis de la sEMG

La señal sEMG registrada fue evaluada en términos de amplitud pico a pico (mV), utilizando el software de análisis gráfico (AD Instruments, Chalgrove, Oxfordshire, Reino Unido).

Análisis de respiración y sECG

Usando electrodos colocados a cada lado del abdomen en la posición de la última costilla, y un electrodo de referencia colocado en el oído, fue posible crear un triángulo Einthoven y grabar tanto un ECG (además de la frecuencia cardíaca) y la frecuencia respiratoria a través de los movimientos del diafragma. La señal registrada se evaluó en términos de velocidad y el intervalo Q-T (tiempo necesario para que los ventrículos se despolarizar y repolaricen) utilizando software de análisis gráfico (AD Instruments, Chalgrove, Oxfordshire, Reino Unido).

RESULTADOS

Mediciones sEMG

- 5 Las mediciones de EMG detectan cambios en los registros EMG de superficie del músculo L.dorsi de los cerdos después de cada tratamiento (DLM y HMTBA) cf CONTROLES no tratados. Ver figura 2. A partir de la figura 2 es claro ver que ocurren cambios rápidos en la amplitud (mV), medidas a varias frecuencias entre los diferentes grupos de tratamiento.
- 10 Tenga en cuenta que los grupos CONT (sin tratar) y tratados (DLM) *pre*, tienen una señal de respuesta similar e.g., sin o antes del tratamiento, el músculo L.dorsi responde de una manera similar a la estimulación eléctrica.
- 15 Hay, sin embargo, una clara mejora en la amplitud pico a pico sEMG entre los grupos de tratamiento (DLM) *pre* y *post* (amarillo vs azul), lo que indica un claro beneficio en términos de crecimiento muscular/rendimiento de 1 semana de suplementación dietaria con DLM.
- 20 Es de particular interés sin embargo la mejora aún mayor en el músculo crecimiento/rendimiento que fue vista con 1 semana de suplementación dietaria con HMTBA- casi un 100% en los niveles de mejora cf CONT (no tratadas).

Respiracion & análisis ECG

- 25 Además de las grabaciones sEMG, hemos sido capaces de obtener mediciones no invasivas de la tasa de respiración (respiraciones/min) y la frecuencia cardíaca (bpm) así como un análisis de la ECG registrada en términos del tiempo necesario para la despolarización y repolarización ventricular, el llamado intervalo Q-T.
- 30 Tabla 1-Efectos de 1 semana de suplementación dietaria

35

Grupos	Respiración (respiraciones/min)	Frecuencia cardiaca (bpm)	Intervalo Q-T (mseg)
Tratamiento (DLM) <i>pre (n=6)</i>	26.83	121.17	223.21
Tratamiento (DLM) <i>post (n=6)</i>	23.53	110.11	242.31
Diferencia	DISMINUYE en 12% (ns)	DISMINUYE en 9% (ns)	DISMINUYE en 8.5% P<0.01

La Tabla 1 presenta los efectos de 1 semana de suplementación dietaria con DLM sobre la tasa de respiración y cardiaca de cerdos de 90 a 100 kg de peso para sacrificio, así como también el intervalo Q-T. Los valores son el promedio de un número de cerdos, donde "n" representa el número de animales por grupo. (ns) representa la diferencia entre los promedios que no era muy significativos.

A partir de la Tabla 1, se puede observar que la suplementación dietaria de 1 semana con DLM produjo tales cambios fisiológicos en estos cerdos de peso como la disminución en la tasa respiratoria, una frecuencia cardíaca más lenta y más tranquila, y un intervalo Q-T más largo, todos los cuales son indicativos de un estado fisiológico relajado.

De hecho, mientras que sólo el cambio en el intervalo Q-T es estadísticamente significativo en el conjunto actual de datos limitados, tomado en su conjunto estos datos son bastante notables ya que muestran que a pesar del estrés considerable de ser atrapados (sosteniendo la cuerda sobre la manipulación de la nariz y del cuerpo; siendo perseguido antes de la captura) y la restricción impuesta por la honda de grabación, además de la presencia de 5-6 personas a estrecha proximidad, y, finalmente, la estimulación eléctrica de L.dorsi, los cerdos tratados muestran signos fisiológicos de estar menos estresados.

Por lo tanto, la dieta DLM por metionina parece claramente tener un efecto calmante/antiestrés sobre los cerdos de peso para sacrificio, que fueron expuestos a exactamente al mismo nivel de manipulación y estrés de medición que los cerdos no tratados.

Calidad de la carne

MÉTODOS

5 Los cerdos fueron sacrificados en una casa de sacrificio comercial en Suecia después de un tiempo de 5h de descanso. A los 45 minutos post mortem, se midió el pH (Knick Portamess 751) y la temperatura (termómetro digital, Weber) en el M. longissimus dorsi a nivel de la 10ª costilla. A las 48h post mortem, la totalidad de lomos fueron disecados de los canales y transportados a la Universidad de Copenhague para más
10 mediciones. El pH final se midió, así como también el color por Minolta L* a* b*. el contenido de materia seca se determinó mediante el secado de las muestras de músculos a 105°C durante 24h. se cortaron rebanadas de 3 cm de espesor, medidas y empacadas al vacío antes de ser almacenadas durante 7 días adicionales a 2°C. Al final del periodo de almacenamiento las muestras se calentaron a una temperatura interna de 75°C.

15

 Después de ser enfriadas, las muestras se almacenaron en frío a 2°C hasta que se cortaron en losas de 1 cm x 1 cm x 2,5 cm de tamaño para la medida de la fuerza de corte. Para cada animal, se midieron 8 ejemplares y se utilizó la carga máxima promedio para su posterior análisis. Sin embargo, en el caso de que cualquiera de los especímenes
20 tuviera una carga máxima que fuera de más de 2 desviaciones estándar del promedio, esos especímenes eran considerados como valores atípicos y se sacaron de los cálculos.

RESULTADOS

25 Ningún efecto significativo de los diferentes regímenes de alimentación se puede observar en primeros parámetros de calidad de la carne (Tabla 2). Ninguno de los cerdos desarrolló el Síndrome PSE como el pH post mortem temprana mantenido sobre 5.8 en todos los casos, aunque la temperatura de los canales fuera ligeramente elevada. Esto demuestra que a continuación la temperatura ligeramente superior de los canales en este
30 caso particular no se debió a estrés durante el transporte y/o tiempo de espera, sino más bien el procedimiento de escaldado, que se realizó con agua caliente.

Tabla 2-Influencia de la suplementación de DLM y HMTNA en los parámetros de calidad de la carne.

35

	Tiempo post mortem	Régimen de alimentación			Significación estadística
		DLM	Control	HMTBA	
Casa de sacrificio	45 min				
pH		6.10	6.30	6.20	n.s.
Temperatura (°C)		39	38	39	n.s.
Laboratorio	2 días				
pH		5.50	5.40	5.40	n.s.
Color (unidades)					
Minolta L*		55.75	54.64	56.89	n.s.
Minolta a*		6.69	7.56	7.58	n.s.
Minolta b*		2.92	3.00	3.71	n.s.
Materia seca (%)		26	26	29	n.s.
Después del almacenamiento	9 días				
Carga Máxima (N)		34	46	37	P<0.02

Todas las mediciones realizadas a los 2 días post mortem están dentro del rango "normal", por otra parte, ninguno de los longissimus dorsi M. mostró signos de carne DFD, y también se encontró que las mediciones de color eran normales.

5

El pH ultimo ligeramente más alto del grupo DLM es una ventaja en términos de productos procesados, mientras que el pH más bajo de los otros grupos se puede esperar que dé a la carne un mejor sabor.

El mayor contenido de materia seca del grupo HTMBA podría explicarse en términos de un contenido de grasa intramuscular superior, ya que este grupo mostró mayores ganancias durante el periodo de acabado.

5 Después de 7 días de almacenamiento, tanto los grupos que habían sido alimentados con dietas suplementadas altas en metionina mostraron evidencia de una calidad de consumo superior en comparación con la del grupo de control (ver Figura 3). Esto se indica por los valores de fuerza de corte más bajos de los grupos DLM (1) y HMTBA (3) comparados con la de los controles (2).

10

CONCLUSIONES

Mediciones sEMG

15 Como resultado de los datos sEMG, una dieta alta en metionina (DLM (i.e., DL-metionina) o HMTBA (i.e., ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico)) se tiene que administrar a los cerdos, de una a dos semanas antes de situaciones “estresantes”, tales como destete, reubicación y sacrificio; con el fin de minimizar el daño resultante a partir de la oxidación de residuos de metionina en los canales de la membrana muscular, esencial en el funcionamiento normal de los músculos y con el fin de proporcionar un calmante para los
20 cerdos antes de situaciones estresantes.

Respiración y análisis sECG

25 Una semana de suplementación dietaria con DLM conduce a tales cambios fisiológicos en los cerdos de peso para sacrificio como; 1) una reducción en la tasa de la respiración, 2) una frecuencia cardíaca más lenta y más tranquila, y 3) un intervalo Q-T más largo, todos los cuales son indicativos de un estado fisiológico relajado.

30 Es evidente que la dieta con metionina tiene efectos calmantes/beneficios para aquellas necesidades al transportar cerdos de sacrificio a cualquier distancia del matadero.

Calidad de la carne

La suplementación con metionina durante el periodo de acabado de la producción de cerdos para engorde produce propiedades de textura superiores de la carne después del almacenamiento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la terneza de la carne que comprende la etapa de administrar la metionina como una dieta de pre-sacrificio a un animal.
5
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la carne es carne de ave o carne de pescado o mamífero no humano.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que
10 la carne se selecciona del grupo que consiste de cerdo, vaca, gallina, pollo, pavo, pescado.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la metionina se administra en forma de una formulación de suplementación de metionina.
15
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la metionina se administra en forma de L-metionina, o en la forma de fuentes de metionina sintética tal como DLM (i.e., DL-metionina) o la totalidad de sus formas de sal, sus análogos (e.g., ácido 2-Hidroxi-4-Metil Tio Butanólico o todas sus formas de sal), sus derivados (e.g., éster isopropílico del ácido 2-Hidroxi-4 -Metil Tio Butanólico o cualquiera
20 de sus otros ésteres), o mezclas de los mismos.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la metionina se administra como 0.1-1g de la metionina total por kg de peso corporal por
25 día pre-sacrificio al animal.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la metionina se administra al animal como 0.3-0.6% por encima de la dosis diaria recomendada.
30
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la metionina se administra en el día -30 a-1 pre-sacrificio.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que
35 la administración de metionina se realiza por vía oral al animal.

10. Una dieta pre-sacrificio animal que comprende metionina y en la que la metionina es alimentada en el día -30 a -1 pre-sacrificio en una dosis de 0.1-1g por kg de peso corporal por día al animal o en una dosis de 0.3-0.6% por encima de la ingesta de la dosis diaria recomendada.

5

11. La dieta pre-sacrificio de la reivindicación 10, que comprende además al menos otro alimento para el animal.

12. La carne de un animal sacrificado, dicho animal que se ha alimentado con una dieta pre-sacrificio que comprende metionina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-11.

13. Un producto que comprende la carne, al menos parcialmente de un animal sacrificado, dicho animal que se ha alimentado con una dieta pre-sacrificio que comprende metionina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-11.

14. El uso de la metionina para mejorar la terneza de la carne aviar o la carne de pescado o mamífero no humano.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la metionina está en la forma de L-metionina o en la forma de fuentes de metionina sintéticas tal como DLM o la totalidad de sus formas de sal, sus análogos (e.g., ácido 2-Hidroxi-4-Metil Tio Butanólico o todas sus formas de sal), sus derivados (e.g., éster isopropílico del ácido 2-Hidroxi-4 - Metil Tio Butanólico o cualquiera de sus otros ésteres), o mezclas de los mismos.

P A T E N T S

CESION

El (los) suscrito (s)

en consideración al pago de la suma de
(.....), que he(mos)
recibido, por el presente documento cedo
(cedemos) a

una compañía constituida de conformidad con las
leyes de

con oficinas en

todos los derechos y títulos sobre la invención
denominada

EL CESIONARIO firma también el presente y
declara que acepta dicha cesión

Dado y firmado hoy

en

ASSIGNMENT

The undersigned

Stefan PIERZYNOWSKI

in consideration of the sum of
(.....), the receipt of which
is hereby acknowledged, by these presents do sell,
assign and transfer unto

ADISSEO FRANCE S.A.S.
a corporation organized under the laws of FRANCE

having a place of business at
Immeuble Antony Parc II - 10, place du
Général de Gaulle-F-92160 ANTONY-FRANCE
all rights and title to the invention related to

PRE-SLAUGHTER DIET

THE ASSIGNEE signs these presents and declares
that accepts the aforesaid assignment

Given an signed this

in

Inventors

Assignee Stéphane AGASSE

LEGAL REPRESENTATIVE OF ADISSEO FRANCE S.A.S

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
castellanos@castellanosyco.co



(51) International Patent Classification:

A23K 1/16 (2006.01) A23L 1/318 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2012/072241

(22) International Filing Date:

9 November 2012 (09.11.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

1151056-7 9 November 2011 (09.11.2011) SE

(71) Applicant: ADISSEO FRANCE S.A.S. [FR/FR]; Immeuble Antony Parc II, 10, place du Général de Gaulle, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventor: PIERZYNOWSKI, Stefan; Alfagelgranden 24, S-231 32 Trelleborg (SE).

(74) Agent: CABINET GERMAIN & MAUREAU; B.P. 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: PRE-SLAUGHTER DIET INCLUDING METHIONINE

(57) Abstract: The present invention provides novel method for improving the tenderness of meat (e.g. pork, beef and poultry). The method comprises a pre-slaughter diet comprising methionine in an amount effective to improve the tenderness of the meat. The methionine may be fed alone or in combination with feedstuff rations to livestock animals. The present invention provides a novel use of methionine, i.e. for improving the tenderness of meat. The invention includes the use of methionine analogues such as 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid (HMTBA) or all its salt forms or 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters.



WO 2013/068525 A1

PRE- SLAUGHTER DIET INCLUDING METHIONINE

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to the field of fresh meat quality, from e.g. pork. Particularly, the present invention relates to the packing atmosphere of fresh meat and its effect on meat quality, particularly oxidative stability and texture, and how to improve the quality of fresh meat packed in a modified atmosphere or in vacuum by a pre-slaughter diet by supplementation of methionine.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Fresh meat is often packed in high-oxygen modified atmosphere packaging. This packaging atmosphere usually consist of a mixture around 80% O₂ and 20% CO₂. The high concentration of CO₂ inhibits aerobe bacterial growth and prolongs the shelf life of meat. The high level of O₂ provides a consumer desired stable red meat colour, but it also promotes oxidation of macronutrients in the meat. Oxidation of macronutrients can affect the eating quality of meat. Lipid oxidation is known to affect flavour, and protein oxidation is associated with decreased tenderness.

Packaging is important to prolong shelf life of meat and make distribution of products more efficient. It protects a given product against the outside environment and deteriorative effects such as; pathogens, discolouration, off-flavour, off-odour, texture changes, & nutrient loss.

Packaging has, as mentioned above, been shown to have an effect on meat quality like colour, flavour, water holding capacity and microbial growth. High oxygen MAP promotes lipid oxidation and blooming of myoglobin pigments to oxymyoglobin, and is suspected to influence meat tenderness negatively. Vacuum packaging influences meat colour, vacuum packed meat is often purple because the lack of oxygen causes the myoglobin pigments to form deoxymyoglobin. If a little amount of oxygen is left in the vacuum pack, the meat can turn brown because of formation of metmyoglobin.

After slaughtering the muscle cells are more susceptible to oxidative processes, than they would be in the living animal. The availability of oxygen and exposure to light are two main factors in reactive oxygen species (ROS) formation and thereby oxidation in meat. Processing, high oxygen packaging, and storage can all contribute to ROS formation and hence oxidation potential of the product. The significant ROS in meat are hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, perhydroxyl, superoxide, and singlet oxygen.

Oxidative processes in meat affects almost all biological molecules and hence the overall quality of the meat. Pigments, fatty acids, vitamins, and amino acids are the biological molecules most affected by the oxidative processes (McMillin, K. W, "Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat.", Meat Science 2008, vol. 80, p. 43-65 2008). The oxidation of these molecules is known to affect quality aspects such as colour, flavour, and odour in meat (Kanner, J. (1994): "Oxidative Processes in Meat and Meat Products: Quality Implications." Meat Science 1994, vol. 36, p. 169-189). Lipid oxidation is known to discolour the meat and give the meat a rancid flavour. Protein oxidation is suggested to influence meat digestibility, hence nutritional value, tenderness, flavour, and water-holding capacity.

WO2009/032276 provides a method of improving tenderness of meat comprising administering at least one form of beta-agonists to at least one bovine animal. However, these types of beta-agonists are currently prohibited in several countries and regions such as Europe.

WO 2005/002358 provides a method for improving meat quality of animals, wherein the method comprises feeding the animal a diet supplemented with mixed tocotrienols. However, tocotrienols will only prevent lipid oxidation and not protein oxidation.

US 6,042,855 provides a method of improving the tenderness of meat and meat products. The method includes administering excessive doses of vitamin D to meat producing animals prior to slaughter. The excessive dose of vitamin D is thought to improve quality of meat by a higher intramuscular calcium content, which, on other hand, is weakening myofibrils in muscles.

The effect of packaging atmosphere on flavour and tenderness of meat provides a dilemma for both manufacturers and consumers, as there are both advantages and disadvantages with high-oxygen modified atmosphere packaging. Inhibiting bacterial growth is important for food safety and shelf life, and consumers prefer red meat, as they associate this with fresh unspoiled meat. Oxidation changes the eating quality of the meat. The rancid flavour caused by lipid oxidation and the decreased tenderness caused by protein oxidation are not desirable, as consumers tend to prefer tender meat with no off-flavour. It is therefore highly desirable to be able to inhibit the oxidation of proteins associated with meat tenderness.

There is thus an urgent need to develop means and methods for improving meat quality, such as tenderness of fresh meat, particularly when packed in a modified atmosphere. Accordingly, the present invention seeks to provide means and methods to address such needs and interests for fresh meat packaging.

SUMMARY OF THE INVENTION

One aspect of the present invention provides use of methionine for improving meat quality, such as tenderness and oxidative stability of colour and shelf life stability of meat. Such use may be wherein the methionine is administered as a pre-slaughter diet.

The meat may further be fresh meat or frozen meat. However, all meat is non-human meat and may be non-human mammalian meat, avian meat or fish meat. The meat may thus be selected from the group consisting of pork, beef, hen, chicken, turkey, fish.

The methionine may be a methionine supplementation formulation comprising at least one further feed-stuff, such as L-methionine. Further examples are wherein the methionine is DLM (i.e. DL-methionine) or HMTBA (i.e. 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid). The methionine may be in the form of L-methionine, such as in the form of synthetic methionine sources. It may be L-methionine in all its salt forms, its analogues (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid or all its salt forms), derivatives (e.g. 2-Hydroxy-4-

Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters), or mixtures thereof.

Said meat may be stored under vacuum or high oxygen conditions.

Said methionine may be administered as 0.1-1g, such as 0.1, 0.2, 0.25,
5 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even
1g of total methionine per kg body weight per day pre-slaughter.

In another aspect, the methionine is administered as 0.3-0.6% above
recommended daily dose. The daily dosage may vary between different
species. However, such recommendations are readily available to someone
10 skilled in the art of animal feed for different species.

Thus, the dose of extra methionine as part of the uses, methods and
pre-slaughter diets according to the invention herein is thus easily calculated
based on this to have an effect on meat quality such as tenderness, oxidative
stability of colour of the fresh meat and shelf life of said fresh meat. The
15 methionine may be administered on day -30 to -1 pre-slaughter.

Thus, the methionine is, in a further aspect used for improving meat
quality, such as tenderness and oxidative stability of colour and shelf life
stability of meat.

Doses and days of feeding said methionine is given above and is for all
20 embodiments also applicable for the use in improving meat quality. Particularly,
methionine is used in a dose of 0.1-1g, such as 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4,
0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g of total
methionine per kg body weight per day pre-slaughter. In another aspect, the
methionine is used in a dose of 0.3-0.6% above recommended daily dose. For
25 both aspects of dosing the methionine is administered on day -30 to -1 pre-
slaughter.

In a further aspect, a method of improving meat quality, such as
tenderness and oxidative stability of colour and shelf life stability of meat in
animals is included. Said method comprises the step of pre-slaughter
30 administering methionine in an effective amount to a non-human mammal or
avian species. The administration to said non-human mammal or avian species
may be done orally and preferably may be done through a drinking water

administration. The methionine may be administered on day -30 to -1 pre-slaughter. The methionine is in the method also administered in the same doses as in the uses herein, i.e. in a dose of 0.2-1g, such as 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g per kg body weight per day of total methionine. It may, in another aspect be administered as a dose of 0.3-0.6% above recommended daily dose intake.

Further, an animal pre-slaughter diet comprising methionine is described herein.

In the pre-slaughter diet the methionine is fed on day -30 to -1 pre-slaughter in a dose of 0.1-1g, such as 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g per kg body weight per day as total methionine to a non-human animal or in a dose of 0.3-0.6% above recommended daily dose intake. The pre-slaughter diet may further comprise at least one further feedstuff to non-human mammals or avian species. Still a further aspect of the present invention is to provide meat from a slaughtered animal, said animal being fed with a pre-slaughter diet comprising methionine according to the invention or according to any of the methods and uses herein. Still a further aspect of the present invention provides a product comprising meat at least partially from a slaughtered animal, said animal being fed with a pre-slaughter diet comprising methionine according to the invention or according to any of the methods and uses according to the invention.

Thus, the present invention provides a method for improving the tenderness of meat which comprises the step of administering methionine as a pre-slaughter diet to an animal. The meat may be avian meat or fish meat or non-human mammal. More precisely, the meat may be selected from the group consisting of pork, beef, hen, chicken, turkey, fish.

According to the method of the present invention, the methionine may be administered in the form of a methionine supplementation formulation.

The administered methionine may be in the form of L-methionine, or in the form of synthetic methionine sources such as DLM (i.e. DL-methionine) or all of its salt forms, its analogues (e.g 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid or

all its salt forms), its derivatives (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters), or mixtures thereof.

According to the method of the present invention, the methionine may be administered as 0.1-1g, such as 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55,
5 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g, of total methionine per kg body weight per day pre-slaughter to the animal.

According to the method of the present invention, the methionine may be administered to the animal as 0.3-0.6% above recommended daily dose.

According to the method of the present invention, the methionine may be
10 administered on day -30 to -1 pre-slaughter. And more preferably, the administration of methionine is done orally to the animal.

The present invention provides an animal pre-slaughter diet comprising methionine and wherein the methionine is fed on day -30 to -1 pre-slaughter in a dose of 0.1-1g per kg body weight per day to the animal or in a dose of 0.3-
15 0.6% above recommended daily dose intake. The pre-slaughter diet may further comprise at least one further feedstuff to the animal.

The present invention provides a meat from a slaughtered animal, said animal being fed with a pre-slaughter diet comprising methionine as described above.

20 The present invention provides a product comprising meat at least partially from a slaughtered animal, said animal being fed with a pre-slaughter diet comprising methionine as described above.

The present invention concerns the use of methionine for improving the tenderness of avian meat or fish meat or non-human mammal. And more
25 preferably, the methionine may be in the form of L-methionine, or in the form of synthetic methionine sources such as DLM or all of its salt forms, its analogues (e.g 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid or all its salt forms), its derivatives (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters), or mixtures thereof.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the sEMG Peak-to-Peak amplitudes (mV) measured at various frequencies (60, 150 & 200 Hz) for pigs in the CONTROL (n=3) (no DLM) as open squares, the DLM *pre* n=6 as filled circles; *post* n=6 as black circles and
5 the HMTBA (n=3) groups as black squares.

Figure 2 shows mean shear force values of the DLM (1), Control (2), and HMTBA (3) groups.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

10 As used herein “prior to harvest” is intended to mean pre-harvest or pre-slaughter of the animal.

As used herein, the singular forms "a", "and", and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise.

As used herein “at least one” is intended to mean one or more, i.e. 1, 2, 3, 4, 5,
15 6, 7, 8, 9, 10, etc.

As used herein “animal” is intended to mean non-human mammals, avian species, e.g. poultry, and/or fish depending on the context. Further examples are given herein.

As used herein, a “full dose feed” is intended to mean a feed that is complete in
20 respect of nutrients, proteins, vitamins and minerals and used as a daily feed for an animal. Normally, an animal eats a certain percentage, %, of the full dose feed per day per kg of body weight (bw). Examples are given herein.

As used herein “meat” includes meat as raw material, fresh and frozen meat whatever the situation allows. Further, “meat” is animal flesh that is used as
25 food. “Meat” further means the skeletal muscle and associated fat and other tissues, but it may also describe other edible tissues such as organs and offal. In the Anglosphere, “meat” is generally used by the meat packing industry in a more restrictive sense—the flesh of mammalian species (pigs, cattle, lambs, etc.) raised and prepared for human consumption. As a matter of clarification,
30 as used herein “meat” is not to be interpreted in such a restrictive way but to

further include meat from other species such as poultry, fish, and other animals. Also, meat as raw material is used for further processing of meat and is included in the term "meat" herein.

It is an objective of the present invention to provide means and methods
5 to improve meat quality such as tenderness and oxidative stability of meat and meat products.

It is further an objective to provide means and methods for improving tenderness of non-human mammal meat, such as beef, pork and of poultry, i.e. avian species, meat and meat products from swine, poultry (non-ruminants)
10 and cattle (ruminants).

It is further an objective of the present invention to provide means and methods for improving tenderness of said meat which does not affect flavour of the meat.

It is further an objective of the present invention to provide means and
15 methods for improving tenderness of meat and meat products which is safe, simple and cost effective.

It is a further object to provide means and methods to provide an anti-stress diet to an animal pre slaughter to improve quality, such as tenderness and oxidative stability, of meat. Improved oxidative stability will further increase
20 shelf life of the meat. The meat to be improved is fresh meat from healthy animals, i.e. slaughter animals.

It is also a further object of the present invention to provide means and methods for reducing oxidative stress in animals, such as animal, e.g. a pig, poultry or fish, by using methionine in a diet. Such stressfully situations may be
25 e.g. slaughter, weaning, encaging and/or transport situations or any other situation causing stress.

Thus, the methionine diet clearly seems to have a calmativ/anti-stress effect on these animals such as e.g. a pig, poultry or fish slaughter weight pigs or slaughter hogs, which are exposed to exactly the same level of handling and
30 measurement stress as the untreated animals such as pigs. Such an anti-stress diet would use any of the suggested doses herein for the pre-slaughter diet, i.e. in a total dose of about 0.5-1g, such as e.g. 0.6-0.9g per100g of feed

to the animal, e.g. a pig, poultry or fish, e.g. 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g per 100g of feed as a dose. This is about 0.6-0.9% in the feed. Of this, about 0.25%, i.e. 0.25g/100g feed, represents methionine from proteins in the feed.

5 Thus, the addition of extra methionine to affect tenderness of meat amounts for about 0.3-0.6g/100g or 3-6g/1000kg feed, i.e. 0.3-0.6% above the normal feeding dose. Such an anti-stress diet would similarly be fed on day -30 to -1, i.e. 30 days before to 1 day before slaughter, that is pre-slaughter, e.g. -30, -29, -28, -27, -26, -25, -24, -23, -22, -21, -20, -19, -18, -17, -16, -15, -14, -10
10 13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, to -1 days pre-slaughter, or -25 to -1 days pre-slaughter, , or -20 to -1 day pre-slaughter or -14 to -1 day pre-slaughter, in a dose of about 0.3-0.6% over recommended methionine dose/day/kg bwt to have an effect on oxidative stress by reducing the oxidative stress.

15 Quality of meat may be measured by pH, meat colour and sensory characteristics, such as oxidation of lipid and proteins affecting tenderness of the meat.

 The present invention measures meat quality as of e.g. colour of packed meat as well as colour of meat upon cooking, tenderness and oxidative state
20 stored under different conditions, such as low oxygen, vacuum, or high oxygen such as modified atmosphere, e.g. modified oxygen packaging (MAP). In MAP the air is first removed by vacuum or gas flushing and then replaced by another gas mixture before sealing in barrier materials. In vacuum packaging (VP) the air is removed and not replaced, before the product is sealed in barrier
25 materials.

 As used herein, modified atmosphere packaging, MAP, is intended to mean that the atmosphere surrounding the product is removed and/or replaced before sealing in vapour-barrier materials. Different MAP options are contemplated herein and exemplified, such as master packs, low O₂ and high
30 O₂ MAP. Many forms of MAP are also case-ready packaging, so the cutting and packaging of meat happens at a centralized location before transport to the

retail stores. This type of case-ready packaging will of course also benefit of the present invention and is thus contemplated herein.

Further, low O₂ MAP may be vacuum packaging or MAP with an anoxic headspace. Vacuum is almost completely air-free, while a mix of N₂ and CO₂ may commonly be used as anoxic headspace in low O₂ MAP. Carbon monoxide (CO) may also be used in some low O₂ MAP to prevent browning of meat, but CO is illegal to use in the European Union.

High O₂ MAP has a headspace with high concentration of O₂ in comparison with atmospheric air (atmospheric air: ~78% N₂, 20.99% O₂, 0.94% argon, 0.03% CO₂). Gas mixtures in high O₂ MAP usually have a mixture of 80% O₂ and 20% CO₂, but it may be varied around 25-90% O₂ and 15-80% CO₂.

After packaging there is no additional manipulation of the internal environment, even though the gas atmosphere may change due to changes in environment and product.

MAP may also be used in master packs, where a number of individual packages are placed in a larger barrier wrapping with a modified atmosphere. Further, the individual packages may be air-permeable, but the master pack is MAP. Thus, when the master pack is opened, an individual package with air-permeable packaging materials will no longer be considered MAP. Tray-in-sleeve systems are another way of combining the advantages of MAP and air-permeable packaging. Instead of a master pack, the individual package has a removable barrier wrapping, which can be removed when desirable, leaving an underlying air-permeable wrapping.

Methionine to be used in the methods, uses, pre-slaughter diet according to the invention may be added in the form of L-methionine, such as in the form of synthetic methionine sources. It may be L-methionine in all its salt forms, its analogues (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid or all its salt forms), derivatives (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters), or mixtures thereof.

The methionine dose to feed the animal with f.ex., by adding to a full dose feed of a pre-slaughter diet or alone, should be in an amount effecting meat quality, such as tenderness and oxidative stability of meat according to

the invention. Methionine is normally part of an animal feed, but in a non-effective amount.

Thus, according to the invention, the animal is fed with the pre-slaughter diet in a dose effecting tenderness of meat according to the methods and uses
5 and dose-regimes given herein and within the scope of the invention.

Meat quality may then be measured as tenderness, texture and oxidative stability of lipids or proteins of the meat. Methods are given herein. Both texture and oxidative stability affects the tenderness of the meat. Colour is also an indicative of meat quality. One is merely visual base on the packed fresh meat,
10 i.e. a buyer prefers a particular colour of the packed fresh meat, normally red meat colour. Oxidation makes the meat more brownish and is thus less attractive to a buyer. A pre-slaughter diet comprising methionine according to the invention will lead to lower oxygen consumption in the package due to the protective mechanism of methionine. In this way, the shelf life of the meat will
15 increase and the colour during storage will be preserved.

However, colour is also an indication of cooking temperature of meat; it reflects coagulation of the proteins by a colour change (browning). Normally, meat changes colour during cooking and the coagulation is reflected in a browning process. Meat packed in a modified atmosphere with high oxygen
20 changes colour at a lower temperature during cooking; .i.e. at about 20°C lower temperature than meat packed in a normal atmosphere. This will of course be detrimental to the one who prepare the meat and trust the colour change as being ready for eat. Particularly, the aspect of killing bacteria and denaturing toxic substances during cooking will be lost if the meat will change colour to
25 show coagulation at about 52°C instead of about the correct temperature at 72°C. Thus, the consumer of the meat will be at risk of eating raw meat with bacteria still alive and toxic substances still working albeit looking at the colour shift when cooking the meat.

Thus, a further aspect of the present invention is that the pre-mature
30 browning seen during cooking of meat stored in high oxygen packing will also be prevented using methionine pre-slaughter, alone or in a pre-slaughter diet. Thus, accordingly, the pre-slaughter diet comprising methionine will further

increase meat quality by improving shelf life stability of fresh meat, improving colour stability of fresh meat during storage, as well as preventing pre-mature browning during cooking.

Using methionine pre-slaughter also affects shelf life of meat. The use of methionine pre-slaughter will increase the oxidative stability of the meat, thus less oxygen is consumed during storage. And with less oxygen consumption one may store the meat longer with the same amount of oxygen. The same is true for colour of packed meat in high oxygen modified atmospheres where the meat from methionine fed animals will be more oxidative stable and thus preserve red meat colour longer with the same amount of oxygen.

The present invention affects the tenderness of the meat so as to improve the tenderness. Oxidation of proteins affects meat tenderness negatively.

Tenderness may be measured as "instrumental hardness" using the Warner-Bratzler shear force (WBSF; Newton, see e.g. Bouton, P.E. and Harris P.V. (1972) A comparison of some objective methods used to assess meat tenderness. J. Food Sci. 37, 218-221). Protein oxidation may be measured as the loss of free thiol groups in proteins (μM thiol per mg protein) using Ellman's reagent, see e.g. Lund and Baron (2010) Protein Oxidation in foods and food quality. In: Skibsted et al (ed): Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. Page 33-69, Woodhead Publishing Limited ISBN 978-1-84569-495-1. Lipid oxidation may be measured as the increase in 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS; mg malondialdehyde per kg meat, see e.g. Creed, P.G (2010) Chemical deterioration and physical instability in ready-to-eat meals and catered foods. In Skibsted et al (ed): Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. Page 608-661, Woodhead Publishing Limited ISBN 978-1-84569-495-1).

The invention is believed to be effective on ruminant cattle, e.g. cow, as well as horse, lamb, bison, swine and poultry, e.g. hen, chicken, turkey, emu, ostriches, and further fish, e.g. salmon.

Thus, the pre-slaughter diet comprising administering methionine, as well as its methods and uses to improve tenderness according to the invention may be practiced on any animal, i.e. non-human animals, e.g. bovine animals

e.g. cows, porcine animals, e.g. pigs, equine animals, e.g. horses, caprine animals, e.g. goats, ovine animals, e.g. sheep, poultry, e.g. hen, chicken, turkey, emu, ostriches or fish.

The methionine is preferably administered or fed orally in e.g. a feedstuff
5 by itself or as a supplement to a typical feedlot feedstuff, including roughages, such as hay or silage, and concentrates such as grains, e.g. corn, barley, milo, rye, oats and wheat, and mixtures thereof along with e.g. molasses and other supplements and additives for livestock.

However, the methionine may also be administered by other routes,
10 such as intraperitoneal, intravenous or subcutaneous injections, transdermal application, or by water dosimetry.

For oral administration it may be in the form of powder, grains, pellets, a small sphere, or any other small, solid or densely packed ball, mass or tablet.

In another embodiment of the invention, the administration of the
15 methionine may be done through a drinking water administration.

Accordingly, one object of the present invention is the use of methionine, in its natural or synthetic form, its analogues, derivatives, or mixtures, thereof for improving tenderness of meat, alone or in a pre-slaughter diet. Methionine, in its natural or synthetic form, its analogues, derivatives or mixtures thereof, is
20 available commercially from several sources. Tenderness may be evaluated as texture or WBSF used as a measure of instrumental hardness (N). Using methionine will improve the meat quality as of tenderness and make the meat more tender. The methionine is fed as a pre-slaughter diet.

The meat affected may be both fresh meat or frozen meat, and when fresh
25 meat being vacuum packed or packed in a modified atmosphere with high oxygen.

In one embodiment, the methionine, when fed as a pre-slaughter diet is affecting tenderness of fresh meat. The meat may, as described herein, be any non-human animal or mammalian meat. For example, it may be meat from
30 pork, cattle, avian meat, e.g. meat from poultry, or meat from fish. It may also be any met selected from the group consisting of pork, beef, hen, chicken, turkey.

The methionine may, as described elsewhere herein, be wherein the methionine is any methionine, natural or synthetic, its analogues (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid or all its salt forms), derivatives (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters), or mixtures thereof or mixtures thereof, or a methionine supplementation formulation. It may be L-methionine in all its salt forms. For example, it may be DLM (i.e. DL-methionine) or HMTBA (i.e. 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid).

Said meat may be stored under vacuum or high oxygen conditions, or any modified atmosphere packaging. Different MAP options are contemplated herein and exemplified, such as master packs, low O₂ and high O₂ MAP, e.g. as exemplified further herein.

As revealed above, the animal is fed with the pre-slaughter diet in a dose effecting tenderness of meat according to the methods and uses and dose-regimes given herein and within the scope of the invention.

The amount of feed intake varies from species to species. A growing pig up to about 100 kg body weight, for example, eat about 3-5%, such as e.g. 4%, of their bodyweight per day, whereas a broiler, e.g. a chicken, may eat up to 10% of their body weight per day. Thus, an animal will eat about 1-10% of its body weigh per day in feed intake. Thus, the dose of methionine per kg body weight and per day is defined and adjusted in concentration to fit the daily intake of feed in included as a total-pre-slaughter diet feed with methionine.

Examples of such pre-slaughter diets, when full diets, affecting meat quality such as tenderness and oxidative stability of shelf life and colour of meat are given below.

The methionine may, of course, be given separately, and not in the daily full-diet ration, administering the same dose of methionine. However, this will need extra labour to administer to the animal in addition to the daily diet feed and is thus less desirable. However, it will give the same effect on tenderness of meat.

The methionine according to the invention is fed in a total dose of about 0.5-1g, such as e.g. 0.6-0.9g per100g of feed to the animal, e.g. a pig, poultry

or fish, e.g. 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g per 100g of feed as a dose. This is about 0.6-0.9% in the feed. Of this, about 0.25%, i.e. 0.25g/100g feed, represents methionine from proteins in the feed. Thus, the addition of extra methionine to affect tenderness of meat amounts for
 5 about 0.3-0.6g/100g or 3-6g/1000kg feed, i.e. 0.3-0.6% above the normal feeding dose.

Example of a standard full diet for pigs is given here below, excluding the extra methionine according to the invention.

10 *Content* : Wheat 54.9 %; Barly 16.9 %; Wheta brun i 10.0 %; oats 9.5 %; Soy 4.4 %; Rape, extracted 1.5 %; Calcium carbonate 1.5 % ; Common salt 0.34 %

Nutritive content : Crude protein 12.5 % ; Crude fat 2.8 %; Ashes 4.6 %; Crude fibre 5.0 %; Ca 0.6 %; P 0.4 %; K 0.6 % ; N 2.0 %; Na 0.15 % ; Metionine 2.4 g
 15 (from proteins per 1000g feed) ; Lysine 7.9 g per 1000 g feed of which hydroxy analogue is 0.5 g ; Energy acc. Swedish Board of Agriculture, (Jordbruksverket), SJV, 12.2 MJ; Energy acc. to Swedish University of Agricultural Science, (Sveriges lantbruksuniversitet), SLU, NEväx 9.3 MJ; Energy acc. to Swedish University of Agricultural Science, (Sveriges
 20 lantbruksuniversitet), SLU, NESugg 9.5 MJ

Different types of additives and example of amounts: Selenium (natriumselenit) 0.4 mg; Cupper (cupper sulfate) 15 mg; Vitamine E 60 mg ; Vitamine D3 400 IE; Vitamine A 4000 IE; L-lysine tekniskt rent; L-treonine tekniskt rent;
 25 monomersyrahalt Fytas EC 3.1.3.26 415 FTU of total phosphorus, P.

An extra methionine dose according to the invention is then added as 0.3-0.6% over recommended methionine dose/day/kg body weight (bwt) or about 12-24g extra added methionine/1000g feed.

The dose per kg animal thus relates to the amount of feed the animal
 30 eats, if not changing the methionine concentration, that is the amount of methionine/1000g feed ration. Both options are of course available in the methods, uses and pre-slaughter diets according to the invention.

For example, a pig of 100kg eating 2-6% of its body weight (bwt), for example eating 4% of its bodyweight per day of the pre-slaughter diet according to the invention, i.e. 4 kg of the pre-slaughter diet if 4%. The pig will have a total dose of 24g to 36 g methionine per day. Of this, 12-24g/1000g feed, i.e. 0.3-0.6% of total feed weight, is extra added methionine, for example L-methionine, to the feed to have an effect on meat quality, e.g. tenderness and oxidative stability of colour and shelf life stability of meat.

Pre-slaughter doses of methionine for other species is calculated from amount of daily consumed feed enriched with extra enrichment of 0.3 – 0.6 % of methionine over recommended methionine dose/day/kg bwt to have an effect on meat quality such as tenderness and oxidative stability of colour and shelf life of fresh meat.

The methionine is thus fed as 0.1-1g per kg body weight per day of total methionine, i.e. both the methionine in the feed from proteins as well as the extra methionine of 0.3-0.6% over the recommended methionine dose/day/kg bwt, such as 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g per kg body weight per day pre-slaughter of total methionine intake.

Further, the methionine is fed on day -30 to -1, i.e. 30 days before to 1 day before slaughter, that is pre-slaughter, e.g. -30, -29, -28, -27, -26, -25, -24, -23, -22, -21, -20, -19, -18, -17, -16, -15, -14, -13, -12, -11, -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, to -1 days pre-slaughter, or -25 to -1 days pre-slaughter, or -20 to -1 day pre-slaughter or -14 to -1 day pre-slaughter, in a dose of about 0.3-0.6% over recommended methionine dose/day/kg bwt to have an effect on meat quality such as tenderness and oxidative stability of colour and shelf life of fresh meat packed in vacuum or in any modified atmosphere such as high oxygen atmosphere.

Thus, methionine is used for improving tenderness of meat and a further object is methionine for use in improving meat quality, e.g. meat tenderness, using methionine as describe herein in methods, uses and pre-slaughter diets. Also included is use of methionine for the preparation of a pre-slaughter diet for

improving meat quality and use of methionine for the preparation of a medicament or animal feed for reducing oxidative stress in an animal.

Accordingly, further objects of the present invention is a method for improving tenderness of meat from non-human mammals or avian species, said method comprising the step of pre-slaughter administering methionine in an effective amount to a non-human mammal or avian species. Examples of effective amounts are given herein, e.g. 0.1-1g per kg body weight per day, such as 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g per kg body weight per day pre-slaughter.

Further, the methionine is fed on day -30 to -1, i.e. 30 days before to 1 day before slaughter that is pre-slaughter.

For example, a methionine supplementation strategy is tested in a rather straight forward way and examples given herein.

To test oxidative stability of pork loins one may do as follows.

An increase of oxidative stability due to methionine supplementation strategies fed pre-slaughter will improve tenderness of meat such as e.g. pork loins.

One may choose a suitable number of animals, such as pigs, to perform a study with its control groups, f. ex. twenty-one pigs randomly assigned to one of three feeding groups (n=7). The control group may receive a standardized feedlot diet only. The groups to be tested with the pre-slaughter diet are fed with methionine in its natural or synthetic form, e.g. L-methionine, its analogues, derivatives, or mixtures thereof, for improving meat quality, here assessed as tenderness of meat. Examples of L-methionine are DLM (DL-methionine) and HMTBA (DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid). The groups will receive the standardized feedlot diet and a high-methionine supplement, e.g. for example either DLM (i.e. DL-methionine) or HMTBA (i.e. 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid), during the finishing period before slaughter – from 1 – 30 days. To test different conditions of storage e.g. vacuum and high oxygen, and then analyse effect of methionine fed pre-slaughter on meat tenderness, the meat is packed under different specified conditions. If f.ex. pork is analysed, pork chops are either vacuum packed or packed in modified atmosphere (MA;

80 % O₂) and stored for an additional 7 days at 2°C 48h *post mortem*. F.ex. 3 cm thick pork chops may be either vacuum packed or packed in modified atmosphere (MA; 80 % O₂) and stored for an additional 7 days at 2°C before analysing meat quality by assessing e.g. tenderness of the meat.

5 Tenderness may then be analysed as instrumental hardness using the Warner-Bratzler shear force (WBSF; Newton). Protein oxidation may be measured as the loss of free thiol groups in proteins (µM thiol per mg protein) using Ellman's reagent. Lipid oxidation may be measured as the increase in 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS; mg malondialdehyde per kg
10 meat).

 Experiments, shown as results herein, shows that both methionine supplementation strategies resulted in markedly more tender meat, i.e. WBSF values is lower when measured, than the control diet when stored under vacuum. This was also the case for the meats stored under modified
15 atmosphere, i.e. MAP meat, however, the difference in WBSF values between DLM and HMTBA groups were bigger, indicating a better tenderization of the DLM samples during storage in oxidative conditions.

 The method according to the invention may be a method wherein the administration to said non-human mammal or avian species is done orally, or in
20 any further way exemplified herein such as by other routes, such as intraperitoneal, intravenous or subcutaneous injections, transdermal application, or by water dosimetry. For oral administration it may be in the form of powder, grains, pellets, a small sphere, or any other small, solid or densely packed ball, mass or tablet. The methionine may be administered
25 alone, or as a supplement to a typical feedlot feedstuff, including roughages, such as hay or silage, and concentrates such as grains, e.g. corn, barley, milo, rye, oats and wheat, and mixtures thereof along with e.g. molasses and other supplements and additives for livestock.

 Further, the administration of methionine according to the invention may
30 be done on day -30 to -1 pre-slaughter, as exemplified further herein. Further, the methionine administered may be in a dose of 0.1-1g per kg body weight per day pre slaughter, such as 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6,

0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g per kg body weight per day pre-slaughter, or any dose per day corresponding to about 0.3-0.6% over recommended methionine dose/day/kg bwt to have an effect on meat quality such as tenderness and oxidative stability of colour and shelf life of fresh meat.

5 A further object of the invention is thus to provide an animal, e.g. non-human mammalian or avian, pre-slaughter diet comprising methionine and wherein the methionine is fed on day -30X to -1Xx pre-slaughter in a dose of 0.2-1g per kg body weight per day pre-slaughter, such as 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 or even 1g
10 per kg body weight per day pre-slaughter, or any dose per day corresponding to about 0.3-0.6% over recommended methionine dose/day/kg bwt to have an effect on meat quality such as tenderness and oxidative stability of colour and shelf life of fresh meat.. The pre-slaughter diet may further comprise a further feedstuff to non-human mammals or avian species. Such feed-stuff is further
15 exemplified herein and may be e.g. roughages, such as hay or silage, and concentrates such as grains, e.g. corn, barley, milo, rye, oats and wheat, and mixtures thereof along with e.g. molasses and other supplements and additives for livestock.

Further objects of the present invention is to provide meat from a
20 slaughtered animal, said animal being fed with a pre-slaughter diet comprising methionine according to the invention, e.g. the pre-slaughter diet, methods and uses described herein in all its embodiments.

Still, a further object of the present invention is to provide a product comprising meat at least partially from a slaughtered animal, said animal being
25 fed with a pre-slaughter diet comprising methionine according to the invention e.g. the pre-slaughter diet, methods and uses described herein in all its embodiments.

Administration of the methionine, its analogues, derivatives, or mixtures thereof, at the dosage schedule pre-slaughter according to the invention and as
30 described herein in all its embodiments has shown to improve the tenderness of fresh meat, packed in vacuum or in a modified atmosphere packaging (MAP).

Thus, the present invention in all its objects and embodiments affects tenderness of non-human animal meat. This is accomplished through administration of methionine, its analogues, derivatives, or mixtures thereof, (i.e. the methionine may be in the form of L-methionine, such as in the form of synthetic methionine sources, in all its salt forms, its analogues (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid or all its salt forms), derivatives (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters), or mixtures thereof), to livestock in an amount effective to improve tenderness of meat and without being toxic to the livestock prior to harvest of the animal.

10

EXAMPLES

The Examples 1 below shows the relation between methionine supplementation strategies and oxidative stability of pork chops. The results show that methionine supplementation strategies will increase the oxidative stability and improve tenderness of pork loins.

15

Example 1

In Example 1 twenty-one pigs were randomly assigned to one of three feeding groups (n=7). The control group received a standardized diet only. The DLM and HMTBA groups received the standardized diet plus a high-methionine supplement (either DLM (i.e. DL-methionine) or HMTBA (i.e. 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid)) during the finishing period. At 48h *post mortem*, 3 cm thick pork chops were either vacuum packed or sealed in a modified atmosphere (MA; 80 % O₂) and stored for an additional 7 days at 2°C. Instrumental hardness was measured using the Warner-Bratzler shear force (WBSF; Newton) method. Protein oxidation was measured as the loss of free thiol groups in proteins (nmol thiol per mg protein) using Ellman's reagent. Lipid oxidation was measured as the increase in 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS; mg malondialdehyde per kg meat).

20

25

The DLM supplementation strategy tended to lower instrumental hardness in both non-oxidative (vacuum) and oxidative (MAP) environments.

30

DLM exhibited the highest level of free thiol in the non-oxidative environment and the lowest level of free thiol in the oxidative environment. A significant decrease in the level of free thiol was only seen for this group. The DLM supplementation strategy seemed to possess the ability to improve the tenderness of pork chops stored under oxidative conditions to the same level as pork chops from the control group stored under vacuum conditions.

Diet seemed to have no effect on lipid oxidation in the meat. The lack of diet effect may be caused by an impaired reliability of the method of measuring the level of TBARS. The TBARS levels were at an equal level for vacuum packed pork chops and this was lower than the TBARS levels seen during MA (modified atmosphere) storage. During MA storage, the two methionine treatments resulted in a similar TBARS level, which was markedly lower than the level of the control samples.

Material and methods Example 1

Animals and feeding strategies

Twenty-one slaughter pigs ([Yorkshire × Swedish Landrace] × Hampshire) were raised on a commercial diet. Pigs were randomly assigned to one of three groups (n=7). The groups represented three feeding strategies, namely a Control group which received a standardized diet comprising 0.27% total methionine, and both a DLM and HMTBA group, receiving the same diet as the Control group throughout the feeding period, apart from the fact that they were fed a higher level of methionine (1.1% total methionine) during a seven day finishing period immediately prior to slaughter. The supplements were given in two forms, either as DL-methionine (DLM) or DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMTBA). The pigs were fed twice daily 2% of their body weight with the respective diets and had free access to water.

Slaughter and sampling procedures

Pigs were slaughtered at a commercial slaughter house in Sweden after a resting time of 5 hours. At 45 minutes *post mortem*, pH (Knick portamess 751

pH-meter with an Ingold LOT glass electrode, Tech Instrumentering ApS, Denmark) and temperature (digital thermometer, Weber, Stephen Nordic, Denmark) were measured in the *m. Longissimus dorsi* (LD) at the level of the 10th rib. At 48 hours *post mortem*, the entire back was dissected from the carcass and transported under controlled conditions to the University of Copenhagen for further measurements.

Packaging and ageing

Pork chops were cut perpendicular to the long axis of each LD muscle. Six 3 cm thick pork chops were sliced from each LD. Three were vacuum packed and three were packed in a high-oxygen modified atmosphere. The chops were placed in plastic trays (M71-43A white/PS; 195 × 144 × 43 mm in dimension; Færch Plast, Denmark) and placed in vacuum bags (EM-628862; O₂ transmission rate = 40-50 cm³/m²/24h/bar, CO₂ transmission rate = 150 cm³/m²/24h/bar, water-vapour transmission rate = 2.6 g/m²/24h; LogiCon Nordic A/S, Denmark). The ambient air was removed from all vacuum bags using a vacuum machine (type, manufacturer, country). The bags intended for vacuum storage were first filled with a gas mixture (80% oxygen/20% carbon dioxide) before being sealed completely, whereas the bags intended for MAP were only partially sealed. This procedure resulted in a headspace-to-meat ratio in the MAP samples of approximately 8:1. The chops were displayed in full light (LUX?) for 7 days at 2°C (until 9 days *post mortem*). The gas composition was checked (CheckMate 9900, PBI Dansensor, Denmark) before packaging and again prior to opening, at the end of the simulated display period in order to check for leakage. The oxygen-enriched environment was well maintained (83.4 %) throughout the display period for all MA packages.

Storage loss and cooking loss

Storage loss was determined as the weight loss percentage at the end of the display period (9 days *post mortem*) relative to the weight at the day of packaging (two days *post mortem*). The cooking loss was determined as the

weight loss percentage between the pork chops before and after cooking. The results are given as the mean of the three pork chops in each meat pack.

*Meat colour (CIE L*a*b*)*

- 5 Instrumental meat colour was measured with a Minolta Chroma Meter (CR-300; D₆₅ and 2° observer angle, 8 mm diameter measuring area; Minolta, Japan). Before packaging, as described previously, colour recordings of the pork chops was carried out. At the end of the display period, the pork chops were allowed to bloom for at least 30 min at 4 ± 2 °C once they had been removed from the
- 10 vacuum bags. Colour measurements followed the CIE colour convention, where the three fundamental outputs are L*, a* and b*. L* is lightness on a scale of 0 (all light absorbed; black) to 100 (all light reflected; white); a* spans from +60 (red) to -60 (green) and b* spans from +60 (yellow) to -60 (blue). The saturation index, also known as chroma, was calculated as the square root of
- 15 $a^{*2}+b^{*2}$ (MacDougall, 1977). Three recordings were made on each pork chop, and the mean value was used for statistical analysis.

Warner Bratzler shear force (WBSF)

- Instrumental hardness was measured using the Warner-Bratzler shear force
- 20 (WBSF) method. In short, at the end of the display period fresh samples were heated in a water bath in an oven (type, manufacturer, country). The temperature rise was monitored for one sample and the remaining samples were given the time to reach an internal temperature of 75°C plus five minutes. The samples were cooled down before cores of 1 cm × 1 cm × 2.5 cm were
- 25 excised for shear force analysis. For each animal, 8 cores were measured and the mean maximum load (Newton) was used for further analysis. In the case that any of the specimens had a maximum load in excess of two standard deviations from the mean, then they were regarded as outliers and taken out of the calculation.

30

Free protein thiol

Protein oxidation was measured as the loss of free thiol groups in proteins, hence high values indicate low oxidation and *vice versa*. In brief, the frozen pork samples were partially thawed at chill storage temperature for 30 minutes. Fat and connective tissue was removed and 1.0 g of lean meat was homogenised in 25 ml of 5.0% SDS (sodium dodecyl sulphate) in 0.10 M Tris (tris(hydroxyamino)methane) buffer, pH 8.0 using an Ultra Turrax (Ultra Turrax T-25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Germany). The homogenates were placed in a water bath at 80°C for 30 minutes, and subsequently cooled and filtered. The protein concentration was determined spectrophotometrically (Helios Omega Single Beam UV-VIS, Fisher Scientific Biotech Line, Denmark) at a wavelength of 280 nm using a standard curve prepared from bovine serum albumin (BSA). The thiol concentration was determined in an ELISA plate reader (SLT Spectra Rainbow, FO 39046, SLT LABinstruments, Austria) after derivatization by Ellman's reagent; 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid = DTNB) (Ellman, 1959) in 0.10 M Tris-buffer (pH 8.0). Filtrate (25 µl), Tris buffer (100 µl) and DTNB (25 µl) were added to wells in a 96 well microtiter plate. The absorbance at 410 nm was measured before addition of DTNB ($ABS_{410_{meat}}$) and after reaction with DTNB ($ABS_{410_{meat+DTNB}}$). In addition, the absorbance of a blank solution (25 µl 5% SDS dissolved in 100 mM Tris buffer and 100 µl 0.10 M Tris buffer) was likewise measured at 410 nm. After addition of DTNB, the microtiter plate was stored in the dark and the absorbance was measured exactly 30 minutes later. The absorbance corresponding to the thiol concentration in the sample was $CorrABS_{410} = ABS_{410_{meat+DTNB}} - ABS_{410_{meat}} - ABS_{410_{blank}}$. The thiol concentration was calculated based on a 7-point standard curve ranging from 2 to 150 µg/ml glutathione prepared from reduced glutathione diluted in 5.0% SDS in 0.1 M Tris buffer, pH 8.0. The concentration of free thiol groups was determined as nmol thiol per mg protein. Duplicate homogenates, and triplicate measurements on each homogenate, were made for each meat sample and the mean values were used for further statistical analysis.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Lipid oxidation was measured as the increase in 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and expressed as mg malondialdehyde per kg meat. Lipid oxidation was evaluated using 2-thiobarbituric acid (TBA; 4,6-dihydroxy-2-mercapto-pyrimidin) as described by (Vyncke, 1970; Vyncke, 1975) with
5 modifications according to (Sørensen & Jørgensen, 1995). Briefly, 5.0 g meat was homogenized in 15 ml 7.5% TCA with 0.10% propylgallate and 0.10% ethyldiamin-tetra acedic acid (EDTA) using an Ultra Turrax (Ultra Turrax T-25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Germany) for 45 seconds at 13,500 rpm and filtered. 5.0 ml of the filtrate was mixed with 5.0 ml 0.020 M thiobarbituric acid
10 (TBA) and incubated at 100 °C in a waterbath for 40 minutes. Absorbance was measured at 532 nm and 600 nm at room temperature. The TBARS results were calculated using a standard curve prepared from malondialdehydbis-(diethylacetal) (TEP). Mean values of two independent determinations were used for statistical analysis.

15

Extraction of lipid

The amount of extractable lipid was used to calculation the total lipid content of the fresh meat samples and was expressed as a percentage. A meat sample (10 g) was homogenized in 100 ml chloroform/methanol (2:1 v/v) using an Ultra
20 Turrax (Ultra Turrax T-25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Germany) for 1 minute at 13,500 rpm. To this homogenate was added 25 ml of a 1.0 mM CaCl₂ solution and the material was once again homogenized before centrifugation (MSE Mistral 2000, England) for 20 minutes at 1,000 rpm. The chloroform phase was removed and the extraction procedure repeated. The chloroform
25 phase containing the extracted lipids was dried by vacuum evaporation (Büchi RE 11, Büchi Laboratoriums-Technik AG, Schweiz). Finally, 2 × 2 ml chloroform/methanol and 2.0 ml CaCl₂ were added to the dried sample which was then mixed (Vortex-mixer VF2, Janke & Kunkel IKA_Labortechnik, Germany) and centrifuged for 20 minutes at 2,500 rpm. The lipid phase was
30 removed, dried by vacuum evaporation and weighed. The percentage of intramuscular fat was calculated from the weight of the total lipid obtained after solvent extraction and the weight of the meat sample.

Statistical analysis

The storage loss, cooking loss, colour, hardness and protein oxidation data were analysed using a split-plot design in ANOVA with random effect of animal ID. For the fixed effects a full factorial design of (diet, packaging) was adopted. Least squares means for all traits of interest were separated using the least significant differences (F test, $P < 0.05$). Model validation was performed for each model to ensure fulfilment of the model assumptions. All LS-mean combinations were adjusted for multiple comparisons using the Tukey test. The lipid oxidation data was analysed using a paired-sample *t*-test. Model validation was performed to ensure fulfilment of the model assumptions.

Results Example 1

Storage and cooking loss

The storage and cooking loss data were determined as the weight reduction (g) before and after the display period as well as before and after cooking. Least squares means of the main effects are shown in Table 1. Whilst packaging and diet showed a slight tendency towards an interaction ($P = 0.098$) with respect to storage loss, storage loss was significantly affected by the packaging conditions ($P < 0.0001$) in that display under vacuum led to lower storage loss than display in MAP. However, the storage loss of the HMTBA samples stored under vacuum was not significantly different from those stored in a high-oxygen atmosphere ($P = 0.58$). There was no overall effect of diet ($P = 0.14$).

Cooking loss was not affected by an interaction between packaging and diet ($P = 0.54$) or diet alone ($P = 0.68$). However, there was an overall effect of packaging conditions ($P = 0.0011$), which was not reflected in Table 1. Numerically, display under vacuum led to a higher cooking loss than display in MAP.

Table 1: Storage and cooking loss data from slaughter pigs fed a standard diet with (DLM and HMTBA) or without (Control) methionine supplementation. Data

are expressed as the weight reduction (g) before and after the display period and before and after cooking. Results are reported as least squares mean $\pm$ the standard error of the mean.

5

	Vacuum	MAP ¹
Storage loss		
Control	4.94 $\pm$ 0.83 ^B	9.64 $\pm$ 0.83 ^A
HMTBA	4.63 $\pm$ 0.83 ^B	6.37 $\pm$ 0.83 ^{A,B}
DLM	4.56 $\pm$ 0.89 ^B	9.34 $\pm$ 0.83 ^A
Cooking loss		
Control	23.34 $\pm$ 1.73 ^A	17.51 $\pm$ 1.73 ^A
HMTBA	21.35 $\pm$ 1.73 ^A	18.49 $\pm$ 1.73 ^A
DLM	21.52 $\pm$ 1.86 ^A	15.82 $\pm$ 1.86 ^A

¹Modified atmosphere packaging (80% O₂ + 20% CO₂).

A,BLS-means with the same letter are not significantly different.,

BLS-means with the same letter are not significantly different.

Meat colour

- 10 The colour characteristics of the meat samples were determined using the CIE L*a*b* colour system. Least squares means of the main effects are shown in Table 2. Packaging and diet interacted ($P=0.037$) with respect to light reflection. The light reflection at two days *post mortem* (initial) was not significantly different from the light reflection after seven days of chill storage
- 15 (vacuum and MAP) for the Control and HMTBA samples. The conditions) but not during vacuum ageing (a non-oxidative environment). The Control diet showed a numerically lower initial light reflection than the DLM and HMTBA methionine supplements. During vacuum ageing, the light reflection increased in the Control and DLM groups but decreased in the HMTBA group. During chill
- 20 storage in a high-oxygen modified atmosphere, the light reflection increased for all three groups.

Table 2: Colour properties of meat from slaughter pigs fed a standard diet with (DLM and HMTBA) or without (Control) methionine supplementation. The results are reported as least squares mean $\pm$ the standard error of the mean.

	Initial¹ (2 days post mortem)	Vacuum¹ (9 days post mortem)	MAP¹ (9 days post mortem)
Light reflection (L*)			
Control	54.64 $\pm$ 1.25 ^{A,B}	57.80 $\pm$ 1.44 ^{A,B}	57.78 $\pm$ 1.25 ^{A,B}
HMTBA	56.89 $\pm$ 1.25 ^{A,B}	55.34 $\pm$ 1.25 ^{A,B}	58.73 $\pm$ 1.30 ^{A,B}
DLM	55.75 $\pm$ 1.25 ^B	57.83 $\pm$ 1.25 ^{A,B}	59.19 $\pm$ 1.30 ^A
Redness (a*)			
Control	7.56 $\pm$ 0.58 ^{A,B,C,D}	8.51 $\pm$ 0.63 ^{A,B,C,D}	8.09 $\pm$ 0.58 ^{A,B,C,D}
HMTBA	7.58 $\pm$ 0.58 ^{B,D}	8.86 $\pm$ 0.58 ^{A,C}	7.43 $\pm$ 0.59 ^{B,D}
DLM	6.69 $\pm$ 0.58 ^{C,D}	8.21 $\pm$ 0.58 ^{A,B}	7.83 $\pm$ 0.59 ^{A,B,C,D}
Yellowness (b*)			
Control	3.00 $\pm$ 0.46 ^C	8.76 $\pm$ 0.57 ^{A,B}	6.91 $\pm$ 0.46 ^{A,B}
HMTBA	3.71 $\pm$ 0.46 ^C	8.39 $\pm$ 0.46 ^A	6.35 $\pm$ 0.49 ^B
DLM	2.92 $\pm$ 0.46 ^C	8.11 $\pm$ 0.46 ^{A,B}	7.10 $\pm$ 0.49 ^{A,B}
Saturation index			
Control	8.16 $\pm$ 0.67 ^{D,E}	12.23 $\pm$ 0.76 ^{A,B}	10.70 $\pm$ 0.67 ^{A,B,C}
HMTBA	8.46 $\pm$ 0.67 ^{C,D,E}	12.22 $\pm$ 0.67 ^A	9.81 $\pm$ 0.69 ^{B,C,D,E}
DLM	7.33 $\pm$ 0.67 ^E	11.55 $\pm$ 0.67 ^{A,B,C}	10.55 $\pm$ 0.69 ^{A,B,C,D}

- 5 **Initial colour determination at two days post mortem. Vacuum packaging and MAP=modified atmosphere packaging (80% O₂/20% CO₂) of pork chops which were chill stored for an additional 7 days.**

^{A,B,C,D,E} Different superscripts between means (based on each colour property separately) indicate significant differences ($P < 0.05$).

There was no significant packaging and diet interaction for redness ($P = 0.16$). However, the redness was significantly affected by packaging ($P < 0.0001$) but

- not by diet ($P=0.82$). The Control samples exhibited similar redness readings at the beginning of the storage period and after 7 days of chill storage, regardless of the packaging system applied. The HMTBA and DLM samples had similar redness at the beginning of the storage period and after seven days of chill storage in the high-oxygen MAP. Moreover, the redness increased significantly in the HMTBA ($P=0.033$) and DLM ($P=0.0058$) samples after seven days of chill storage under vacuum. In addition, the HMTBA samples showed significant difference in redness between the two packaging systems applied ($P=0.020$).
- 10 There was no significant packaging and diet interaction for yellowness ($P=0.21$). However, the yellowness was significantly affected by packaging ($P<0.0001$) but not by diet ($P=0.94$). The yellowness of the samples increased significantly during chill storage, more so during vacuum storage than MAP. The HMTBA samples also differed significantly between vacuum and a high-
- 15 oxygen storage ($P=0.0092$), whereas the Control samples only showed a tendency towards a difference between vacuum and MAP storage ($P=0.075$) and the DLM samples showed no difference between the packaging systems applied ($P=0.56$).
- There was no packaging and diet interaction for the saturation index ($P=0.15$).
- 20 However, the saturation index was significantly affected by packaging ($P<0.0001$) but not by diet ($P=0.81$). The saturation index of the Control and DLM samples increased significantly from the initial index to the index after the vacuum and MAP display periods ($P<0.001$). However, the HMTBA supplementation did not increase the saturation index significantly during MAP
- 25 storage but instead resulted in a significant difference between the two storage conditions ($P=0.0014$).

Warner-Bratzler shear force (WBSF)

- WBSF was used as a measure of instrumental hardness (N). The WBSF values were significantly lower for the vacuum packed pork chops than those
- 30 chops stored in a high-oxygen MAP during the 7 day display period ($P<0.0001$). There was no significant effect of diet, however, a tendency was

observed towards a diet effect ($P=0.059$). Numerically, both the DLM and HMTBA groups showed markedly lower WBSF values than the Control group within each packaging system. In fact, the DLM supplementation strategy showed a strong tendency towards lower WBSF values compared to the Control diet ($P=0.055$). In addition, the “hardness” of the methionine treated samples stored in a high-oxygen MAP was found to be equal to the “hardness” obtained from the vacuum packed control samples, see Table 3.

Table 3: Instrumental hardness data from slaughter pigs fed a standard diet with (DLM and HMTBA) or without (Control) methionine supplementation. Data are expressed as WBSF values (Newton, N) and the results are reported as least squares mean $\pm$ the standard error of the mean.

	Vacuum	MAP ¹
Control	39.90 $\pm$ 3.65 ^{B,C,D}	51.69 $\pm$ 3.65 ^A
HMTBA	30.55 $\pm$ 3.65 ^{C,D}	43.64 $\pm$ 3.65 ^{A,B}
DLM	28.80 $\pm$ 3.65 ^D	38.58 $\pm$ 3.65 ^{A,B,C}

¹Modified atmosphere packaging (80% O₂ + 20% CO₂).

^{A,B,C,D}LS-means with the same letter are not significantly different.

Free protein thiol

Protein oxidation was measured as the decline in the level of free thiol (nmol thiol/mg protein). Least squares means of the main effects are shown in Table 4. Packaging and diet showed a tendency towards an interaction ($P=0.091$). Methionine supplementation seemed to increase the level of free protein thiol when the meat samples had been stored under vacuum (a non-oxidative environment) but decrease the level of free protein thiol when the meat samples had been stored in MAP (oxidative conditions). Hence, meat from pigs supplemented with DLM differed significantly in the level of free thiol between the two packaging strategies ($P=0.0012$). Whilst there was a strong similar tendency towards a difference within the HMTBA group, this remained insignificant with the present sample size ($P=0.056$), moreover, no difference

was found for the Control group ($P=0.51$). It can be concluded though that the content of free thiol groups was significantly affected by the packaging method applied ($P<0.0001$), in that samples stored under vacuum exhibited a significantly higher amount of free thiol groups than those samples stored in
5 MAP.

Table 4: Protein oxidation data from slaughter pigs fed a standard diet with (DLM and HMTBA) or without (Control) methionine supplementation. Data are expressed by the level of free thiol (nmol thiol/mg protein) and the results are reported as least squares mean $\pm$ the standard error of the mean.

	Vacuum	MAP ¹
Control	60.56 $\pm$ 1.13 ^{A,B}	58.49 $\pm$ 1.19 ^{A,B}
HMTBA	62.60 $\pm$ 1.13 ^A	59.15 $\pm$ 1.13 ^{A,B}
DLM	62.16 $\pm$ 1.19 ^A	56.27 $\pm$ 1.13 ^B

10 ¹Modified atmosphere packaging (80% O₂ + 20% CO₂).

^{A,B}LS-means with the same letter are not significantly different.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and muscle fat content

TBARS was used as a measure of lipid oxidation (mg malondialdehyde/kg meat). There was no significant effect of diet ($P=0.41$).

15

Discussions and conclusions Experiment 1

All reactions and chemical tests are prone to some degree of un-specificity or interference, and the present study is no exception. Under the conditions used, DTNB is also known to react with sulphite, thiosulfate, hydrogen sulphite,
20 cyanide, and sulphide, all of which may therefore have interfered with the SH determination (Ref). Likewise, in principal, any substance carrying a sulphur containing anion at pH 8 will also react with DTNB (Hofmann & Hamm, 1978). Moreover, methionine (10 μ g) has been found to give a yellow colour in the presence of DTNB and hence, interfere with the determination of thiol groups at
25 pH 8.0 in a 0.5 M phosphate buffer (Owens & Belcher, 1965).

Pork chops stored under a vacuum were found to possess lower WBSF values (e.g. were more tender) than chops stored in a high-oxygen MAP. In many ways this was to be expected as lower tenderness is a well-known phenomenon of fresh meat stored in a high-oxygen MAP (Tørngren, 2003; Sørheim *et al.*, 2004; Clausen *et al.*, 2009; Lund *et al.*, 2007). However, this study has sought to establish if two types of methionine supplementation formulations, DLM and HMTBA, are capable of improving the oxidative stability and the tenderness of pork chops stored in a high-oxygen atmosphere. There was no overall effect of diet in relation to instrumentally determined hardness. However, numerically, both the DLM and HMTBA groups showed markedly lower WBSF values than the Control group (>8 Newton), within each packaging system (Table 3). The DLM supplementation strategy showed a strong tendency towards lower WBSF values than the Control diet ($P=0.055$). This indicates that the DLM treatment results in better tenderisation *post mortem* regardless of the storage conditions applied. In addition, the “hardness” of the DLM treated samples stored in a high-oxygen MAP was found to be equal to the “hardness” obtained from the vacuum packed Control samples (Table 3). This would seem to indicate that the DLM supplementation strategy has the ability to improve the tenderness of pork chops stored under oxidative conditions to the same level as that of pork chops of non-supplemented pigs stored under optimal conditions, namely a vacuum.

The level of free thiol was highest in the vacuum stored meat and lowest in meat stored in MAP, indicating a higher level of protein oxidation in the latter. In addition, the free thiol level of the DLM and HMTBA groups were numerically higher than that of the Control group when the samples were stored without oxygen. When the meat was stored in an oxidative environment, the level of free thiol was reduced within all dietary strategies. The Control group showed a difference of 1.8 units between vacuum and MAP. The level of free thiol of the HMTBA and DLM groups declined by 3.5 and 6.0 units, respectively, from storage without oxygen to storage in a high-oxygen MAP.

It may seem contradictory that DLM resulted in the most tender meat both when displayed under vacuum and when stored in MAP and at the same time

exhibited both the highest (vacuum) and lowest (MAP) level of free thiol, respectively. However, methionine is able to scavenge ROS, to target proteins for proteolytic degradation, is involved in cell signalling and is likely involved in the regulation of enzyme activities (Stadtman *et al.*, 2003). These biological processes may affect both the oxidative stability of fresh meat and the tenderisation process of meat *post mortem*. It may be speculated that the higher level of free thiol seen in the DLM samples stored without oxygen reflected an improved proteolytic susceptibility of the meat proteins, which would result in improved tenderisation. During storage in an oxidative environment, the targeting of proteins for proteolytic degradation by methionine may be overshadowed by its antioxidative behaviour. As methionine act as an antioxidant through a radical scavenging mechanism (Stadtman *et al.*, 2003), meaning that it is readily oxidized in order to prevent or delay oxidation of key proteins, the level of free thiol groups should decrease to a higher extent when meat is stored in an oxidative environment if elevated levels of methionine is present. This coincides well with the results found in the present study. Without the antioxidative effect of methionine, conformational changes in proteins may occur (Stadtman *et al.*, 2003). This might help explain why hardness increased during storage in high-oxygen MAP compared to vacuum storage.

Regarding lipid oxidation, no effect of diet was obtained from the valid paired-sample *t* test. It was not possible to determine the effect of packaging as the raw data showed heterogeneous variance. The heterogeneity seemed to be related to the packaging systems applied, and thereby the level of oxygen in the packaging system. It was considered likely that the variance differed between packaging systems in that vacuum (without oxygen) would have a low variance because the sample material is un-oxidized whereas MAP (high oxygen level) would result in a rather large variance due to the (uneven) oxidation taking place. By consulting the raw data, it was apparent that the TBARS levels were equal for vacuum packed pork chops, regardless of feeding strategy applied (1.47 to 1.72 mg malondialdehyde/kg meat) and this was lower than the TBARS levels seen during MA storage. During MA storage, the two methionine treatments resulted in equal TBARS levels (4.99 mg

malondialdehyde/kg meat), which was numerically lower than the level of the control samples (7.08 mg malondialdehyde/kg meat)

Example 2

- 5 sEMG (surface electromyography), sECG (surface electrocardiography) and respiration measurements

Animals and Feed - low, normal and high methionine

- 10 **Diet 007– low methionine** : Material amount % :
Wheat 37.17; Barly 35.0; Soya brun (Hipro 46% protein) 15.0; Wheta brun 10.0
Phosphoran 0.5; NaCl 0.35; Minerals additives 0.3; Vitamin additives 0.03; L-lizyne (tech clean) 0.15.Total: 100.0
- 15 Component Amount in 1000g in g: dry matter 881; Lizine 9.67; **Methionine 2.52**; Tryptofan 2.23; Treonin 6.39; Arginin 11.4; Row protein 169; Ca 8.98; Na 1.58;Fiber 32.5;Histidine 4.57;Iso-leucin 6.89; Lecin 13.0; Valine 8.33; Fenylalénine+tyrozine 14.3; Mg 1.94; K 7.69; Mg 155 mg; J 2.45 mg; Cu 36.3 mg; Fe 273 mg; S 1.97 g; Zn 214 mg; Co 1 308 mg; Se 0.636 mg;Vit A Int. U.
- 20 15 080; Vit D3 In.U. 3 000; Vit E 60.3 mg; Vit K3 1.5 mg; VitB1 6.98 mg; Vit B6 8.15 mg; Vit B12 30.6 mg; Bitin 0.237 mg; Folic acid 1.53 mg; Nicotine acid 88.2 mg; Pantoteic acid 21.3 mg; cholin 1 564 mg; Linolic acid 2 805 mg; Ash 42.9 g.
- 25 **Diet 008– normal methionin** Material amount%: Wheat 37.17; Barly 35.0; Soya brun (Hipro 46% protein) 15.0; Wheta brun 10.0; Phosphoran 0.5; NaCl 0.35; Minerals additives 0.3; Vitamin additives 0.03; L-lizyne (tech clean) 0.15; Total 100.0
- 30 Component Amount in 1000g in g :dry matter 881; Lizine 9.67; **Methionine 3.99**; Tryptofan 2.23; Treonin 6.39; Arginin 11.4; Row protein 169; Ca 8.98; Na 1.58; Fiber 32.5; Histidine 4.57; Iso-leucin 6.89;Lecin 13.0; Valine 8.33;Fenylalénine+tyrozine 14.3; Mg 1.94; K 7.69; Mg 155 mg; J 2.45 mg; Cu

35

36.3 mg; Fe 273 mg; S 1.97 g; Zn 214 mg; Co 1 308 mg; Se 0.636 mg; Vit A
Int. U. 15 080; Vit D3 In.U.3 000; Vit E 60.3 mg; Vit K3 1.5 mg; VitB1 6.98 mg;
Vit B6 8.15 mg; Vit B12 30.6 mg; Bitin 0.237 mg; Folic acid 1.53 mg; Nicotine
acid 88.2 mg; Pantoteic acid 21.3 mg; cholin 1 564 mg; Linolic acid 2 805 mg;
5 Ash 42.9 g.

Diet 009— high methionin Material amount%: Wheat 37.17; Barly 35.0; Soya
brun (Hipro 46% protein) 15.0; Wheta brun 10.0; Phosphoran 0.5; NaCl 0.35;
Minerals additives 0.3; Vitamin additives 0.03; L-lizyne (tech clean) 0.15; Total
10 100.0

Component Amount in 1000g in g: dry matter 881; Lizine 9.67; **Methionine**
7.41; Tryptofan 2.23; Treonin 6.39; Arginin 11.4; Row protein 169; Ca 8.98; Na
1.58; Fiber 32.5; Histidine 4.57; Iso-leucin 6.89; Lecin 13.0; Valine 8.33;
15 Fenylalénine+tyrozine 14.3; Mg 1.94; K 7.69; Mg 155 mg; J 2.45 mg; Cu 36.3
mg; Fe 273 mg; S 1.97 g; Zn 214 mg; Co 1 308 mg; Se 0.636 mg; Vit A Int.
U.15 080; Vit D3 In.U.3 000; Vit E 60.3 mg; Vit K3 1.5 mg; VitB1 6.98 mg; Vit
B6 8.15 mg; Vit B12 30.6 mg; Bitin 0.237 mg; Folic acid 1.53 mg; Nicotine acid
88.2 mg; Pantoteic acid 21.3 mg; cholin 1 564 mg; Linolic acid 2 805 mg; Ash
20 42.9 g.

First trial

Pigs ([Yorkshire × Swedish Landrace] × Hampshire) (n = 10 × 3 were fed twice
daily 2% of their body weight with the respective diets (either low or high
25 methionine diets), water *ad libitum*.

PIGS	n = 10	n = 10	n = 10
Starting body wt ca 40 kg	Low methinine LM	High methinine DLM	High methinine HMTBA
Cage adaptation (body wt ca 40 kg)	Standard SE diet	Standard SE diet	Standard SE diet

Day 1 - treatment start (body wt ca 70 kg)	LM diet sEMG registration (n = 7) on the last adaptation day (day 1) and last treatment day (day 7) on all pigs.	DLM diet sEMG registration (n = 7) on the last adaptation day and last treatment day on all pigs	HMTBA diet sEMG registration (n = 7) on the last adaptation day and last treatment day on all pigs
Day 8 – treatment finish (body wt ca 75 kg)	LM diet 7 animals slaughtered	DLM diet 7 animals slaughtered	HMTBA diet 7 animals slaughtered

S e c o n d t r i a l

Pigs ([Yorkshire × Swedish Landrace] × Hampshire) (n = 10 × 3) were fed twice
 5 daily 2% of their body weight with the respective diets (either low or high
 methionine diets), water *ad libitum*.

PIGS	n = 10	n = 10	n = 10
Starting body wt 40 kg	Low methinine LM	High methinine DLM	High methinine HMTBA
Cage adaptation (body wt ca 40 kg)	Standard SE diet	Standard SE diet	Standard SE diet
Day 1 - treatment start (body wt ca 70 kg)	LM diet Blood sampling (7 ml to heparin tube + 7 ml to EDTA tube)	DLM diet Blood sampling	HMTBA diet Blood sampling
Day 8 – treatment finish (body wt ca 75 kg)	LM diet Blood sampling	DLM diet Blood sampling	HMTBA diet Blood sampling

sEMG measurements:

sEMG measurements were made on each pig after the morning meal. An area of the right-hand *M. Longissimus dorsi* muscle was shaved and sand-papered, after which, two recording electrodes were placed just in front of the last rib,
5 and above the bulk of the *M. Longissimus dorsi*, and a reference electrode was placed on the back of the pigs' ear.

Two square stimulating electrodes were placed next to one another (not touching) and in front of the recording electrodes, after which the muscle was stimulated at 10, 20, 60, 150 and 200Hz and the subsequent responses were
10 recorded. Two leads were placed on either side of the abdomen at a position of the last rib to form a "triangle" with the reference electrode and serve to record both respiratory movements as well as sECG signal.

METHODSsEMG recordings

15 This study used both a single and a double differential electrode configuration, with electrodes (N-00-S & R-00-S; Blue Sensor, Medicotest A/S, Ølstykke, Denmark) configured as described previously by Harrison et al. (Harrison, A.P., A.H. Nielsen, I. Eidemak, S.Molsted, & E.M. Bartels. The uremic environment and muscle dysfunction in man and rat. *Nephron*. Vol 103: 33-42, 2006).
20 Surface electromyography recordings were taken via an ML 132 amplifier connected to a ML780 PowerLab/8s A/D converter (AD Instruments, Chalgrove, Oxfordshire, UK) with a further connection to a MacBook Air with Chart v. 3.6.3/s Software, Peak Parameters and Spike Histogram extensions. Input impedance was 200 M Ω differential, and a high and a low pass filter of 3
25 Hz and 500 Hz, respectively, were used. Sampling speed was set to 40,000 per second.

sEMG measurements

The guidelines laid out in the European *Recommendations for Surface*
30 *ElectroMyoGraphy* as detailed by the SENIAM project by Hermens et al. (1999,

Hermens HJ, Freriks B, Merletti R, *et al*: SENIAM 8 European Recommendations for Surface ElectroMyoGraphy. Published by Roessingh Research and Development b.v. ISBN 90-75452-15-2), which document the optimal placement of sensors, including sensor size, individual muscle locations and both recording and analysis procedures, were closely followed.

Differential recordings of sEMG signals were made *via* surface electrodes from the *L.dorsi* muscle as previously described by Andersen et al. (2008, Andersen NK, Ravn LS, Guy JH, Edwards SA & Harrison AP, *Postnatal* changes in electromyographic signals during piglet growth, and in relation to muscle fibre types. *Livestock Science* 115: 301-312). Non-invasive evoked sEMG measurements were obtained using a stimulation frequency of 60, 150 and 200 Hz, which in turn gave rise to evoked compound muscle action potentials (CMAP's), also referred to as M waves, being the collected activity of a large number of motor units. In brief, a bipolar differential electrode configuration, with disposable Ag–AgCl recording electromyography electrodes was attached to the exposed skin surface above the *L.dorsi* muscle, with a set inter-electrode distance of 16–19 mm (Andersen et al., 2008). The ground electrode, used to minimize any common mode disturbance signal, was placed on the pigs' ears. The stimulation was conducted over a range of set frequencies (Hz) (Digitimer DS3 isolated stimulator, Digitimer Ltd, UK), with 2 ms pulses of 32 mA via Palsflex electrodes (Danmeter, DK).

sEMG signal analysis

The recorded sEMG signal was assessed in terms of peak-to-peak amplitude (mV) using Chart analysis software (AD Instruments, Chalgrove, Oxfordshire, UK).

Respiration & sECG analysis

Using electrodes placed either side of the abdomen at the position of the last rib, and a reference electrode placed on the ear, it was possible to create an Einthoven triangle and to record both an ECG (plus heart rate) and respiration rate through diaphragm movements. The recorded signal was assessed in terms of rate and the Q-T interval (time taken for the ventricles to depolarize

and repolarize) using Chart analysis software (AD Instruments, Chalgrove, Oxfordshire, UK).

RESULTS

5 *sEMG measurements*

The EMG measurements detected changes in surface EMG recordings of the *L.dorsi* muscle of the pigs following each treatment (DLM & HMTBA) *cf* untreated CONTROLS. See figure 2. From Figure 2 it is clear to see that rapid changes in amplitude (mV) measured at various frequencies occur between the
10 various treatment groups.

Note that the CONT (untreated) and the Treatment (DLM) *pre* groups have a similar signal response e.g. without or prior to treatment the *L.dorsi* muscle responds in a similar fashion to electrical stimulation.

There is, however, a clear improvement in sEMG peak-to-peak amplitude
15 between the Treatment (DLM) *pre* and *post* groups (yellow *versus* blue), indicating a clear benefit in terms of muscle growth/performance of 1 weeks dietary supplementation with DLM.

Of particular interest though is the even greater improvement in muscle growth/performance that was seen with 1 weeks dietary supplementation with
20 HMTBA – almost a 100% improvement *cf* CONT (untreated) levels.

Respiration & ECG analysis

In addition to the sEMG recordings, we were able to obtain non-invasive measurements of the rate of respiration (breaths/min) and the heart rate (bpm)
25 as well as an analysis of the recorded ECG in terms of the time taken for ventricle depolarization and repolarization, the so-called Q-T interval.

Table 1 – Effects of 1 weeks dietary supplementation

Groups	Respiration (breaths/min)	Heart Rate (bpm)	Q-T Interval (msec)

Treatment (DLM) pre (n=6)	26.83	121.17	223.21
Treatment (DLM) post (n=6)	23.53	110.11	242.31
Difference	DECREASE by 12% (ns)	DECREASE by 9% (ns)	INCREASE by 8.5% $P<0.01$

Table 1 presents the effects of 1 weeks dietary supplementation with DLM on the respiration and heart rate of 90-100 kg slaughter weight pigs, as well as the Q-T Interval. Values are the mean of a number of pigs, where “n” represents the number of animals per group. (ns) represents a difference between means that was not quite significant.

From Table 1, it can be seen that the 1 week’s dietary supplementation with DLM resulted in such physiological changes in these slaughter weight pigs as a reduction in the rate of respiration, a slower and calmer heart rate, and a longer Q-T interval, all of which are indicative of a relaxed physiological state. Indeed, whilst only the change in the Q-T interval is significant statistically in the current limited data set, taken as a whole these data are quite remarkable as they show that despite the considerable stress of being caught (holding rope over the nose & bodily manipulation; being chased prior to capture) and the restraint imposed by the recording sling, plus the presence of 5-6 people at close proximity, and finally electrical stimulation of L.dorsi, the treated pigs show physiological signs of being less stressed.

Thus, the methionine DLM diet clearly seems to have a calmative/anti-stress effect on these slaughter weight pigs, which were exposed to exactly the same level of handling and measurement stress as the untreated pigs.

Meat quality

METHODS

The pigs were slaughtered at a commercial slaughter house in Sweden after a resting time of 5h. At 45 minutes *post mortem*, pH (Knick portamess 751) and

temperature (digital thermometer, Weber) were measured in the *M. longissimus dorsi* at the level of the 10th rib. At 48h *post mortem*, the entire loins were dissected from the carcasses and transported to the University of Copenhagen for further measurements. Ultimate pH was measured, as well as colour by Minolta L*a*b*. Dry matter content was determined by drying muscle samples at 105°C for 24h. Slices of 3 cm thickness were cut, measured and vacuum packed before being stored for a further 7 days at 2°C. At the end of the storage period samples were heated to an internal temperature of 75°C. After being cooled down, samples were stored cold at 2°C until they were cut into slabs of 1 cm x 1 cm x 2.5 cm size for shear force measurement. For each animal, 8 specimens were measured and the mean maximum load was used for further analysis. However, in the case that any of the specimens had a maximum load which was more than 2 standard deviations from the mean, those specimens were regarded as outliers and taken out of the calculation.

RESULTS

No significant effect of the different feeding regimens could be observed on early parameters of meat quality (Table 2). None of the pigs developed the PSE syndrome as the early *post mortem* pH remained above 5.8 in all cases, although the carcass temperature was slightly elevated. This then proves that the slightly higher carcass temperature in this particular case was not due to stress during transport and/or waiting time, but rather the scalding procedure, which was performed with hot water.

Table 2 - Influence of DLM and HMTNA supplementation on meat quality parameters

	Time <i>post mortem</i>	Feeding Regimen			Statistical significance
		DLM	Control	HMTBA	
Slaughter house	45 min				
pH		6.10	6.30	6.20	n.s.

Temperature (°C)		39	38	39	n.s.
Laboratory	2 days				
pH		5.50	5.40	5.40	n.s.
Colour (units)					
Minolta L*		55.75	54.64	56.89	n.s.
Minolta a*		6.69	7.56	7.58	n.s.
Minolta b*		2.92	3.00	3.71	n.s.
Dry Matter (%)		26	26	29	n.s.
After Storage	9 days				
Maximum Load (N)		34	46	37	$P < 0.02$

All of the measurements taken at 2 days *post mortem* are within the “normal” range, moreover, none of the *M. longissimus dorsi* showed signs of DFD meat, and the colour measurements were also found to be normal.

The slightly higher ultimate pH of the DLM group is an advantage on terms of processed products, while the lower pH of the other groups might be expected to give the meat a better flavour.

The higher dry matter content of the HTMBA group might be explained in terms of a higher intramuscular fat content, as this group showed higher gains during the finishing period.

10

After 7 days of storage, both of the groups that had been fed the high methionine supplemented diet showed evidence of a superior eating quality compared with that of the control group (see Figure 3). This is indicated by the lower shearforce values of the DLM (1) and HMTBA (3) groups compared with that of the controls (2).

15

CONCLUSIONS

sEMG measurements

As a result of the sEMG data, a high methionine (DLM (i.e. DL-methionine) or HMTBA (i.e. 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid)) diet has to be administered to pigs, one to two weeks prior to 'stressful' situations such as weaning, relocation and slaughter; in order to minimize the damage resulting from the oxidation of methionine residues in muscle membrane channels, essential in the normal functioning of muscle and in order to provide a calmative for pigs prior to stressful situations.

Respiration & sECG analysis

- 10 One week dietary supplementation with DLM resulted in such physiological changes in the slaughter weight pigs as; 1) a reduction in the rate of respiration, 2) a slower and calmer heart rate, and 3) a longer Q-T interval, all of which are indicative of a relaxed physiological state.

Clearly the methionine diet has calmative effects/benefits for those needing to transport slaughter pigs any distance to the abattoir.

Meat quality

Methionine supplementation during the finishing period of fattening pig production results in superior textural properties of the meat after storage.

CLAIMS

1. A method for improving the tenderness of meat which comprises the step of administering methionine as a pre-slaughter diet to an animal.
- 5 2. The method according to claim 1, wherein the meat is avian meat or fish meat or non-human mammal.
3. The method according to any of claims claim 1-2, wherein the meat is selected from the group consisting of pork, beef, hen, chicken, turkey, fish.
- 10 4. The method according to any of claims 1-3, wherein the methionine is administered in the form of a methionine supplementation formulation.
5. The method according to any of claims 1-4, wherein the administered methionine is in the form of L-methionine, or in the form of synthetic methionine sources such as DLM (i.e. DL-methionine) or all of its salt forms, its analogues (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid or all
15 its salt forms), its derivatives (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters), or mixtures thereof.
6. The method according to any of claims 1-5, wherein the methionine is administered as 0.1-1g of total methionine per kg body weight per day
20 pre-slaughter to the animal.
7. The method according to any of claims 1-5, wherein the methionine is administered to the animal as 0.3-0.6% above recommended daily dose.
8. The method according to any of claims 1-7, wherein the methionine is administered on day -30 to -1 pre-slaughter.
- 25 9. The method according to any of claims 1-8, wherein the administration of methionine is done orally to the animal.
10. An animal pre-slaughter diet comprising methionine and wherein the methionine is fed on day -30 to -1 pre-slaughter in a dose of 0.1-1g per kg body weight per day to the animal or in a dose of 0.3-0.6% above
30 recommended daily dose intake.
11. The pre-slaughter diet of claim 10, further comprising at least one further feedstuff to the animal.

12. Meat from a slaughtered animal, said animal being fed with a pre-slaughter diet comprising methionine according to any of claims 10-11.
13. A product comprising meat at least partially from a slaughtered animal, said animal being fed with a pre-slaughter diet comprising methionine according to any of claims 10-11.
14. Use of methionine for improving the tenderness of avian meat or fish meat or non-human mammal.
15. The use according to claim 14, wherein the methionine is in the form of L-methionine, or in the form of synthetic methionine sources such as DLM or all of its salt forms, its analogues (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic acid or all its salt forms), its derivatives (e.g. 2-Hydroxy-4-Methyl Thio Butanoic isopropyl ester or any of other esters), or mixtures thereof.

1/1

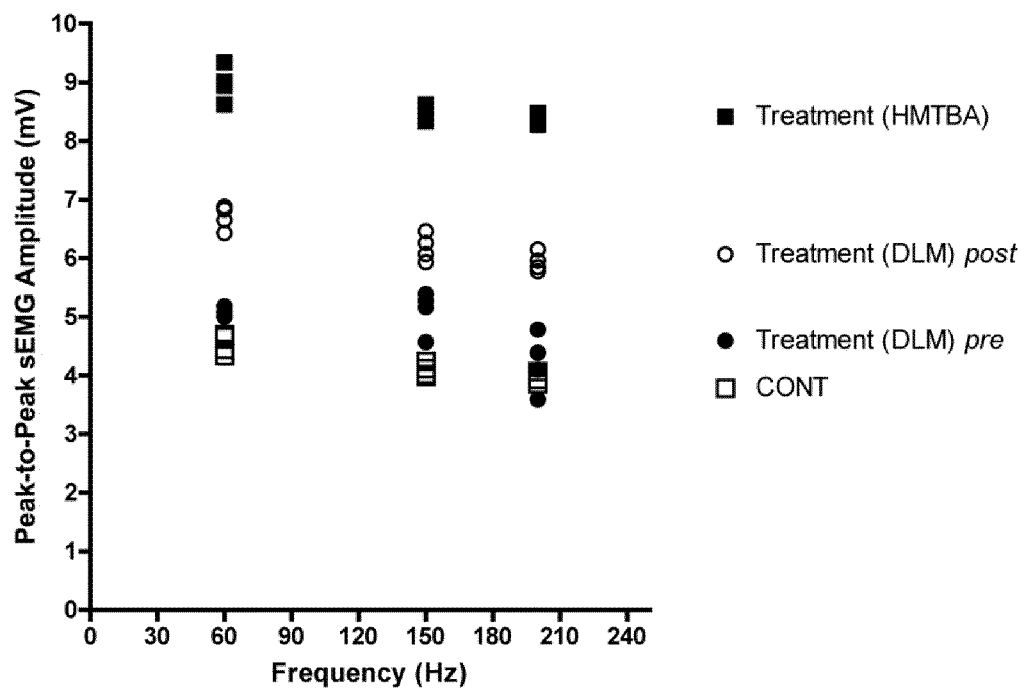


Fig.1

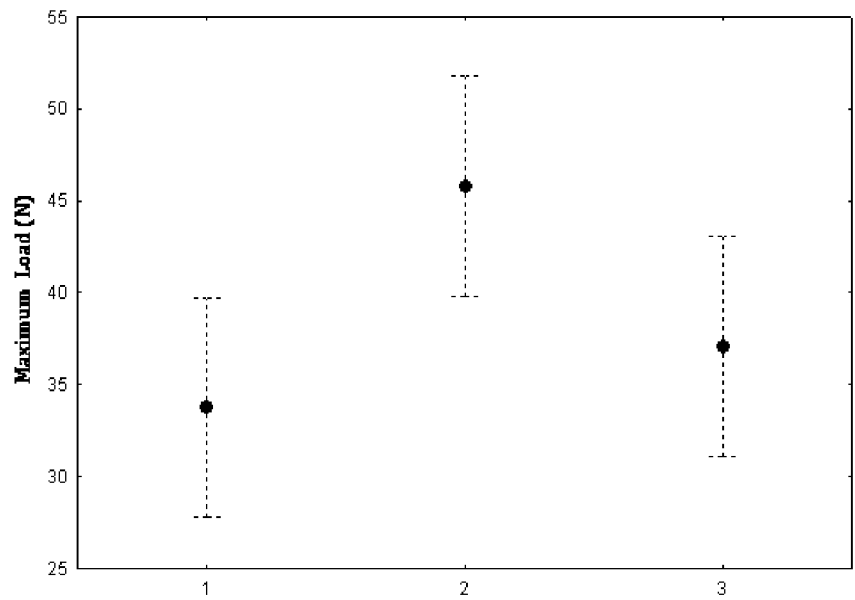


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/072241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23K1/16 A23K1/18 A23L1/318
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23K A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Week 2011 Thomson Scientific, London, GB; AN 2011-p38408 XP002692123, -& CN 102 217 731 A (GUANGDONG EVERGREEN FEED IND CO LTD) 8 June 2011 (2011-06-08) abstract ----- -/--	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 February 2013

Date of mailing of the international search report

28/02/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rinaldi, Francesco

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/072241

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N.N.: "Report N° 782", Danish Pig Production 26 February 2007 (2007-02-26), page 1, XP002692124, Retrieved from the Internet: URL: http://www.danishpigproduction.dk/Research/Research_report/Nutrition_Finishers/Report_782.html?print=yes [retrieved on 2013-02-13] the whole document -----	1-15
X	DATABASE FSTA [Online] INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANKFURT-MAIN, DE; DRBOKHLAV V ET AL: "Effect of field beans in the diet on quality of broiler meat. (translated)", XP002692125, Database accession no. FS-1987-08-S-0147 abstract & ZHIVOTNOV''DNI NAUKI, vol. 23, no. 8, 1986, page 11, Bulgaria -----	1-15
X	CN 101 664 117 A (HUAIAN WARWICK FEED DEV CO LTD) 10 March 2010 (2010-03-10) abstract -----	10-13
X	US 2005/042258 A1 (HERNANDEZ ALBERTO VAQUERO [ES] ET AL) 24 February 2005 (2005-02-24) claim 1; example 1 -----	10-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/072241

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 102217731	A	08-06-2011	NONE

CN 101664117	A	10-03-2010	NONE

US 2005042258	A1	24-02-2005	AT 339112 T 15-10-2006
		DE 60214764 T2	04-10-2007
		EP 1454537 A1	08-09-2004
		ES 2187378 A1	01-06-2003
		ES 2272722 T3	01-05-2007
		US 2005042258 A1	24-02-2005
		WO 03041511 A1	22-05-2003

1/1

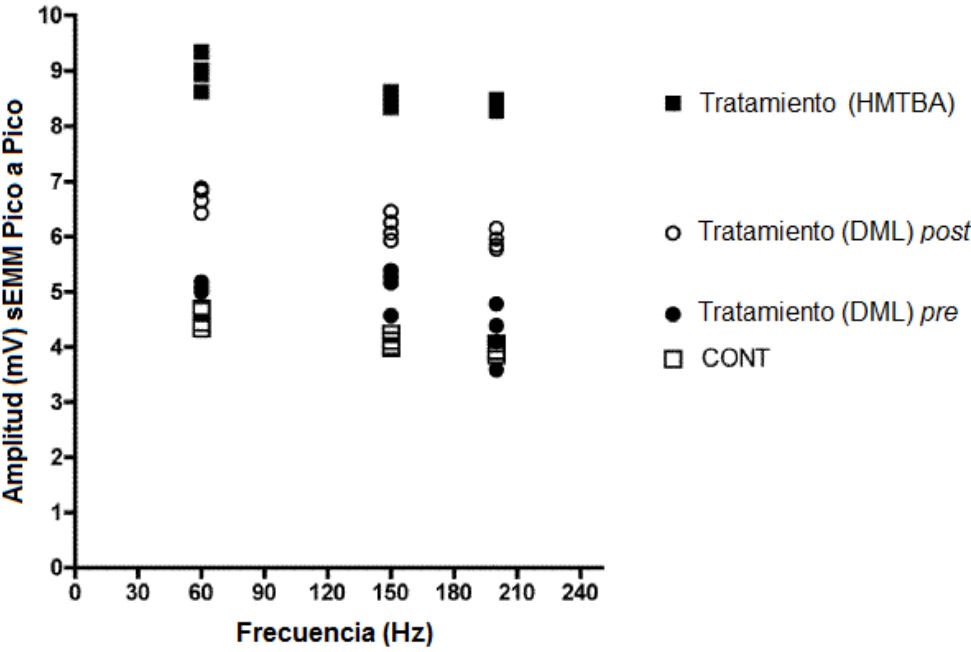


Fig.1

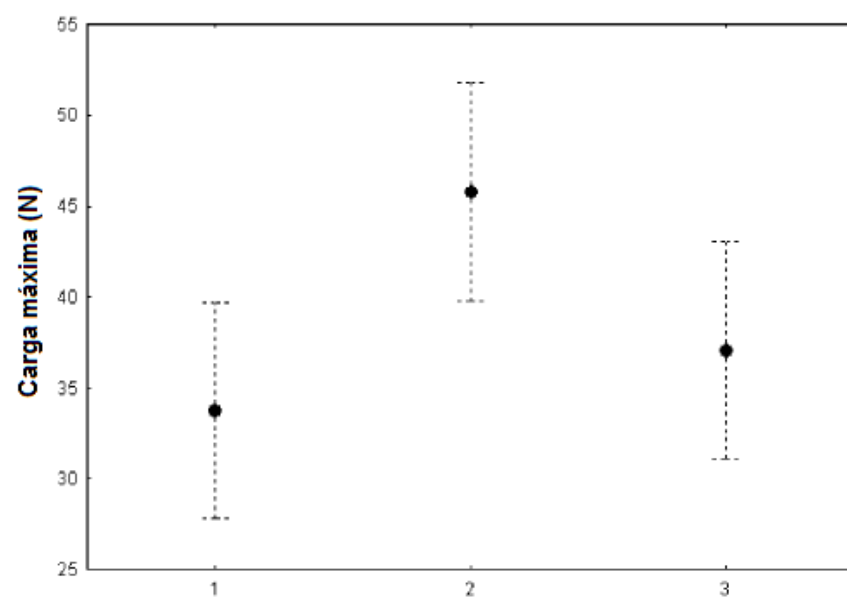


Fig. 2

COLOMBIA

PODER

El (los)

ADISSEO FRANCE SAS

Domiciliados en **Immuable Antony Parc II, 10, place du Generale de Gaulle, 92160 Antony, FR.**
Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso -administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- Para la obtención de registros sanitarios;
- Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **13 de Enero de 2010**

en **Lyon, FRANCIA**

por **ADISSEO FRANCE SAS**

Philippe Maureau - Representante Legal

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned **Adisseo France SAS**

Of Immeuble Antony Parc II
10, place du Général de Gaulle
92160 ANTONY - FRANCE

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- For the obtainment of Sanitary registrations;
- Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this January 13, 2010

in Lyon

by **Philippe MAUREAU**

Legal representative of Adisseo France SAS

(Notary shall execute on the other side)

(Consular legalization or apostille is required)

Je soussigné Me **Hervé POMMERY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de Monsieur **Philippe MAUREAU**.

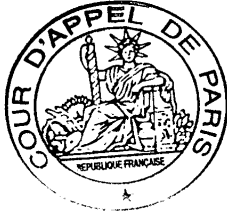
apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune
vérification de l'exactitude des faits et
actes mentionnés dans le présent document

CASTELLANOS & CO
ABOGADOS COLOMBIA

Calle 94A No. 7A-09 - P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / - Fax (571) 610 07 06 - e-mail info@castellanosysca.com

BAILLY POMMERY CAURO

Notaires



Successeurs de Maîtres BAILLY et BUCAILLE

30, rue La Boétie – 75008 PARIS

☎ 01.53.53.53.00 - Fax 01.53.53.53.01

Dossier suivi par Me Antoine BAILLY

Tel. direct assistant : 01 53 53 53 18 / Fax : 01 53 53 53 01

Mickael.fredier.75018@paris.notaires.fr

ADISSEO FRANCE SAS

989260 /AB /FM/

CERTIFICAT NOTARIAL

Je soussigné, Maître Antoine BAILLY, notaire soussigné de la Société Civile Professionnelle « BAILLY POMMERY CAURO » titulaire d'un Office Notarial à Paris (8^{ème}) 30, rue la Boétie.

CERTIFIE ET ATTESTE QUE :

- I. ADISSEO France SAS est une Société Française immatriculée au Registre du Commerce et des Sociétés à NANTERRE sous le n°439 436 569 dont le siège social est sis Immeuble Antony Parc II – 10, place du Général de Gaulle, (92160) ANTONY, France.
- II. Monsieur Philippe MAUREAU est dûment qualifié pour représenter la Société ADISSEO France SAS, signer tout document relatif au dépôt, au maintien, au retrait ou au transfert de brevets et d'une manière générale, relatif à la sauvegarde des droits de propriété industrielle de la Société ADISSEO France SAS, soit en France, soit à l'étranger, avec la faculté de substituer temporairement et pour des cas déterminés, et pour faire généralement tout ce qui sera utile en matière de brevets conformément au mandat du 15 décembre 2009 signé par Monsieur Gérard WOLFF Directeur Industriel et Technologie d'ADISSEO France SAS et le Cabinet GERMAIN & MAUREAU situé 12, rue Boileau, (69006) LYON, France.

EN FOI DE QUOI j'ai délivré le présent certificat, pour servir et valoir ce que de droit en Colombie.

Fait à PARIS,
Le 2 MARS 2010

Métro : Miromesnil – Parkings publics : 163 ou 164 Boulevard Haussmann, ou Rond-point des Champs Elysées.
Membre d'une association agréée. Le règlement des honoraires par chèque est accepté.
RCS PARIS n° D 323 377 390

BAILLY POMMERY CAUTO

Notarios

Sucesores del abogado BAILLO y BUCAILE

30, rue La Boétie -75008 PARIS

Tel. 01.53.53.5300 – Fax. 01.53.53.53.01

Asunto seguido por el doctor Antoine BAILLY

Tel. direct asistente: 01 53 53 53 18/ Fax 01 53 53 53 01

Mickael.fredier.75018@paris.notaires.fr

ADISSEO FRANCE.SAS

989260/AB/FM/

CERTIFICADO NOTARIAL

El suscrito abogado Antoine BAILLY, el suscrito notario de la sociedad civil profesional “VAILLY PROMMERY CAURO” titular de una Oficina Notarial de Paris (8º) 30, rue la Boétie.

CERTIFICA QUE:

- I. ADISSEO France SAS es una sociedad francesa matriculada al Registro de Comercio y de Sociedades de NANTERRE bajo el N° 439 436 569 cuya sede social está situada en el inmueble Anthony Parc II- 10, place du General de Gaulle, (92160) ANTHONY, Francia.
- II. El señor Philippe MAUREAU está debidamente calificado para representar la sociedad ADISSEO France SAS, firmar cualquier documento relativo al deposito, al mantenimiento, la renuncia o a la transferencia de patentes y de una manera general, relativo a la salvaguardia de los derechos de propiedad industrial de la Sociedad ADISSEO France SAS, sea en Francia, o en el extranjero, con la facultad de sustituir temporalmente y en casos



determinados y para hacer generalmente todo lo que sea útil en materia de patentes conforme al mandato del 15 de diciembre de 2009 firmado por el señor Gérard WOLF Director Industrial y Tecnología de ADISSEO France SAS y le Cabinet GERMAIN & MAUREAU situado en 12, rue Balleau, (69006) LYON , Francia.

EN FE DE LO CUAL expido el presente certificado, para servir y valer lo que es de derecho en Colombia.

Dado en PARIS

El 2 de MARZO DE 2010

Clemencia Paredes Tejada
TRADUCTORA OFICIAL

ENGLISH - FRENCH - SPANISH
ANGLAIS - FRANÇAIS - ESPAGNOL

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1 REPUBLICA FRANCESA

EL PRESENTE ACTO PÚBLICO

2 HA SIDO FIRMADA POR BAILLY

3 ACTUANDO EN CALIDAD DE NOTARIO

4 LLEVA EL SELLO DE LA NOTARIA

CERTIFICADO

5 EN PARIS

6 EL 2 DE MARZO DE 2010

7 POR EL PROCURADOR GENERAL ANTE LA CORTE DE APELACIONES DE
PARIS

8 BAJO EL NÚMERO **17088**

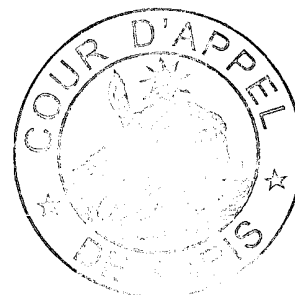
9 SELLO DE LA CORTE DE APELACIONES DE PARIS

10. FIRMA:

JEAN MARTIN – ABOGADO GENERAL

La apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma y el sello del documento. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Republica francesa apruebe su contenido.





APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par M^e POHHERY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de Son étude

Attesté

5. à Paris

16 FEV. 2010

6. le

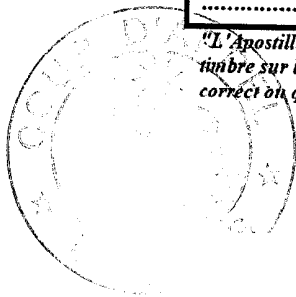
7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

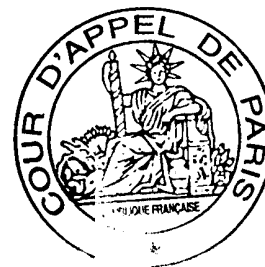
8. sous n° 11903

9. Sceau :

10. Signature :

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"





APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par *M^e BAILLY*

3. agissant en qualité de *Notaire*

4. est revêtu du sceau/timbre de *Son étude*

Attesté

5. à Paris

02 MARS 2010

6. le

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° *17088*

9. Sceau : *[Signature]*

10. Signature
Jean MARTIN
Avocat général

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"

