



**ALTA PRESIÓN ISOSTÁTICA:
ESTUDIO DEL COLOR Y DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA
DE PRODUCTOS AVÍCOLAS**



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

Elena Beltran Torres

Fotografía de portada:
"Ángel-pollo" de Zepol. Técnica mixta.



Facultat de Veterinària
Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Universitat Autònoma de Barcelona

ALTA PRESIÓN ISOSTÁTICA: ESTUDIO DEL COLOR Y DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE PRODUCTOS AVÍCOLAS

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

ELENA BELTRAN TORRES
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2004

Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA)



AGRADECIMIENTOS

A la Montse i la Reyes (les “jefas”), per donar-me l'oportunitat de viure l'experiència de la tesi. Per les seves idees i consells, per haver confiat en mi, per haver-me deixat aprendre i lluitar, per el recolçament científic i “espiritual”, per comprendre els encerts i els errors.

A en Josep Yuste i a les seves formigues, per les seves aportacions infinites i essencials. Per suportar les meves *neures* a Barcelona i a Turquia. Aquest treball no s'hagués escrit sense la seva col·laboració.

A la Marta Capellas, per la seva humanitat i generositat. Pel seu exemple com a model de constància, paciència i bon fer. Per ajudar-me a no perdre el nord.

To Jacob Holm Nielsen for his enthusiastic way of understanding life and science. It was a pleasure to learn so many things from you and the other people in your lab.

A Martín por su compañerismo y por ayudarme a reír en los momentos de pánico.

Als tots els habitants de “Tecno” de la UAB i rodalies: Edu, Ramón, Joan Miquel, Jordi, Lamy, Isha, Pili, Toni, Vicky, Ventura, Marta, Àngels, Bibi, Sònia, Tomás, Xavi, Laura, Julia..... Moltes gràcies a tots per per ser-hi quan va caldre.

A María, por estar cada día más cerca.

A Silvia, por estos 30 años de amistad. Por saber quién soy.

A Alicia, por sonreír y seguir adelante.

A en Dani i la Susan per haver-se implicat tant al *sprint final*.

A todos los faros que me han guiado.

A en Pep per volar al meu costat i regalar-me il·lusió cada dia.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación aportada por:

- Generalitat de Catalunya, programa de formación de investigadores. Beca nº1999FI00771 (1999-2002).
 - Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (España). Proyecto de investigación ALI98-0508-C-02-01.
-

MONTSERRAT MOR-MUR FRANCESCH y REYES PLA SOLER,
Profesoras Titulares de Tecnología de los Alimentos de la Universitat
Autònoma de Barcelona,

HACEN CONSTAR: Que la licenciada en Veterinaria y en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos Elena Beltran Torres ha realizado, bajo su
dirección, el trabajo titulado “Alta presión isostática: estudio del color y de la
fracción lipídica de productos avícolas” que presenta para optar al grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Bellaterra
(Cerdanyola del Vallès), el 1 de Octubre de 2004.

Montserrat Mor-Mur Francesch

Reyes Pla Soler

A mis padres, por educarme con coherencia y libertad

“Who are YOU?’ said the Caterpillar. This was not an encouraging opening for a conversation. Alice replied, rather shyly, ‘I--I hardly know, sir, just at present-- at least I know who I WAS when I got up this morning, but I think I must have been changed several times since then.’”

Lewis Carroll, “Alice in Wonderland”

ÍNDICE

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS	3
1.2. PLAN DE TRABAJO	7
2. <u>ANTECEDENTES</u>	9
2.1. PERSPECTIVAS DE PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE ALIMENTOS EN EL SIGLO XXI: CARNE Y PRODUCTOS AVÍCOLAS	12
2.2. OXIDACIÓN LIPÍDICA	15
2.2.1. DESCRIPCIÓN	15
2.2.2. FACTORES INFLUYENTES	18
2.2.3. MECANISMOS DE CONTROL	23
2.2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS	26
2.3. ACCIÓN DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LOS ALIMENTOS	36
2.3.1. DEFINICIONES. IMPACTO DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS	36
2.3.2. APLICACIONES ACTUALES	37
2.2.3. EFECTOS GENERALES	39
3. <u>TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN</u>	43
3.1. LIPID OXIDATION AND COLOUR IN PRESSURE- AND HEAT-TREATED MINCED CHICKEN THIGHS	45
3.2. LIPID OXIDATION OF PRESSURIZED AND COOKED CHICKEN: ROLE OF SODIUM CHLORIDE AND MECHANICAL PROCESSING ON TBARS AND HEXANAL VALUES	53
3.3. USE OF ANTIOXIDANTS TO MINIMIZE RANCIDITY IN PRESSURIZED AND COOKED CHICKEN SLURRIES	63
3.4. COLOR AND LIPID STABILITY OF PRESSURE- AND HEAT-TREATED EGG YOLK	73

4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	107
4.1. COLOR	109
4.2. OXIDACIÓN LIPÍDICA	112
4.2.1. CARNE DE POLLO	112
4.2.2. YEMA DE HUEVO	119
5. <u>CONCLUSIONES</u>	123
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	129
7. <u>ANEXO: RESULTS AND DISCUSSION</u>	141

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

El *Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments* (CERPTA), vinculado a la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB), participa desde 1992 en proyectos sobre alta presión isostática aplicada a alimentos. Con la obtención, en dicho año, de financiación para el desarrollo del proyecto titulado “*High hydrostatic pressure treatment; its impact on spoilage organisms, biopolymer activity, functionality and nutrient composition of food systems*” (AIR-CT92-0296), se inició la línea de investigación en productos avícolas. En un primer momento se plantearon dos áreas de estudio experimental:

- Capacidad bactericida de los tratamientos por alta presión aplicados a productos avícolas.
- Características físico-químicas de los productos avícolas tratados por alta presión.

Los resultados de los primeros experimentos corroboraron que los tratamientos por alta presión inactivan a los microorganismos eficazmente (Ponce, Pla, Capellas, Guamis y Mor-Mur, 1998; Ponce, Pla, Mor-Mur, Gervilla y Guamis, 1998; Ponce, Pla, Sendra, Guamis y Mor-Mur, 1998; Yuste, Mor-Mur, Capellas, Guamis y Pla, 1998; Ponce, Pla, Sendra, Guamis y Mor-Mur, 1999; Yuste, Mor-Mur, Capellas y Pla, 1999a y 1999b; Yuste, Pla, Capellas, Ponce y Mor-Mur, 2000; Yuste, Pla y Mor-Mur, 2000; Yuste, Pla, Capellas y Mor-Mur, 2001). Asimismo, se observó que los cambios de las propiedades físicas del huevo líquido provocados por las altas presiones no merman el uso potencial de los ovoproductos presurizados (Ponce, 2000), mientras que el aspecto de la carne de

ave sí se modifica al ser sometida a este tratamiento (Yuste, Mor-Mur, Capellas, Guamis y Pla, 1999; Yuste, 2000; Mor-Mur y Yuste, 2000a y 2000b).

Con la concesión del proyecto “*Desenvolupament de productes avícoles mitjançant alta pressió hidrostàtica*”, de la convocatoria de ayudas a grupos emergentes de la Universitat Autònoma de Barcelona (1999), se inició el desarrollo de nuevos ovoproductos mediante la aplicación de altas presiones (Ponce, Sendra, Beltran, Yuste, Mor-Mur y Pla, 2002).

El presente trabajo se ha realizado con la financiación obtenida del proyecto “Estudio de la fracción lipídica en productos avícolas tratados por alta presión isostática” (ALI98-0508-002-01), integrado en el “Plan Nacional de I+D”. El **objetivo general** de este proyecto de tesis doctoral ha sido **evaluar los parámetros físicos y químicos de los lípidos de la carne de pollo y la yema de huevo tratados por alta presión, así como el color de estas materias primas para garantizar su calidad sanitaria y su conservación en el tiempo.**

Es necesario saber cómo afectan los tratamientos por alta presión a los lípidos, pues la oxidación de estas moléculas es una de las principales causas de pérdida de calidad en las carnes y otros alimentos (Kanner, 1994; Gray, Gomma y Buckley, 1996; Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry y Buckley, 1998). Las alteraciones organolépticas de los alimentos oxidados son las que provocan el rechazo del producto por parte del consumidor. Sin embargo, el control de la oxidación lipídica pretende no sólo mejorar la aceptación de los alimentos, sino también evitar la aparición de compuestos de oxidación con un posible efecto tóxico sobre el organismo.

Al iniciar este trabajo de tesis, varios autores habían indicado que los tratamientos de alta presión inducen cierta oxidación lipídica en diferentes alimentos; sin embargo, no se habían publicado datos sobre la estabilidad de los lípidos de la carne de pollo ni de la yema de huevo. Los primeros trabajos referentes a los efectos de las altas presiones sobre los lípidos de alimentos se realizaron con pescado y atribuyen la desestabilización lipídica a la acción del hierro hemínico (Tanaka, Xueyi, Nagashima y Taguchi, 1991; Ohshima, Ushio y Koizumi, 1993). No obstante, estudios posteriores en carne de cerdo apuntaron que las hemoproteínas no actúan como único agente iniciador (Cheah y Ledward, 1995 y 1996). Más tarde, se propuso que la iniciación de la oxidación puede originarse en la fracción no soluble del músculo (Cheftel y Culioli, 1997). El único

experimento que se había llevado a cabo con productos avícolas, con anterioridad al inicio del presente trabajo, empleó carne de pavo (Dissing, Bruun-Jensen y Skibsted, 1997) y en él se equiparaban, en términos de oxidación lipídica, los efectos de un tratamiento por presión (500 MPa/30 min/10°C) con los de uno de cocción (100°C/10 min). La evaluación de la acción de algunos antioxidantes sobre carne de cerdo presurizada hizo pensar que los metales de transición son los iniciadores de la oxidación lipídica (Cheah y Ledward, 1997). Los efectos de las altas presiones sobre los aceites dependen del origen de éstos, su composición y su calidad inicial; además, algunos de ellos se alteran más tras la aplicación de tratamientos convencionales que tras la acción de la presión (Severini, Romani, Dall'Aglio, Rovere, Conte y Lericci, 1997).

Teniendo en cuenta estos resultados previos, se programaron cuatro experimentos para conocer con más profundidad los efectos de las altas presiones sobre la estabilidad lipídica de la carne de pollo y los huevos.

El **primer experimento** (líneas de color rojo en la figura del apartado 1.2) se realizó con carne de muslo de pollo, para evaluar los cambios de color y la producción sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en muestras sometidas a las siguientes variables:

- tratamientos: presión y/o calor;
- atmósfera ambiente: con / sin vacío;
- almacenamiento en refrigeración: tiempo.

En el **segundo experimento** (líneas de color verde en la figura del apartado 1.2) se trató carne de pechuga de pollo por ser una materia prima con masas musculares bien diferenciadas del resto de tejidos y con mayor contenido en fosfolípidos (ricos en ácidos grasos poliinsaturados) en su grasa, que podrían incrementar la susceptibilidad de esta fracción a la oxidación provocada por la alta presión. En este caso, la estabilidad lipídica de muestras de carne de pollo almacenadas en refrigeración en contacto con el aire, se analizó mediante dos técnicas: test del ácido tiobarbitúrico (TBA) y microextracción en fase sólida (SPME). Una estancia de tres meses en el Departamento de "Food Science" del *Danish Institute of Agricultural Sciences* (Foulum, Dinamarca), previa a este segundo experimento, permitió el aprendizaje de la SPME, que más tarde se puso a punto en los laboratorios del CERPTA. Las variables estudiadas en este experimento fueron:

- ingrediente: con / sin cloruro sódico;
- acción mecánica: previa / posterior al tratamiento;
- tratamiento: presión o calor;
- almacenamiento en refrigeración: tiempo.

El **tercer experimento** (líneas de color azul en la figura del apartado 1.2) tuvo como principal objetivo determinar la efectividad de diversos antioxidantes en el grupo de muestras cuyos lípidos habían presentado la mayor inestabilidad en el segundo experimento. Se trataron por presión o calor muestras de carne de pechuga de pollo, a las que previamente se había añadido NaCl y un antioxidante, y aplicado una acción mecánica. También en esta ocasión las muestras refrigeradas se mantuvieron en contacto con la atmósfera. Las variables estudiadas fueron:

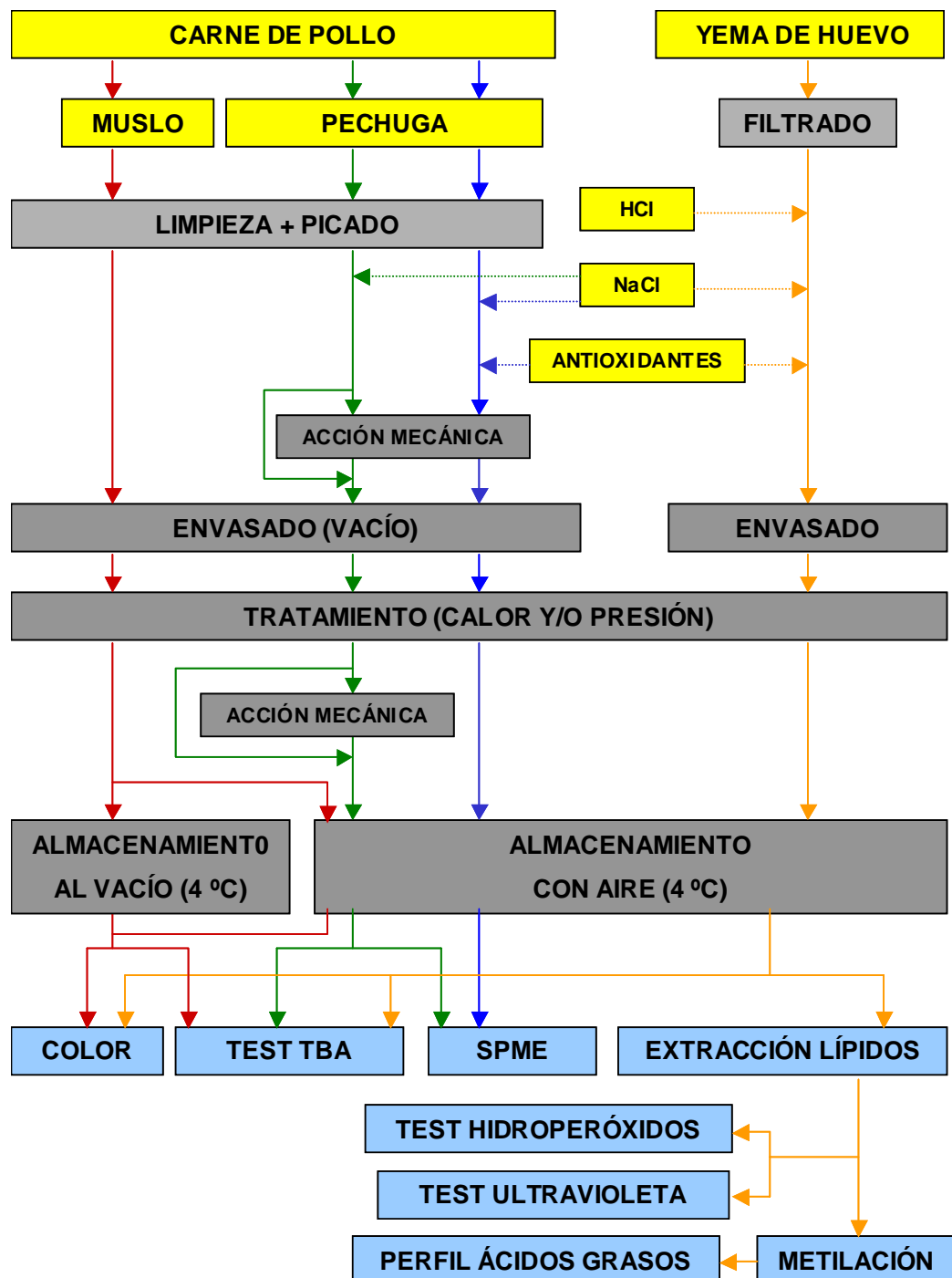
- antioxidante: tipos y dosis;
- tratamiento: presión o calor;
- almacenamiento en refrigeración: tiempo.

Finalmente, el **cuarto experimento** (líneas de color amarillo en la figura del apartado 1.2) se centró en la yema de huevo. Este trabajo se planteó como un estudio más amplio que los anteriores para valorar los cambios del color y el perfil lipídico, así como la estabilidad lipídica. El almacenamiento de las muestras se realizó en refrigeración y en contacto con la atmósfera. Las variables evaluadas en este caso fueron:

- ingrediente: con / sin cloruro sódico;
- pH: acidificación;
- tratamiento: presión o calor;
- antioxidante: tipo y dosis;
- almacenamiento en refrigeración: tiempo.

1.2. PLAN DE TRABAJO

Las materias primas empleadas en los diversos experimentos se obtuvieron de un proveedor que garantizaba una cierta homogeneidad de las mismas (Corporación Alimentaria Guissona, S.A.). A continuación, se presenta el esquema general de los cuatro experimentos que conforman este trabajo de tesis.



2. ANTECEDENTES

La mecanización de la producción de alimentos se extendió durante el siglo XX y, en la actualidad, en las zonas industrializadas del planeta, el consumidor accede mayoritariamente a alimentos transformados en plantas de procesado. Así, mientras crece la demanda de productos frescos, naturales y preparados para el consumo, han quedado obsoletas las teorías que apostaban por la transformación de los alimentos en píldoras que garantizaran el aporte nutricional al organismo. La tendencia actual es la contraria: se pretende otorgar ciertas propiedades terapéuticas a los alimentos, de manera que con una adecuada selección de los mismos se promueva el estado de salud del individuo. El desarrollo de nuevos alimentos de alto valor añadido que satisfagan las necesidades de los consumidores es un reto para la industria alimentaria del siglo XXI.

En nuestros días, la seguridad alimentaria es el atributo de calidad más valorado por la sociedad. Durante los próximos años, van a seguir produciéndose importantes cambios demográficos (aumento de la población mundial, concentración de los habitantes en grandes ciudades, envejecimiento, etc.), ambientales (industrialización) y sociales (desigualdad, migración, etc.) que van a hacer necesaria la cooperación internacional para crear sistemas de vigilancia que garanticen la seguridad alimentaria (Käferstein y Abdussalam, 1999).

Se deberá asegurar la inocuidad de los alimentos desde la granja hasta la mesa, a la vez que los sistemas de producción deberán optimizarse para poder asumir el abastecimiento de la población mundial. Las energías alternativas, y las nuevas tecnologías de procesado posibilitarán la elaboración de alimentos más económicos energéticamente y más adaptados a las necesidades de los consumidores. Es necesario investigar los efectos de estas nuevas tecnologías sobre los alimentos, para poderlas aplicar en la industria de manera ágil y con las máximas garantías.

2.1. PERSPECTIVAS DE PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE ALIMENTOS EN EL SIGLO XXI: CARNE Y PRODUCTOS AVÍCOLAS

Está previsto que la demanda mundial de carne supere los 300 millones de toneladas en 2020 y, aunque actualmente la producción de cerdo representa un 40% del mercado global de la carne, se espera un incremento espectacular de la producción de carne de ave en las próximas dos décadas, que la convertirá en la carne más importante del mercado (Bilgili, 2002).

El sector cárnico español, que constituye un 16,4% de las industrias agroalimentarias del Estado, ha sufrido una importante transformación estructural en los últimos años, que ha forzado la desaparición de las pequeñas explotaciones y el agrupamiento de las medianas en cooperativas que realizan un mayor control sobre el conjunto del proceso. Los datos de 2000 sobre producción de carne en España indican que los 4,9 millones de toneladas producidas se reparten como sigue: 59% porcino, 20% aviar, 13% bovino, y 8% ovino y caprino (Cruz, 2002).

La producción, la comercialización y el consumo mundiales de carne de ave vienen aumentando un 6% anual desde mitad de los 80 (Bilgili, 2002). Esto se puede atribuir a diversos factores: métodos de producción intensivos, integración de las compañías, disponibilidad de piensos a precios competitivos, mecanización del procesado, desarrollo de productos atractivos para el consumidor, expansión de las cadenas de comida rápida, mejora de los sistemas de distribución-conservación, desarrollo de las compañías internacionales, y un indiscutible aumento de la demanda de carne de ave. En España se produjo un ligero descenso (1,6%) de la producción de carne de ave en 2000, que se recuperó totalmente en 2001 (Cruz, 2002).

Los productos de carne de ave son muy populares en todo el mundo ya que además de que su consumo no presenta ningún tipo de impedimento cultural o religioso, son considerados productos sanos, nutritivos, seguros y económicos cuando se los compara con la oferta global del mercado de carne (Bilgili, 2002). En una encuesta realizada por el grupo SADA, P.A. S.A. a consumidores españoles se concluye que el atributo más relevante en la valoración de la carne de pollo es la seguridad del producto, mientras que el precio ocupa el lugar menos importante (SADA, P.A. S.A., 2002).

En la actualidad, la industria produce una gran variedad de productos avícolas, y aunque los consumidores de los países en desarrollo compran mayoritariamente productos poco procesados, los de los países industrializados exigen productos muy elaborados y la aparición constante de novedades en el mercado (Bilgili, 2002). Un 65% de la carne que se consume en España se ha sometido a algún tipo de transformación. Pese a que la mayor parte de los productos elaborados se adquiere en grandes superficies, la carne fresca continúa comprándose sobretodo en tiendas tradicionales (Cruz, 2002).

A principios del siglo XX, la producción de huevos en España era sólo un complemento de la explotación agropecuaria y, aunque en los años 30 se empezó a desarrollar localmente, no fue hasta los 50 cuando se inició la verdadera expansión del sector, que continuaría durante los 60 y los 70. El exceso de producción junto a la escasez de exportaciones, entre otros factores económicos, deterioraron la situación a finales de los 70, y los hechos se agravaron con el descenso en consumo de huevos que se produjo en la década de los 80 (Cepero, 2001). Las profesiones médica y científica emitieron informes sobre el huevo durante los 70, en los que se relacionaba su consumo con la aparición de enfermedades cardiovasculares. Este hecho, junto con el temor a las infecciones alimentarias causadas por *Salmonella* spp., originó una disminución del consumo de huevos que no se recuperó (o estabilizó, en el caso particular de España) hasta mediados de los 90 (Codony, 2001). Actualmente, se valoran de manera muy positiva un gran número de propiedades de este alimento, y se ha descrito que el consumo de un huevo al día no incrementa los niveles de colesterol (Hu, Stampfer, Rimm, Manson, Ascherio, Colditz, Rosner, Spiegelman, Speizer, Sacks, Hennekens y Willett, 1999).

La producción de huevos en España se realiza mayoritariamente por empresas pequeñas y medianas de capital nacional. Durante 2002, se produjeron 971,59 millones de docenas de huevos y se estima unas previsiones de crecimiento para el 2003 de un 4% debido al aumento de un 7% del censo de ponedoras. Desde el ingreso en la UE, la producción de huevos de consumo en España ha aumentado un 18% (Álvarez, 2003).

El consumo *per capita* de huevos con cáscara fue de 223, 216 y 214 en 2000, 2001 y 2002, respectivamente. Se estima que el consumo general de huevos ha aumentado durante los últimos años, y el descenso observado entre 2001 y 2002 podría justificarse por un incremento del consumo de ovoproductos (IEC Review, 2003).

El futuro de los productos avícolas se fundamenta en el desarrollo de nuevos alimentos que satisfagan las necesidades de los consumidores, y que sean de fácil preparación, larga vida útil y alto valor añadido.

2.2. OXIDACIÓN LIPÍDICA

2.2.1.- DESCRIPCIÓN

La oxidación lipídica es una de las principales causas de deterioro de los alimentos, especialmente en el caso de las carnes procesadas, ya que produce cambios notables del flavor (frescura, gusto, aroma y olor), la textura (pérdidas por goteo), el valor nutritivo (pueden generarse compuestos tóxicos a largo plazo) y el color (Kanner, 1994; Gray y col., 1996; Morrisey y col., 1998). La reacción, que es posible inhibir o retardar química y tecnológicamente, puede producirse por: acción de radicales libres, acción de lipooxigenasas y/o mecanismos de fotooxidación. Son muchos los sistemas catalíticos de oxidación de los lípidos: luz, temperatura, enzimas, metales, metaloproteínas y microorganismos (St. Angelo, 1996).

a) Etapas de la reacción de oxidación lipídica

El proceso de oxidación lipídica generado por radicales libres es el más estudiado hasta la fecha y el de mayor importancia en los alimentos de origen animal. Se puede esquematizar en tres etapas.

Primero, se produce la **iniciación** que consiste en la formación de radicales libres en la estructura lipídica. Esta etapa resulta confusa porque la formación espontánea de radicales libres y la reacción directa de los ácidos grasos poliinsaturados con el oxígeno molecular son procesos termodinámicamente desfavorables (Gray y col., 1996). Hoy por hoy, se desconoce el origen del primer radical de la reacción, pero parece que el proceso podría activarse mediante la temperatura, el oxígeno singlete, los fotosensibilizadores, la reducción fisiológica de oxígeno a radical superóxido (O_2^*) o las radiaciones (St. Angelo, 1996). El oxígeno ataca con más facilidad las posiciones adyacentes a los dobles enlaces, y son muy sensibles los ácidos grasos con más de un sistema pentadiénico no conjugado (Nawar, 1998). La acción de los metales de transición, entre los que debe destacarse el hierro, es determinante en la generación de moléculas capaces de secuestrar un protón de los ácidos grasos poliinsaturados (Gutteridge y Halliwell, 1990; Kanner, Harel y Granit, 1992). La ferritina muscular es una proteína que se caracteriza por ser una de las principales fuentes de hierro de la carne y juega un papel importante en la iniciación de la lipooxidación de los alimentos (Kanner y Doll, 1991).

La segunda etapa consiste en la **propagación** de la oxidación lipídica. Los radicales libres reaccionan con el oxígeno y se transforman en radicales peróxido, que evolucionan a hidroperóxidos y a nuevos radicales que pueden seguir extendiendo la reacción (Zumalacárregui, Domínguez y Mateo, 2000). Los hidroperóxidos son moléculas inodoras, muy inestables, que se descomponen en diversos productos secundarios de la oxidación (aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos) que afectan negativamente al flavor de los alimentos (St. Angelo, 1996). De todos ellos, los compuestos carbonílicos son los que tienen mayor impacto sobre el flavor de los alimentos, especialmente los aldehídos por su abundante presencia y su bajo umbral de percepción (Gray y col., 1996).

Por último, durante la etapa de **finalización**, los radicales presentes se neutralizan entre ellos mismos o con otras moléculas y la reacción se va ralentizando hasta detenerse. Los compuestos de oxidación desaparecen, entonces, a mayor velocidad de la que se han originado.

b) Entorno de las reacciones de oxidación lipídica

La oxidación de los lípidos puede producirse en diversos momentos del procesado global de un alimento. Es necesario minimizar la reacción desde las fases más tempranas de la cadena de producción de los alimentos para que el producto final sea lo más estable posible frente al deterioro oxidativo.

Fase biológica.- La estabilidad oxidativa del músculo esquelético depende de la composición, la concentración y la reactividad de: los sustratos de la oxidación, los catalizadores de la oxidación y los antioxidantes (Decker y Xu, 1998). Las células musculares están continuamente bajo la acción de factores estresantes, entre los que cabe destacar las llamadas especies de oxígeno reactivas (ROS). Estas ROS se originan accidental o deliberadamente, y entre ellas se encuentran radicales libres con uno o más electrones desapareados: hidroxilo [HO^{\bullet}], anión superóxido [$\text{O}_2^{\bullet-}$], compuestos orgánicos (peroxi [ROO^{\bullet}], alcoxi [RO^{\bullet}]) y moléculas como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso que contienen grupos con oxígeno activo (Kehrer, 1993; Kehrer y Smith, 1994). El sarcoplasma contiene compuestos reductores que inhiben parcialmente la peroxidación lipídica de la membrana iniciada por el ciclo hierro-redox, e inhiben totalmente la peroxidación lipídica catalizada por la metamioglobina que ha sido activada por el peróxido de hidrógeno (Kanner y col., 1991). La acción de las ROS sería letal si no existieran mecanismos celulares de defensa frente a la oxidación como: enzimas

(superoxidodismutasa, catalasa, glutationperoxidasa, etc.), proteínas quelantes (transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, carnosina, etc.), retinol (limita la liberación de hierro libre), o antioxidantes interruptores de la reacción en cadena (tocoferol, ascorbato, carotenoides, etc.). Estos mecanismos contribuyen a conservar el equilibrio necesario para mantener la vida (Morrisey y col., 1998). En los seres vivos, existe un equilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivas y los mecanismos de defensa frente a la oxidación. Cualquier factor que cause el desequilibrio de este sistema facilita la oxidación de los lípidos. El estrés *ante-mortem* promueve la inestabilidad lipídica del músculo (Gray y col., 1996).

Fase *post-mortem*.- Tras el sacrificio, los sistemas celulares antioxidantes son ineficaces y la oxidación lipídica progresa. La sangre deja de fluir, los nutrientes no se distribuyen y se inicia el metabolismo anaeróbico (Morrisey y col., 1998). La estabilidad del músculo depende de la cantidad de compuestos de la oxidación formados en un primer momento y de la implicación de los iones metálicos en el proceso. Además, existen ciertos factores que determinan la susceptibilidad a la lipooxidación: especie, dieta, sexo, edad, localización anatómica, composición y contenido en fosfolípidos (Kanner, 1994).

Un descenso muy rápido del pH de la carne, ciertas temperaturas de las canales y algunas técnicas de tenderización pueden provocar la liberación de iones metálicos (Morrisey, Buckley, Sheehy y Monahan, 1994). La oxidación lipídica se inicia en los fosfolípidos de la membrana celular mediante un mecanismo no totalmente dilucidado (Gray y col., 1996). La fosfatidiletanolamina es un fosfolípido muy involucrado en la lipooxidación. La fosfatidilcolina y la fosfatidilserina son muy ricas en ácidos araquidónico, dodecatetraenoico, dodecapentaenoico y dodecahexaenoico, de manera que se considera que estos fosfolípidos son los responsables de la producción de la mayoría de sustancias reactivas frente al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en huevo, corazón e hígado de pollo (Pikul y Kummerow, 1991). El citoplasma contiene antioxidantes y prooxidantes que deben valorarse conjuntamente para poder estimar la oxidación lipídica del músculo (Kanner, 1994).

Fase de procesado.- Es importante que las materias primas a procesar presenten una buena estabilidad lipídica. Para ello es necesario que la oxidación de los lípidos haya sido mínima en las dos fases previas. Sin embargo, durante la elaboración de los alimentos se puede provocar grandes alteraciones en materias primas de muy buena calidad. La intensidad de la oxidación lipídica en esta fase depende de: composición y

frescura de la carne, deshuesado, picado, aditivos, emulsionado, tratamiento por calor o equivalente y envasado. La cocción desorganiza profundamente la estructura celular del músculo y desnaturaliza las proteínas, de manera que una parte del hierro ligado a ellas se libera a la par que se inactivan las enzimas antioxidantes (Decker y Xu, 1998). Morrissey y col. (1998) indican que en esta fase el hierro liberado de estructuras moleculares complejas (hemoglobina, mioglobina, ferritina o hemosiderina) cataliza la oxidación lipídica. Todas las operaciones que comportan una disminución del tamaño de partícula favorecen el contacto entre los catalizadores y los lípidos e introducen oxígeno en los tejidos anteriormente anaeróbicos (Decker y Xu, 1998).

En el caso del huevo, pese a la gran estabilidad de sus lípidos, la aplicación de altas temperaturas de procesado facilita su oxidación (Galobart, Barroeta, Baucells y Guardiola, 2001).

Los *warmed over flavours* (WOF), descritos por Tim y Watts (1958), se generan durante el procesado de los alimentos y reflejan el deterioro del flavor de la carne. Los fosfolípidos, sobretudo la fosfatidiletanolamina, son los principales causantes de la formación de los WOF, mientras que los triglicéridos sólo los propician en sistemas modelo cuando se encuentran en presencia de fosfolípidos (Igene y Pearson, 1979). Los compuestos sulfurados heterocíclicos que se forman debido al tratamiento por calor de la carne determinan el flavor a carne cocida, y no cambian cuantitativamente durante el almacenamiento del alimento procesado aunque se enmascaran a causa de la proliferación de los WOF (Gray y col., 1996).

2.2.2.- FACTORES INFLUYENTES

a) Sustrato

Como ya se ha mencionado, la estabilidad oxidativa de los lípidos de la carne depende de, entre otros factores, la especie, el sexo, la edad y la localización anatómicas. La susceptibilidad a la oxidación también depende del contenido en fosfolípidos y, en definitiva, en ácidos grasos poliinsaturados (Nawar, 1998).

Los lípidos del huevo son muy estables frente a la oxidación lipídica debido a la acción de sus antioxidantes endógenos (Pike y Peng, 1985), y ni siquiera durante su

almacenamiento se oxidan con facilidad (Marshall, Sams y Van Elswyk, 1994; Cherian, Wolfe y Sim, 1996).

b) Dieta

Los animales monocavitarios acumulan ácidos grasos de la dieta en los fosfolípidos de membrana; de manera que la composición grasa de la dieta influye directamente en la composición lipídica de la membrana celular y su susceptibilidad a la oxidación (Kanner, 1994). Al aumentar el nivel dietético de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), aumenta exponencialmente el contenido en AGPI en muslo y pechuga de pollo (Cortinas, 2004). Las dietas con alta cantidad de AGPI dan lugar a menor depósito y retención de la grasa corporal que las dietas de fracción lipídica muy saturada. Esto es así porque en el pollo, independientemente del contenido en ácidos grasos de la ración, la retención de ácidos grasos saturados (AGS) de cadena larga y ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) es superior a su absorción mientras que ocurre lo contrario con los AGPI y los AGS de más de 14 carbonos y una digestibilidad superior a un 85%. Esto se debe a la síntesis endógena de AGS y AGMI junto a la utilización por el organismo de los AGPI y los AGS de cadena corta (Kavouridou, 2004). Los lípidos más insaturados (grasa más blanda) se oxidan más fácilmente y requieren mayores precauciones al trabajar con ellos. Si se sustituyen AGPI por AGMI se obtiene mayor estabilidad lipídica - los AGMI son 10-20 veces más resistentes a la oxidación lipídica que los AGPI- pero quizás el perfil lipídico del alimento es menos interesante.

Se ha demostrado que dietas ricas en AGPI estimulan la deposición de éstos en el huevo y modifica su perfil lipídico (Baucells, Crespo, Barroeta, López-Ferrer y Grashorn, 2000).

La calidad de la grasa de la dieta es fundamental para minimizar la lipooxidación de las canales. Una dieta con grasa parcialmente oxidada requerirá suplementación extra de vitamina E (acetato de α -tocoferol), pues los broilers retienen menos esta molécula cuando consumen pienso con grasa de baja calidad (Morrisey y col., 1998)

La vitamina E se añade para aumentar la estabilidad frente a la oxidación y los cambios de color. Suplementar dietas de broilers y ponedoras con tocoferol incrementa la cantidad de este antioxidante la carne y de los ovoproductos y previene su oxidación (Ajuyah, Ahn, Hardin y Sim, 1993a; Wahle, Hoppe y McIntosh, 1993; Cherian y col., 1996).

El contenido en α -tocoferol en muslo y pechuga de pollo es directamente proporcional a su contenido en la dieta, y su depósito no se satura a dosis inferiores a 400 mg/kg aunque se dificulta en presencia de dietas con gran cantidad de AGPI o de AGS (Cortinas, 2004). La molécula funciona como antioxidante liposoluble en la membrana celular, que es donde se cree que se inicia la oxidación (Asghar, Gray, Buckley, Pearson y Booren, 1988), también retarda la oxidación de la oximioglobina y por tanto la pérdida de color rojo brillante, y en algunos casos minimiza las pérdidas por goteo (Gray y col., 1996; Morrissey y col., 1998). Para broilers se recomienda más de 4 semanas de suplementación a dosis de 200 mg/kg (Morrissey, Brandon, Buckley, Sheehy y Frigg, 1997). Se ha visto que los pavos lo acumulan de manera más lenta, por lo que es necesario alargar los períodos y aumentar las dosis a 300 mg/kg (Wen, McCarthy, Higgins, Morrissey Buckley y Sheehy, 1997). El α -tocoferol reduce la oxidación de la carne de pollo siguiendo un modelo de saturación aunque la estabilidad oxidativa no se afecta al aumentar la suplementación en el pienso de 200 a 400 mg/kg de pienso (Cortinas, 2004). En alimentos que se van a someter a cocción, son necesarias dosis de 700 mg/kg para evitar la aparición de WOF (Zumalacárregui y col., 2000). En las granjas de producción intensiva, se añade 15-20 mg de acetato de α -tocoferol/kg de pienso, suficiente para evitar carencias de vitamina en los broilers; la inclusión de cantidades mayores encarecería el precio de las canales más de lo asumible. En el caso de huevos enriquecidos en ácidos grasos ω -3 y ω -6, el tocoferol aumenta su estabilidad oxidativa (Galobart y col., 2001).

Algunos estudios indican que los compuestos de la oxidación del colesterol provocados por tratamientos por calor o largos períodos de almacenamiento pueden ser aterogénicos. Para evitarlo, se suplementa las dietas con 400 mg de acetato de α -tocoferol/kg de pienso. También se usan ácido ascórbico y carotenoides (Kubov, 1993; Guardiola, Codony, Addis, Rafecas y Boatella, 1996).

Hay interés en otros antioxidantes naturales como los carotenoides, entre los cuales la cantaxantina presenta una acción controvertida (Barroeta y King, 1991; Jorgensen y Skibsted, 1993).

La carnosina es un dipéptido (β -alanina e histidina) con función tampón y antioxidante cuyo mecanismo de acción se basa en donar protones, secuestrar radicales libres y quelar metales. Inhibe la oxidación de la carne de cerdo fresca y cocida, también protege a la carne fresca frente a los cambios de color (Gray y col., 1996).

c) Temperatura

La temperatura determina en gran parte la susceptibilidad de un alimento a la oxidación (Gray y col., 1996). Con la aplicación de altas temperaturas se altera la estructura de la célula muscular, aumenta la cantidad de hierro libre, se inhiben enzimas y se libera oxígeno de la oximioglobina, lo que hace que se forme peróxido de hidrógeno (sobre todo a 60°C) que activa y destruye la estructura porfirínica. Se produce mayor liberación de hierro cuando se aplican bajas temperaturas de cocción ($\approx 60^\circ\text{C}$) durante largo tiempo porque a temperaturas muy altas el oxígeno se escapa muy rápidamente, el ambiente queda con muy poca presión parcial de oxígeno y no da tiempo a que la oximioglobina se oxide, mientras que a temperatura moderada de cocción se forma más peróxido de hidrógeno que provoca la liberación de hierro de la estructura porfirínica (Kanner, 1994). Las hemoproteínas provocan la lipooxidación en alimentos que han sufrido un tratamiento por calor, pues se ha inhibido la acción de la catalasa y el número de compuestos reductores presentes en las células musculares es menor (Kanner y col., 1991). La velocidad de oxidación de los lípidos aumenta proporcionalmente a la temperatura hasta 100°C, porque a partir de esta temperatura los compuestos resultantes de la reacción de Maillard ejercen cierta acción antioxidante (Zumalacárregui y col., 2000).

En congelación, los radicales libres son más estables y al ser liposolubles se dispersan fácilmente por la fracción grasa del alimento y propaga la reacción. El agua actúa de barrera frente al movimiento de los radicales y, por lo tanto, la desecación de carnes congeladas debido a un envasado incorrecto favorece su oxidación (Kanner, 1994).

d) Acción mecánica

El picado influye negativamente en la calidad de la carne pues incrementa la superficie expuesta al aire y la contaminación microbiana. Además, se facilita la pérdida de compuestos reductores intracelulares y se potencia la interacción entre enzimas y otras proteínas (Benedict, Strange y Swift, 1975).

e) Actividad de agua

La actividad de agua de un alimento condiciona la estabilidad de sus lípidos. Valores de actividad de agua por debajo de 0,10 y entre 0,55 y 0,85 facilitan la oxidación lipídica; en el primer caso por facilidad de dispersión de los radicales, y en el segundo

debido a la movilización de los catalizadores. Una actividad de agua de 0,30 inhibe la oxidación de los lípidos porque disminuye la catálisis metálica, se secuestran radicales libres, se activa el pardeamiento no enzimático y se minimiza la accesibilidad del oxígeno (Nawar, 1998).

f) Aditivos y especias

Los aditivos no realizan una única función en el alimento al cual son incorporados. Algunos presentan acción prooxidante, pero su uso es imprescindible por cuestiones sanitarias, de conservación u organolépticas. El cloruro sódico acelera la oxidación lipídica mediante un mecanismo no muy entendido. Primero, la acción prooxidante se atribuyó a la presencia de impurezas metálicas o al aumento de actividad de las oxidasas (Kanner, 1994), aunque más recientemente se ha propuesto que se origina por causa del desplazamiento del hierro ligado a las proteínas debido a un mecanismo de intercambio iónico favorecido por el sodio, aunque igualmente puede ocurrir por la activación de las oxidasas por el ión Cl^- (Zumalacárregui y col., 2000). El cloruro sódico también inhibe la acción de las enzimas antioxidantes y potencia la actividad catalítica del hierro (Decker y Xu, 1998). Este efecto se podría evitar con ácido etilendiaminotetracético (EDTA), aditivo no autorizado en productos avícolas en la UE pero sí en los EUA, o de ceruloplasmina, proteína sérica que transporta hierro y cobre (Kanner, 1994).

Los nitritos modifican el color y el aroma de la carne, pero tienen una importantísima acción antimicrobiana y antioxidante (Zumalacárregui y col., 2000). En la carne curada los encontramos mayoritariamente transformados en nitrosioles y nitrosomioglobina (Emi-Miwa, Okitani y Fujimaki, 1976). La actividad antioxidante del óxido nítrico se produce porque liga el ión ferroso, dona electrones y secuestra radicales libres. Así, los nitritos forman óxido nítrico, y éste interacciona con las hemoproteínas y el hierro no hemínico y previene la catálisis metálica. La forma simple y la complejada secuestran radicales libres. Si el óxido nítrico se une a proteínas hemínicas, se dificulta la liberación de hierro del anillo porfirínico en el caso de ser atacado por peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos, y se estabilizan los lípidos insaturados de la membrana celular (Kanner, 1994).

g) Envasado

A muy bajas presiones de oxígeno, la oxidación de los lípidos es proporcional a la presión de oxígeno; mientras que si el acceso al oxígeno es ilimitado, la oxidación es independiente de la presión de oxígeno (Nawar, 1998). El envasado al vacío fue un primer intento de minimizar los efectos del oxígeno sobre los alimentos y así prolongar su vida útil. El uso popularización del uso de atmósferas modificadas fue el siguiente paso en el desarrollo de envases. El futuro apunta al uso de envases activos, que interaccionen con el alimento que contienen y así mejoren sus condiciones de conservación.

2.2.3.- MECANISMOS DE CONTROL

La susceptibilidad de un alimento a la oxidación lipídica está condicionada por muchos factores. Este hecho, junto a la complejidad de la reacción, imposibilita el establecimiento de un único mecanismo de control. Nawar (1998) propone las siguientes medidas:

- seleccionar y usar materias primas, ingredientes y aditivos de buena calidad,
- evitar el contacto de los sustratos con los catalizadores,
- minimizar la interacción con el oxígeno, la luz o las trazas de metales,
- usar envases que actúen de barrera gaseosa,
- minimizar la superficie del alimento en contacto con el aire,
- diseñar y mantener correctamente los recintos de almacenamiento,
- aplicar los antioxidantes adecuados.

Tal y como resumen Decker y Xu (1998), para minimizar la oxidación de los alimentos de origen muscular se pueden seguir tres estrategias. La primera consiste en intentar mantener el equilibrio natural del efecto antioxidante recurriendo a técnicas de procesado que no potencien la acción de los prooxidantes y no disminuyan la de los antioxidantes. Otra opción es incrementar la estabilidad oxidativa del músculo

administrando dietas especiales a los animales. La tercera se basa en añadir antioxidantes a los alimentos y usar sistemas de envasado apropiados.

Los antioxidantes se usan de manera habitual en la formulación de alimentos para controlar el proceso de oxidación lipídica, alargar la vida útil y evitar la toxicidad de los productos de la oxidación. El antioxidante ideal no debe ser tóxico ni cambiar las propiedades organolépticas del alimento, debe ser eficaz a baja dosis, incorporarse fácilmente al sustrato y ser compatible con él, resistir altas temperaturas y tener un coste razonable (Vivas, 2000). Hay que escoger la molécula que presente mejor funcionalidad en cada caso, e incorporarla al alimento de manera adecuada y en el momento más favorable.

Como cualquier otro aditivo, los antioxidantes se deben usar cuando sea estrictamente necesario para preservar el alimento y no sea posible obtener su efecto de ninguna otra manera. Para elegir el antioxidante hay que considerar varios factores: potencia del antioxidante (se determina por el tipo de molécula, el sustrato y la manera de aplicación), coeficiente de reparto (hidrofilia/hidrofobia), tipo de aplicación en el alimento, pH del medio, tendencia a la decoloración, temperatura (muchos antioxidantes son muy volátiles) y humedad del alimento (Cubero, Monferrer y Villalta, 2002).

Se han establecido diferentes clasificaciones de los antioxidantes según su acción en los alimentos. Eskin y Przybylski (2001) proponen agruparlos en los tres grupos siguientes:

-Primarios o rompedores de cadena. Reaccionan con radicales lipídicos donándoles un átomo de hidrógeno y formando productos más estables. Interaccionan con radicales peroxilo para frenar la formación de hidroperóxidos y con radicales alcoxilo para minimizar la descomposición de hidroperóxidos en productos tóxicos de degradación. Los compuestos fenólicos (acetato de α -tocoferol) son muy representativos de este grupo (St. Angelo, 1996).

-Secundarios o descomponedores de hidroperóxidos. Transforman los hidroperóxidos en sustancias estables. Por ejemplo el ácido tiopropiónico y sus derivados.

-Sinérgicos. Reducen la velocidad de activación de la reacción. Pueden ser inactivadores metálicos (polifosfatos, EDTA, etc.), secuestrantes de oxígeno (sulfitos, ácido ascórbico, etc.). Regeneran a los antioxidantes primarios.

La investigación actual en el campo de los antioxidantes se centra en dos áreas: incorporación de antioxidantes en la dieta del animal y aplicación de sustancias naturales con acción antioxidante.

La inclusión de suplementos de antioxidantes en las dietas de los animales enriquece los tejidos de éstos. Las moléculas, como componentes endógenos, actuarán con mayor eficacia. El acetato de α -tocoferol, el antioxidante liposoluble endógeno más abundante, elimina radicales lipídicos y oxígeno activo mediante la formación de un radical de tocoferilquinona cuya baja energía no permite que progrese la oxidación lipídica (Decker y Xu, 1998; Zumalacárregui y col., 2000).

Los carotenoides también son moléculas liposolubles endógenas, pero se usan menos en carnes porque inactivan el oxígeno singlete, que no es uno de los principales prooxidantes en el músculo esquelético (Decker y Xu, 1998)

El interés por descubrir antioxidantes naturales se origina en la existencia de indicios de que los antioxidantes sintéticos pueden ser tóxicos. La acción antioxidante de numerosos compuestos naturales está ampliamente documentada (St. Angelo, 1996): ácido ascórbico, tocoferol, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, compuestos de la reacción de Maillard, carboximetilcitosano (Nawar, 1998). La capacidad antioxidante de las especias empezó a estudiarse en la década de los 50, y hoy sabemos que su acción antioxidante se debe a diversos compuestos fenólicos. *Rosmarinus officinalis* y *S. officinalis* son las dos especies con mayor acción antioxidante (ambas contienen carnosol y ácido carnósico, entre otros compuestos fenólicos). Otras plantas como el orégano, el jengibre, el clavo o la cúrcuma también presentan actividad antioxidante (Madsen y Bertelsen, 1995). El extracto de *R. officinalis* es antioxidante debido a cierta capacidad quelante y a la acción de componentes fenólicos que actúan neutralizando radicales libres mediante la cesión de un átomo de hidrógeno. Se han estudiado en detalle las propiedades antioxidantes de numerosos extractos de frutas y plantas. También se han detectado compuestos fenólicos con acción antioxidante en fracciones tisulares de cereza (Gray y col., 1996).

2.2.4.- MÉTODOS ANALÍTICOS

La complejidad de la oxidación lipídica engloba a multitud de reacciones que producen importantes cambios físicos y químicos. Las diversas reacciones se producen por separado, simultánea o competitivamente. Son muchas las variables que afectan a la velocidad de las reacciones y sus productos resultantes. Debido a todo esto, no existe un único análisis que determine completamente el estado oxidativo de un sustrato (Nawar, 1998). La estabilidad lipídica de los alimentos se puede analizar mediante una gran variedad de métodos. Numerosas técnicas se basan en la cuantificación de los compuestos carbonílicos formados durante la oxidación. El test de Kreis o el valor de anisidina son dos técnicas colorimétricas que han caído en desuso debido a la gran popularidad del test del TBA. Existen técnicas que detectan moléculas o partes de las mismas: dobles enlaces (índice de yodo), dienos conjugados, etc. Otra posibilidad es evaluar la resistencia de la grasa a una oxidación inducida: test de Schaal Oven, Rancimat[®], etc. Los análisis sensoriales se han perfeccionado mucho durante los últimos años, y en algunos casos se han conseguido muy buenas correlaciones estadísticas con los resultados instrumentales y químicos (St. Angelo, 1996). Se están desarrollando métodos que detectan radicales o la tendencia a su formación, que permitirán predecir la resistencia a oxidarse de un sustrato antes de la oxidación (Andersen y Skibsted, 2002). A continuación, se describen las principales técnicas de análisis de lípidos que se han utilizado en los experimentos del presente trabajo de tesis.

a) Análisis de peróxidos

Esta analítica es de compleja ejecución e interpretación pues valora compuestos primarios de la oxidación que se transforman rápidamente en compuestos carbonílicos, por lo que existe el riesgo de infraestimar la oxidación. Es una técnica muy sensible a los cambios de temperatura y los resultados pueden variar mucho según la metodología empleada.

Los métodos de determinación de hidroperóxidos en alimentos se pueden clasificar en dos tipos (Dobarganes y Velasco, 2002): uno determina la cantidad total de hidroperóxidos, y otro se basa en técnicas cromatográficas que proporcionan información sobre la estructura molecular y la cantidad de hidroperóxidos específicos de la muestra. Existen tres grupos de técnicas diferentes para cuantificar hidroperóxidos totales:

Métodos químicos basados en reacciones redox.- Los dos métodos más populares se encuentran en este grupo. El más habitual consiste en un ensayo yodométrico: las sustancias que oxidan el yoduro potásico, bajo las condiciones de ensayo establecidas en cada caso, se expresan como mEq de hidroperóxidos por peso de muestra, y este valor se obtiene tras la valoración con tiosulfato del yodo liberado (Dobarganes y Velasco, 2002). Los inconvenientes de este análisis son la baja sensibilidad y las altas cantidades de lípidos necesarias para llevarlo a cabo (Shantha y Decker, 1994). Numerosas adaptaciones pretenden resolver los citados inconvenientes además de la dificultad de establecer el punto final de valoración.

La alternativa a los métodos yodométricos son los métodos basados en la capacidad de los hidroperóxidos para oxidar iones ferrosos a iones férricos, y se cuenta con dos variantes (Dobarganes y Velasco, 2002): la primera detecta los iones férricos en presencia de naranja de xilenol por formación de un complejo azul-púrpura con absorbancia máxima entre 550 y 600 nm. La segunda detecta los iones férricos en forma de tiocianato férrico, una molécula de color rojo-violeta con absorbancia máxima a 500-510 nm.

Los métodos oficiales de determinación de peróxidos de la *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* y de la *American Oil Chemists' Society* consisten en valoraciones yodométricas mientras que el de la *International Dairy Federation* es un método espectrofotométrico que cuantifica tiocianato férrico (Shantha y Decker, 1994).

Reacciones enzimáticas.- La glutathionperoxidasa y la ciclooxigenasa permiten determinar los peróxidos con alta sensibilidad en pequeñas cantidades de muestra; sin embargo, el análisis es más complejo que los basados en reacciones redox. La peroxidasa del guisante se ha usado con éxito en la determinación de hidroperóxidos en carne y pescado mediante un método fluorométrico que no requiere la extracción previa de la fracción lipídica (Miyazawa, Kashima y Fujimoto, 1993).

Métodos físicos.- El análisis mediante luz ultravioleta para la detección de dienos conjugados en los alimentos es habitual. Detecta los hidroperóxidos indirectamente porque durante su formación a partir de los ácidos grasos se producen dienos conjugados con absorbancia a 230-235 nm. El perfil de ácidos grasos de la muestra influye notablemente en el resultado de este análisis y el uso de la segunda derivada del espectro mejora su sensibilidad porque el pico de absorbancia suele aparecer como hombro de un

pico mayor que refleja componentes lipídicos no oxidados. Otros métodos físicos son la espectroscopía de infrarrojos o la cromatografía de exclusión (Dobarganes y Velasco, 2002).

Mediante cromatografía de gases o cromatografía líquida se pueden determinar estructuras específicas de hidroperóxidos y esto permite entender mejor las rutas que sigue la oxidación lipídica. Estas técnicas pueden realizarse con muy pequeñas cantidades de muestra. La cromatografía de gases requiere una extracción de los lípidos seguida de un aislamiento de los hidroperóxidos y una posterior derivatización de los mismos. La cromatografía líquida se realiza a temperatura ambiente y no requiere derivatización de la muestra, pero el análisis cuantitativo es menos preciso (Dobarganes y Velasco, 2002).

b) Test del ácido tiobarbitúrico

Es una de las técnicas más populares para determinar el estado de oxidación lipídica de los alimentos. Consiste en determinar colorimétricamente (absorbancia a 532 nm) la cantidad de malondialdehído (MDA) presente en una muestra, pues el MDA reacciona con el TBA y da lugar a un compuesto de color rojo. En realidad, muchas otras sustancias, además del MDA, reaccionan con el TBA. Por lo que es más correcto hablar de cuantificación de TBARS.

El MDA es un dialdehído de tres átomos de carbono ($C_3H_4O_2$) y tiende a estar en forma de enol estable con posibilidad de isomería cis-trans. Es un producto secundario de la oxidación (derivado de los peróxidos) y lo encontramos en mayor o menor cantidad según la insaturación de los ácidos grasos y si éstos son conjugados o no, la presencia de metales de transición, el pH, y la temperatura y la duración del calentamiento (Raharho y Sofos, 1993). La velocidad de aparición del compuesto coloreado depende de la cantidad de TBA, la temperatura de la reacción y el pH del medio. El MDA interacciona con agua, proteínas e hidratos de carbono, de modo que se presenta de manera ligada y no puede reaccionar directamente con el TBA. Es muy difícil establecer unas condiciones ideales para la liberación del MDA, pues depende de la materia prima y las condiciones de análisis (Fernández, Pérez-Álvarez y Fernández-López, 1997). Aunque es un aldehído, presenta poco o ningún olor y, por tanto, no afecta el flavor de los alimentos (Shahidi y Pegg, 1994).

Los primeros en aplicar esta técnica, aunque fortuitamente, fueron Kohn y Liversedge (1944), que observaron una coloración rojiza tras sumergir en una solución de TBA a alta temperatura tejido cerebral oxidado. Más tarde, Bernheim, Bernheim y Wilbur (1948) determinaron que el responsable de la coloración es un compuesto con tres átomos de carbono y dos de oxígeno (aldehído o cetona) formado a partir de ácidos grasos oxidados: MDA. Patton y Kurtz (1951) fueron los primeros en aplicar la técnica en alimentos.

La cuantificación del MDA fue posible cuando se identificaron sus precursores. Protopopova y Skoldinov (1956) y Saslaw y Waravdeekar (1957), comprobaron que por hidrólisis ácida del 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) y el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), respectivamente, se obtiene MDA. Kwon y Watts (1963), prepararon por hidrólisis ácida del TEP una solución bastante estable, que producía hemiacetal y etanol; seguidamente, el hemiacetal se fragmentaba en MDA y etanol.

Aunque la rapidez del análisis hace que el test del TBA se use muy a menudo, hay que considerar algunas limitaciones (St. Angelo, 1996):

- resultados no comparables entre carnes de diferentes especies,
- variación errática de los resultados en muestras congeladas,
- los valores no siempre aumentan durante el almacenamiento de la muestra,
- el método utilizado hace variar mucho los resultados,
- uso limitado en productos curados; el MDA reacciona con los nitritos.

Para cuantificar los TBARS se debe conocer el método y las muestras con las que se trabaja, los factores de conversión utilizados para hacer los cálculos, y la recuperación que se alcanza. Conviene hacer un análisis de recuperación con una muestra sin MDA. No es necesario que el porcentaje de recuperación sea alto, pero es fundamental que siempre sea el mismo para poder comparar los resultados de los sucesivos días de trabajo.

Hay varios métodos para hacer este análisis, y de todos ellos existen modificaciones para adaptar la técnica a la estructura alimentaria con la cual se trabaja. Las cinco opciones son:

Calentamiento directo de la muestra con TBA en condiciones ácidas.- Se calienta la muestra ya en contacto con TBA y se extrae el compuesto coloreado con butanol (Sinnhuber y Yu, 1958). El ensayo es lento, existen muchas interferencias y se sobreestiman valores porque la muestra se oxida durante el procesado (Raharho y Sofos, 1993; Fernández y col., 1997).

Destilación.- Se minimizan las interferencias con los componentes no lipídicos de la muestra, pero continúa sobreestimándose el resultado porque se calienta el extracto. Es el método que más se ha aplicado en carne, con diversas modificaciones de la técnica introducida por Tarladgis, Watts y Younathan (1960). En las muestras de carne se observa un pico a 450 nm que no aparece en las soluciones puras de MDA.

Extracción ácida-acuosa.- Es el mejor método para determinar el contenido en MDA de la carne (Raharho y Sofos, 1993). Tarladgis, Pearson y Dugan (1964) lo pusieron a punto, y Witte, Krause y Bailey (1970) incorporaron el hexano para purificar del extracto. Es una técnica menos sensible que la de destilación, pero su simplicidad y su facilidad de uso la convierten en el método de elección cuando hay que analizar muchas muestras; además, la correlación de los valores es muy alta (Pikul, Leszczynski y Kummerow, 1989). La muestra no se calienta, y las impurezas presentes en el extracto (proteínas hidrosolubles, péptidos y otros aldehídos) podrían separarse del MDA por cromatografía en una fase posterior si fuera necesaria una mayor sensibilidad. Una manera sencilla para conseguir incrementar la especificidad y la sensibilidad es calcular las derivadas del espectro de absorbancia (Botsoglou, Fletouris, Papageorgiou, Vassilopoulos, Mantis y Trakatellis, 1994). Con unas condiciones de pH < 1,2 y calentamiento a 70°C durante 30 min, se puede llegar a determinar 2,6 ng/ml de extracto si se mide la altura del pico de la tercera derivada a 521,5 nm.

Reacción con los lípidos extraídos de la muestra.- Propuesta por Pikul, Leszczynski y Kummerow (1983). Más tarde, Pikul y Leszczynski (1986) recomendaron añadir butilhidroxitolueno (BHT), que no interfiere en la liberación de MDA ni en la reacción de éste con el TBA, para evitar la oxidación al procesar la muestra. La principal ventaja de esta técnica es que no hay interferencias, pero hay que conocer el porcentaje de recuperación de MDA debido a su gran hidrosolubilidad. Por otro lado, puede producirse oxidación al extraer la fracción lipídica, lo que haría sobreestimar el resultado (Raharho y Sofos, 1993).

Método espectrofluorométrico.- Requiere una extracción lipídica previa. Se mide la fluorescencia del complejo MDA-TBA (Yagi, 1976). La especificidad es similar a la del método espectrofotométrico y parece que se detectan aldehídos de origen no lipídico (Fernández y col., 1997).

También se han desarrollado métodos para cuantificar específicamente el MDA sin que intervenga en la reacción el TBA. Se puede recurrir a la cromatografía líquida de alta especificidad (HPLC), que es una técnica más rápida y sensible que la destilación de Tarladgis y col. (Raharho y Sofos, 1993). Unos métodos son mediante destilación (Kakuda, Stanley y Van de Voort, 1981) y otros mediante extracción ácida-acuosa (Csallany, Guan, Manwaring y Addis, 1984). El factor limitante es la vida media de la columna, que se puede prolongar si se limpia con solvente después de cada análisis (Raharho y Sofos, 1993). La cromatografía de gases (GC) es una alternativa más eficaz porque minimiza el solapamiento del MDA con otras moléculas. Se debe derivatizar, y es complicado conseguir alta sensibilidad sin alterar las muestras. Estas técnicas requieren una larga preparación de la muestra (superior a 24 h) y pueden determinar el MDA libre o el libre y el ligado juntos según la derivatización aplicada (Raharho y Sofos, 1993).

Las técnicas cromatográficas de detección de MDA son más específicas que las espectrofotométricas, pero consumen mucho tiempo y no son prácticas para la rutina de ensayo en el laboratorio. El test del TBA es menos específico pero mucho más práctico, y por esta razón es la técnica más habitual para cuantificar la oxidación lipídica.

c) Determinación de compuestos carbonílicos volátiles. Microextracción en fase sólida

c.1) Antecedentes

Los WOF son un parámetro de medida de la calidad de la carne, especialmente de los productos cárnicos cocidos. Para prevenir la propagación de los WOF, hay que conocer su mecanismo de formación, un proceso dinámico de cambio de flavor originado por una cascada de eventos oxidativos que se produce a mayor velocidad si el grado de insaturación de los ácidos grasos es alto (Shahidi y Pegg, 1994).

Se han desarrollado numerosas técnicas para aislar y cuantificar por separado los compuestos carbonílicos volátiles. Los compuestos carbonílicos, producidos a partir de la degradación de los hidroperóxidos derivados de ácidos grasos, permiten evaluar la

lipooxidación de los productos cárnicos porque contribuyen considerablemente al flavor de dichos productos no curados (Shahidi y Pegg, 1994).

La extracción líquido-líquido, que es el tratamiento habitual de la muestra previo a la inyección en un cromatógrafo de gases, no es aceptable por varias razones: comprende multitud de tediosas etapas difíciles de automatizar, y usa disolventes orgánicos caros, de complicado manejo y tóxicos para el personal. Se están desarrollando varios métodos alternativos: técnicas de espacio de cabeza estáticas y dinámicas para determinar compuestos volátiles, y extracción con fluidos supercríticos y extracción en fase sólida (SPE) para determinar compuestos semi-volátiles. Actualmente, ya existen aplicaciones industriales, medioambientales y toxicológicas de la SPME (Penton, 1997). La microextracción en fase sólida (SPME) es una variante de la SPE desarrollada por Arthur y Pawliszyn (1990). Las características de esta técnica han permitido el rápido desarrollo de numerosos trabajos que miden volátiles en alimentos como vegetales, carnes, productos lácteos, especias, bebidas, aceites... (Wardencki, Michulec y Curylo, 2004).

c.2) Fundamentos de la técnica

La SPE consiste en adsorber el analito directamente de la muestra a un soporte sólido modificado. Posteriormente, el analito atrapado se desliga del cartucho por calor o con un solvente (Arthur y Pawliszyn,1990). Los cuatro pasos básicos de la SPE son, en este orden: acondicionamiento del cartucho, retención, lavado y elusión (Penton, 1997). Las ventajas de este método son que minimiza el consumo de disolventes y es más rápido y económico que la extracción líquido-líquido. Los inconvenientes son que las muestras control presentan valores altos, que hay gran variación entre materiales suministrados por diferentes proveedores, y que los cartuchos son de plástico y pueden secuestrar parte del analito (Arthur y Pawliszyn,1990).

La SPME se lleva a cabo con fibras de sílice modificadas que pueden contactar directamente con la muestra o permanecer en el espacio de cabeza del vial. Esta técnica mantiene las ventajas y elimina los inconvenientes de la SPE: no requiere disolventes, las muestras control tienen valores muy bajos y consume muy poco tiempo (Arthur y Pawliszyn,1990). La técnica es económica, cómoda y, debido a las suaves condiciones del procesado (temperatura inferior a 50°C), estima cuantitativamente el flavor de los alimentos mejor que la zona nasal (Brunton, Cronin, Monahan y Durcan, 2000).

La SPME suele elegirse como técnica preparativa de muestras que se van a analizar por cromatografía, debido a sus múltiples ventajas: rapidez y pocas etapas, extracción de componentes adecuados para la columna de GC, no uso de disolventes orgánicos, posibilidad de analizar compuestos semipolares y apolares, alta sensibilidad frente a ciertos compuestos, pequeño tamaño de muestra, coste relativamente bajo, automatización, robustez, simplicidad y posibilidad de tomar muestras de campo. Los inconvenientes principales de la SPME son la recuperación relativamente baja y la poca precisión de las medidas (Wardencki y col., 2004).

La SPME se realiza con una fibra de pequeño diámetro recubierta de una fase estacionaria que se pone en contacto con una muestra acuosa. Los analitos se liberan de la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases. La técnica es más simple que la SPE porque la geometría de las fibras es más sencilla que la de los cartuchos. Además, no requiere la extracción completa del analito ya que es una técnica basada en el equilibrio entre fases. El proceso de adsorción del analito a la fibra depende del tiempo de exposición, que debe ser suficiente para llegar al equilibrio; cuando éste se alcanza, la velocidad de adsorción disminuye y la precisión mejora. Sin embargo, el método es cuantitativo y se ha demostrado una excelente precisión y linealidad. Si no se alcanza el equilibrio, conviene controlar estrictamente el tiempo de exposición para obtener resultados reproducibles. Los sistemas automáticos consiguen muy buenos resultados porque controlan perfectamente los tiempos de exposición y de desadsorción aunque no hayan alcanzado el equilibrio. La falta de precisión detectada en los primeros trabajos realizados con SPME se atribuye a no haber alcanzado el equilibrio y a las diferentes posiciones de la fibra en el inyector del cromatógrafo (Arthur y Pawliszyn, 1990; Penton, 1997).

En el caso de muestras líquidas, la recuperación del analito depende del reparto de las partículas en las tres fases del vial de muestra: líquido, espacio de cabeza y recubrimiento de la fibra (Penton, 1997).

c.3) Factores influyentes en la determinación de moléculas

Para cuantificar correctamente mediante SPME, es necesario tener una buena reproducibilidad en muestras replicadas y una respuesta lineal en el rango de concentraciones en el que esperamos detectar al analito en la muestra. El uso de 2-metil-pentanal como estándar interno mejora los resultados (Brunton y col., 2000).

La difusión de los compuestos volátiles en el agua es el factor limitante si la muestra no se agita, pues se ha observado que la extracción es más rápida en soluciones que se remueven (Arthur y Pawliszyn, 1990). Esto es cierto si tratamos con moléculas poco volátiles, mientras que en el caso de moléculas muy volátiles la agitación de la muestra no influye. Si la muestra contiene proteínas o sales, es recomendable que la fibra se sitúe en el espacio de cabeza, pero en el caso de compuestos de muy baja volatilidad es preferible sumergir la fibra en la muestra. Es útil añadir cloruro sódico a las muestras acuosas cuando queremos que los compuestos polares pasen al espacio de cabeza (Penton, 1997).

Al calentar la muestra, aumenta la sensibilidad en cromatografía de gases de espacio de cabeza. En el caso de la SPME, se altera el reparto de las moléculas en las tres fases y se favorece el acúmulo en el espacio de cabeza del vial. Parece que la sensibilidad de la SPME aumenta, si a la vez que se calienta la muestra, se enfría la fibra con CO₂. Para mejorar la sensibilidad a los compuestos polares, se puede aumentar la proporción de líquido en el vial. El tamaño del vial no influye en la técnica, pero los viales grandes facilitan el llenado en el caso de muestras sólidas y semi-sólidas que, por ser mayores serán más representativas (Penton, 1997).

c.4) Cuantificación de hexanal

El hexanal es un compuesto que predomina sobre el resto de aldehídos que se originan en los alimentos tras la oxidación del éster metílico del ácido linoleico. La formación de hexanal depende del perfil lipídico y de la presencia de prooxidantes, antioxidantes y quelantes en el sistema. La molécula se ha propuesto como el mejor índice para estimar la lipooxidación. El ácido hexanoico es un compuesto que se forma al oxidarse el hexanal y que también influye en el flavor de la carne (Shahidi y Pegg, 1994).

Existen diversas fibras para realizar la SPME (Wardencki y col., 2004): Brunton y col. (2000) compararon las fibras de carbowax/DVB y PDMS/DVB, que están recubiertas con polímeros porosos y alcanzan las máximas recuperaciones tras 10 y 20 min de exposición de la muestra, respectivamente. La fibra de carboxen/PDMS fue de mayor capacidad y, tras 40 min en contacto con la muestra, no se saturó. Esta fibra tuvo la peor reproducibilidad y la mejor linealidad a concentraciones de hexanal superiores a 4 µg/g. La fibra de PDMS/DVB mostró la mejor linealidad a bajas concentraciones de hexanal y se considera la fibra de elección para cuantificar hexanal en alimentos poco oxidados.

La fibra de carboxen/PDMS es la que más se acerca a la sensibilidad de la cromatografía de gases en espacio de cabeza. Está recubierta por un carbono poroso de gran superficie y se diseñó para extraer eficazmente compuestos volátiles de bajo peso molecular de soluciones acuosas. Aunque se ha observado que la fibra PDMS/DVB se comporta mejor en el análisis cuantitativo de hexanal en carne de pavo, la fibra carboxen/PDMS tiene mayor capacidad de detección de compuestos volátiles en el espacio de cabeza, la polaridad de los analitos no influye en la capacidad de dicha fibra para secuestrarlos, y puede detectar compuestos volátiles del espacio de cabeza de alimentos calentados a temperaturas a las que las otras fibras serían ineficaces (Brunton, Cronin y Monahan, 2001).

La baja capacidad selectiva de la fibra de carboxen/PDMS es muy útil para cuantificar diferentes compuestos volátiles de alimentos diversos, pero esto puede ser un inconveniente cuando hay un componente con gran capacidad de adsorción que se encuentra en grandes cantidades en el espacio de cabeza. Este componente puede saturar la fibra y no dejar suficientes lugares de unión para el resto de moléculas, ésto se ha detectado al analizar bebidas alcohólicas (Brunton y col., 2001).

El uso simultáneo de dos fibras de SPME recubiertas por diferentes fases estacionarias (75 μm carboxen/PDMS y 50/30 μm DVB-carboxen/PDMS) es una manera sencilla de aumentar el rendimiento de extracción de moléculas volátiles en carne de cerdo tratada por calor (Elmore, Mottram y Hierro, 2000).

Se han observado buenos coeficientes de correlación entre valores de TBARS y compuestos volátiles medidos en carne de pollo mediante cromatografía de gases estática en espacio de cabeza, por lo que se propone este método como alternativa rápida al test del TBA (Shahidi y Pegg, 1994). Las correlaciones entre valores de TBARS y hexanal analizado mediante SPME son óptimas, y entre los valores de TBARS y pentanal también son buenas aunque algo menores (Brunton y col., 2000). Actualmente, se puede analizar los compuestos volátiles de alimentos crudos si se disminuye la presión del vial a 5×10^{-2} bar y se usa una fibra de carboxen/PDMS (Brunton y col., 2001).

De todo lo expuesto, puede concluirse la gran importancia de elegir meditadamente el método analítico según las características de cada caso.

2.3.- ACCIÓN DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LOS ALIMENTOS

2.3.1.- DEFINICIONES. IMPACTO DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS

Los centros de investigación y las universidades están potenciando intensivamente el desarrollo de nuevas tecnologías de procesado y conservación de los alimentos: alta presión, irradiación, campos magnéticos oscilatorios, pulsos eléctricos, descompresión instantánea controlada, etc. La mayoría de ellas buscan el ahorro de energía y el cuidado del medio ambiente (Hugas, Garriga y Monfort, 2002).

Los consumidores desean productos sanos de gran calidad, que cumplan expectativas de facilidad de uso, frescura, escaso procesado industrial y mínima incorporación de aditivos. La aplicación de altas presiones isostáticas como método de transformación-conservación de los alimentos ofrece numerosas ventajas respecto a los métodos convencionales de procesado: inactiva enzimas y formas vegetativas de microorganismos sin alterar apenas el flavor, el color y el valor nutritivo (Indrawati, Van Loey, Smout y Hendrickx, 2003). Las bases físicas del tratamiento por alta presión son la ley de la isostática (los cambios de presión son independientes del volumen y la geometría de la muestra y se producen constante y uniformemente) y el principio de Le Chatelier (cualquier disminución de volumen se ve favorecida por un aumento de presión y viceversa). Esta tecnología, de reciente práctica industrial en el campo de la alimentación, deriva de las ciencias de los materiales (cerámicas, superaleaciones, etc.) y consiste en aplicar presiones iguales o superiores a 100 MPa (≈ 1.000 bar) para reducir la carga microbiana del alimento sin aplicar calor. Se usa un líquido que transmite la presión, y ésta se genera mediante una bomba que impulsa el líquido transmisor a un recipiente de adecuado grosor y resistencia (Cheftel y Culioli, 1997).

Aunque los primeros trabajos sobre altas presiones aplicadas a los alimentos se realizaron a finales del S. XIX, fue en 1992 cuando apareció en el mercado el primer alimento tratado por alta presión, y en 1995 siete empresas japonesas ya comercializaban productos presurizados (Garriga, Aymerich y Hugas, 2002). Pese a ser un proceso tecnológico desconocido para el consumidor, se ha constatado que éste confía en el procesado de alimentos por altas presiones: la inscripción "tratado por alta presión" en el etiquetado de un zumo de piña contribuye a crear una percepción positiva del producto (Deliza, Rosenthal y Silva, 2003). Aunque no parece probable la sustitución del bien establecido y económico tratamiento por calor (0,02-0,04 €/kg de producto procesado) por

las altas presiones, el coste estimado de esta nueva tecnología (0,1 €/kg de producto procesado) podrá ser asumido por la industria, ávida de crecer y ofrecer nuevos alimentos con propiedades funcionales que no es posible obtener con los tratamientos convencionales (Indrawati y col., 2003).

2.3.2.- APLICACIONES ACTUALES

Los equipos comerciales disponibles en la actualidad tienen una capacidad de 10-400 L en el caso del procesado discontinuo y alcanzan 1-4 t/h si se trata de producciones semi-continuas. La aplicación comercial más interesante sería hoy por hoy un tratamiento de 400-600 MPa a 5-90°C durante 10-30 min (Garriga y col., 2002), aunque se dispone de equipos industriales capaces de trabajar hasta 900 MPa (Indrawati y col., 2003).

Si se tratan productos sólidos, el hecho de tener que trabajar con lotes es un inconveniente añadido al elevado coste de la maquinaria y la resistencia a las altas presiones de algunas bacterias Gram-positivas, formas esporuladas y patógenos emergentes (Garriga y col., 2002).

Hay que seleccionar cuidadosamente el envase del alimento, la disminución del volumen durante el tratamiento provoca cierta distorsión del envase y su sistema de sellado (Indrawati y col., 2003). Diversos factores determinan el efecto del tratamiento por alta presión sobre los alimentos: duración, velocidad de compresión-descompresión, temperatura, cantidad de bombeos, etc. También hay que considerar el estado fisiológico de los microorganismos, la composición de los alimentos, el calentamiento adiabático y la disipación de calor (Indrawati y col., 2003).

Las numerosas aplicaciones de las altas presiones para la conservación de los alimentos incluyen: pasteurización, tenderización de productos cárnicos, texturización de proteínas de pescado, congelación descongelación, y diversas aplicaciones en productos lácteos. En Japón, los EUA y Europa se comercializan desde hace algunos años varios productos tratados por alta presión (Tabla 1). El primer alimento presurizado fue una mermelada que se comercializó en Japón en 1990. En Europa, fue pionero el zumo de naranja en Francia, seguido por el jamón cocido en España (Indrawati y col., 2003).

PRODUCTO	PAÍS	COMPAÑÍA	TRATAMIENTO
Productos de frutas	Japón	Meidi-Ya	400 MPa/10-30'/20°C
Zumos de mandarina	Japón	Wakayama Food Int.	300-400 MPa/2-3'/20°C
	Japón	Ehime Co.	?
Zumos de frutas	Japón	Poca Corp. (♣)	200 MPa/10-15'/5°C
	Japón	Takansi	?
	Francia	Pampryl	400 MPa/20°C
	E.U.A.	Odwalla	?
	Portugal	Frucaba	?
Zumos de naranja	Japón	Pon	?
	Reino Unido	Orchard House Foods Ltd.	500MPa/20°C
	Líbano	K-Sun	?
	Italia	Ortogel	?
	México	Jumex	?
Frutas azucaradas	Japón	Nisshin Fine Foods	50-200 MPa
Arroces	Japón	Echigo Seika	400-600 MPa/10'/45-70°C
Sake	Japón	Chiyonosono	?
Guacamole	E.U.A.	Avomex	700 MPa/10-15'/20°C
Hummus	E.U.A.	Hannah Internat. Foods	?
Jamón crudo	Japón	Fuji Chiku Mutterham	250 MPa/3 h/20°C
Productos cárnicos	España	Esteban Espuña, S.A.	400-500 MPa/20°C
	España	Campofrío Alimentación S.A.	?
"Roast beef" loncheado	Japón	Itoh Ham Corp. Ltd.	?
"Shiokara"	Japón	Kibun (♣)	?
Elaborados de pescado	Japón	Yaizu Fisheries	400 MPa
Ostras	E.U.A.	Motivatit, Nisbet Oyster Co. Co, Joey Oyster	300-400 MPa/10'/20°C
Margarina	Japón	Kaneka Corp.	?

Tabla 1.- Productos tratados por alta presión comercializados en los últimos años. (♣): retirado del mercado actualmente.

Legalmente, en la UE, los alimentos considerados *novel foods* deben evaluarse para obtener una licencia especial de autorización. La comisión encargada de esto admitió en 2001 que un producto sustancialmente equivalente a otro que ya se encuentre en el

mercado pueda considerarse según establezca la ley nacional. Así, no sería necesario que un alimento cumpliera la normativa de *novel foods* si, tras los análisis físico-químico, de biodisponibilidad de nutrientes y microbiológico, no se detectan diferencias respecto a un alimento ya existente en el mercado (Hugas y col., 2002).

2.3.3.- EFECTOS GENERALES

Algunas de las acciones de las altas presiones sobre los alimentos están bien definidas: daño letal o subletal a microorganismos, modificación de biopolímeros (activación e inactivación enzimáticas, desnaturalización proteica y formación de geles), mantenimiento de las calidades nutricional y organoléptica (color y flavor) y modificación de las propiedades físico-químicas del agua (Indrawati y col., 2003).

La capacidad de las bacterias para sobrevivir a los tratamientos por alta presión se basa en la estabilidad de sus macromoléculas así como en una serie de factores: ya citados (Indrawati y col., 2003). Se ha demostrado que la aplicación de breves tratamientos cíclicos de presión (> 621 MPa) a altas temperaturas (> 105°C) inactiva las esporas microbianas, y se ha propuesto como método esterilizador de alimentos (Meyer, Cooper, Knorr y Lelieveld, 2000). No es posible asegurar la esterilización de los alimentos sometidos a presiones inferiores a 500 MPa; así, los productos obtenidos con la mayoría de aplicaciones industriales (máximo de 400 o 500 MPa) requieren refrigeración para maximizar su vida útil (Indrawati y col., 2003).

La alta presión es un tratamiento más suave que el calor desde un punto de vista químico: los enlaces covalentes no se afectan a presiones inferiores a 1.000-2.000 MPa, por lo que la estructura primaria de las proteínas no se altera (Mozhaev, Heremans, Frank, Masson y Balny, 1994). Enlaces más débiles como los puentes de hidrógeno o las interacciones hidrofóbicas pueden afectarse irreversiblemente (Hugas y col., 2002), aunque algunos autores opinan que los puentes de hidrógeno se afectan mínimamente durante la presurización o que se fortalecen debido a la compresión, y se producen pocos cambios de la estructura secundaria de las proteínas (Mozhaev y col., 1994; Cheftel y Culioli, 1997). Sin embargo, la estructura terciaria sí se modifica ampliamente debido a la acción de la presión sobre las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Hendrickx, Ludikhuyze, Van de Broek y Weemaes, 1998). Iwasaki y Yamamoto (2002) han observado

que el subfragmento-1 de la miosina de músculo de pollo sufre cambios estructurales globales a partir de 150 MPa, mientras que la alteración de los lugares de unión a la actina y la ATPasa se inician a 250-300 MPa

El tratamiento por alta presión modifica considerablemente el color de la carne cruda, que adquiere aspecto de cocida. A 200-350 MPa, se decolora la carne debido a la desnaturalización de la globina y/o el desplazamiento o la liberación del átomo de hierro; mientras que a presiones superiores a 400 MPa, la mioglobina (hierro en estado ferroso) se oxida a metamioglobina (hierro en estado férrico). Los productos curados no presentan alteraciones del color tras ser tratados por alta presión (Cheftel y Culioli, 1997).

Los efectos sobre el contenido vitamínico de los alimentos son mínimos y la cantidad de vitaminas presente se mantiene tras el tratamiento. En cambio, las enzimas pueden inactivarse a diferentes combinaciones de presión, tiempo y temperatura, según el tipo y origen de la enzima y del alimento. En general, las enzimas son más resistentes a la presión que las formas bacterianas vegetativas, por lo que las primeras determinan el tratamiento adecuado para cada alimento (Indrawati y col., 2003).

La alta presión también disminuye el volumen del agua, lo que incrementa su temperatura en 2-3°C por cada 100 MPa, mientras que la descompresión causa el efecto inverso. El punto de fusión disminuye hasta -22°C a 207,5 MPa. Este superenfriamiento del agua en estado líquido permite una nucleación rápida y uniforme al descomprimir. El pH del agua disminuye al aumentar la presión y, a pesar de que estos efectos son reversibles, puede modificar algunas características de los alimentos (Cheftel y Culioli, 1997). Se han estudiado diversas aplicaciones de la alta presión para congelar y descongelar sin afectar la calidad de los alimentos (Indrawati y col., 2003).

La aplicación de altas presiones a canales previamente al *rigor mortis* causa un descenso del pH y una contracción intensa del músculo, debido a un alto contenido en calcio citosólico que se libera del retículo sarcoplásmico por la desintegración de sus membranas. Sin embargo, cuando el tratamiento se aplica tras el *rigor mortis*, no hay contracción pero se altera considerablemente la estructura de los sarcómeros. Las calpaínas y las catepsinas son enzimas implicadas en la tenderización durante el proceso de transformación del músculo en carne. El tratamiento por alta presión podría incrementar la actividad de estas enzimas. Numerosos estudios han intentado explicar el proceso de tenderización de la carne por alta presión, pero no se ha llegado a resultados

concluyentes. El tratamiento previo al *rigor mortis* es muy eficaz pero sería necesario desarrollar sistemas de despiece en caliente. Al combinar presión y calor, se consigue tenderizar la carne, pero ésta presenta aspecto de carne cocida (Cheftel y Culioli, 1997).

Una aplicación interesante de la alta presión en productos cárnicos consiste en incrementar la cohesión de carnes picadas y emulsiones, de manera que se podría aumentar la funcionalidad de la proteína cuando interesara minimizar el contenido en cloruro sódico (Cheftel y Culioli, 1997). Existe cierta controversia sobre la capacidad de la alta presión para potenciar la gelificación de pastas cárnicas por calor. Mandava, Fernández y Juillerat (1995) afirman que tratamientos de 100-200 MPa mejoran la textura y el rendimiento post-cocción de algunos productos cárnicos, mientras que Carballo, Fernández y Jiménez-Colmenero (1996) indican que un tratamiento por presión previo a la cocción no mejora la gelificación de las emulsiones cárnicas. Con la alta presión, se obtienen geles a partir de carne picada (Yoshioka, Kage y Omura, 1992) y se puede mejorar la capacidad de coagulación de homogeneizados de carne (Shigehisa, Ohmori, Saito, Taji y Hayashi, 1991). En un trabajo posterior (Jiménez-Colmenero, Cofrades, Carballo, Fernández y Fernández-Martín, 1998), se reafirmó que el tratamiento por presión previo a la cocción favorece la gelificación de pastas cárnicas por calor, aunque no presenta ventajas en el caso de las emulsiones. Se detectaron diferencias en la gelificación entre pastas cárnicas sometidas a presión y calor y las que sólo se trataron por calor. Probablemente, la presión protege de la desnaturalización a las proteínas con estabilidad térmica media, mientras que la ruptura de la miosina en varios fragmentos aumenta la cantidad de proteínas solubles en sal. Todo esto podría conllevar la obtención de geles menos rígidos y con mayor capacidad de retención de agua.

En cuanto a los lípidos, su temperatura de fusión aumenta más de 10°C por cada 100 MPa, y parece que la cristalización de los fosfolípidos presentes en las membranas celulares es una de las causas de la inactivación microbiana que se produce al aplicar altas presiones a los alimentos (Cheftel y Culioli, 1997). Algunos estudios indican que la estabilidad lipídica de diversos tipos de carne tratados por altas presiones es inferior a la de las muestras no tratadas o procesadas por calor (Cheah y Ledward, 1995, 1996, 1997; Cheftel y Culioli, 1997; Dissing y col., 1997; Orlien, Hansen y Skibsted, 2000; Tuboly, Lebovics, Gaál, Mészáros y Farkas, 2003). Este punto es el que se va a desarrollar extensivamente en el capítulo 4 de este documento ya que es el objetivo principal de la tesis.

3. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

3.1. LIPID OXIDATION AND COLOUR IN PRESSURE- AND HEAT-TREATED MINCED CHICKEN THIGHS

Beltran, E., R. Pla, M. Capellas, J. Yuste y M. Mor-Mur

**Journal of the Science of Food and Agriculture, 84, 1285-1289
(online:2004)**

Lipid oxidation and colour in pressure- and heat-treated minced chicken thighs[†]

Elena Beltran, Reyes Pla, Marta Capellas, Josep Yuste and Montserrat Mor-Mur*

CER Planta de Tecnologia dels Aliments (CeRTA, XIT), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Abstract: Lipid oxidation and colour in pressurised and heated chicken samples were evaluated. In a preliminary test, raw and overcooked (100 °C/60 min) minced chicken thighs were pressurised (500 MPa/50 °C/30 min). Samples were stored at 4 °C in contact with air. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were quantified at 1, 6 and 9 days. Pressure induced oxidation in chicken, but overcooking generated many more secondary oxidation compounds. In a second experiment, raw minced chicken thighs were pressurised (500 MPa/–10, 5, 20 and 50 °C/30 and 60 min) or cooked (90 °C/15 min). Samples were vacuum stored at 4 °C. TBARS were measured at 1 and 9 days, whereas colour parameters (*L*, *a*, *b* and ΔE) were determined at 1 day. No differences in TBARS values were observed between untreated and pressurised samples, whereas cooked samples presented the highest values. Pressurisation for 30 and 60 min generated similar TBARS contents. At 9 days, oxidation values did not increase. Pressurisation and cooking induced marked colour changes. Pressurised samples were lighter and less red than untreated ones. Samples pressurised at 50 °C were the palest and, together with cooked samples, presented the lowest *a* values. Therefore pressurised chicken thigh cannot be marketed as a fresh product but can be incorporated as an ingredient in ready-to-eat meals.

© 2004 Society of Chemical Industry

Keywords: lipid oxidation; high pressure processing; heat processing; TBARS; chicken; colour

INTRODUCTION

The poultry market continues to grow and consumers tend to demand novel products and convenience foods. High-pressure processing offers the possibility of manufacturing some new product lines that can be well accepted owing to their high quality standards. Under certain pressure/time/temperature combinations, marked decreases in bacterial counts occur and so the microbiological quality is greatly improved.^{1,2}

Lipoxidation is one of the main factors affecting processed meat and poultry quality,^{3,4} whereas meat colour is an important parameter that influences consumer food acceptance.⁵ Therefore it is essential to investigate how intense oxidation is and what colour changes occur when poultry is pressurised.

The thiobarbituric acid (TBA) test has been widely used to determine lipid oxidation in meat and poultry. Distillation methods are considered the standard to perform the TBA test because they are the most sensitive, but Raharjo and Sofos⁶ reported that heating of the sample during the distillation process enhances formation of TBA reactive substances (TBARS). An extraction procedure has been described as the best

TBA method to analyse meat and poultry samples, because they are not heated during the analysis, and the procedure is faster and easier to carry out than distillation methods.^{6–8} Botsoglou *et al*⁹ described an extraction method that measures the absorbance by using the third derivative from the spectrum, to avoid some interferences. This procedure has been extensively used on poultry,¹⁰ and Grau *et al*¹¹ tested the influence of some parameters on the results obtained with this method.

Oxidation in pressure-treated foods has not been deeply investigated yet. The first experiments were performed on fish and concluded that pressures above 200 MPa induce lipoxidation when fish oil is in contact with muscle.^{12–14} Other studies with pork meat corroborate that lipoxidation is enhanced by pressure, but only if the pressure is above 300 MPa.^{15–18} Results from Dissing *et al*¹⁹ on turkey thigh and from Orlien *et al*²⁰ on chicken breast, suggest that turkey is more susceptible to pressure-induced oxidation than chicken.

Colour is a very important physical property. With heat processing, considerable colour modifications are

* Correspondence to: Montserrat Mor-Mur, CER Planta de Tecnologia dels Aliments (CeRTA, XIT), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
E-mail: montserrat.mor-mur@uab.es

[†]This paper was partly presented at the 46th International Congress of Meat Science and Technology, Buenos Aires, Argentina, 27 August–1 September 2000

Contract/grant sponsor: Spanish Government; contract/grant numbers: 1999FI-00771; ALI98-0508-C-02-01

(Received 21 November 2002; revised version received 13 February 2004; accepted 8 March 2004)

Published online 15 June 2004

unavoidable. High-pressure processing is presented as an alternative treatment that modifies meat and poultry colour in a different way.^{5,21–23}

In this work, lipid oxidation and colour in pressurised chicken thighs were evaluated and compared with those in heat-treated samples to optimise applications of high-pressure processing in the poultry industry.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation and physicochemical analyses

Fresh chicken thighs were obtained from a local market. Bones, skin, and connective and adipose tissues were removed and the muscle was minced for 15 s in a household mincer, avoiding any sample heating. The AOAC official methods of analysis²⁴ were applied to determine the composition of raw minced chicken thighs. A potentiometric measurement of pH was done with a penetration pH meter combination electrode (Crison, Alella, Spain).

All samples were vacuum packaged in BB4L plastic bags (Cryovac, Sealed Air Co, Sant Boi de Llobregat, Spain), stored in darkness at 4 °C and treated by pressure or heat the same day.

High-pressure and heat treatments

A preliminary test was performed with raw (R#) and overcooked (O#; 100 °C/60 min) minced chicken thighs. Samples were treated by pressure (RP and OP; 500 MPa/30 min/50 °C). Some samples were used as temperature controls: they were processed at the same time and temperature conditions but under atmospheric pressure (RT and OT; 50 °C/30 min). Untreated samples of raw (RU) and overcooked (OU) chicken were reserved.

In the second part of the experiment, raw samples were pressurised at 500 MPa for 30 and 60 min at four temperatures (–10, 5, 20 and 50 °C) and codified as P–10, P5, P20 and P50 respectively. Some samples were processed in a water bath at the same conditions as the pressurised samples but under atmospheric pressure. These acted as temperature controls (T–10, T5, T20 and T50). Other samples were cooked in a water bath at 90 °C for 15 min and then cooled in running tap water for 30 s (C), whereas some samples were not treated (U).

Pressure treatments were done in a discontinuous isostatic press (Alstom, Nantes, France). The pressure chamber and the liquid inside were held at the appropriate temperature by circulating water (ethanol/water mixture (3:1) when processing temperature was –10 °C) through a coil. Samples were allowed to reach the treatment temperature in this chamber before pressurisation.

The experiment was performed twice.

Refrigeration storage and sampling days

Immediately after the treatments, packages of the preliminary test were opened so that samples were in

contact with air. The samples of the second experiment were kept under vacuum throughout storage. All samples were maintained at 4 °C in darkness.

To monitor lipid oxidation, TBARS analysis was performed at 1, 6 and 9 days after the treatments in the preliminary test and at 1 and 9 days in the second experiment. Colour was measured at 1 day after the treatments in samples of the second experiment.

Lipid oxidation evaluation

To perform the TBA test, the extraction method of Botsoglou *et al*⁹ was applied, incorporating suggestions from Grau *et al*.¹¹ Reagents were from Panreac (Barcelona, Spain), Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and Sigma (Steinheim, Germany). Absorbance was measured with a spectrophotometer (Cecil Instruments, Cambridge, UK) at 521 nm on the third derivative spectrum, produced by electronic differentiation of the normal spectrum. Results are expressed as malondialdehyde equivalents (ppm × 10^{–3}) because they also include other TBARS. Two replicates of each sample were analysed.

Colour analysis

Three colour parameters, *L* (lightness), *a* (redness) and *b* (yellowness), were determined with a portable HunterLab spectrophotometer (MiniScan XE™, Hunter Associates Laboratory, Inc, Reston, VA, USA), and the total colour difference between untreated and treated samples was calculated as $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$. Plastic bags were removed and samples were homogenised by hand; 10 min later, measurements were made using a glass capsule. Six measurements were taken from each sample.

Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance by the general linear model procedure of SAS software (SAS System for Windows, release 6.12, SAS Institute, Cary, NC, USA). The level of significance was set at $P < 0.05$. For each variable (treatment and point of storage), differences among means were determined. Interaction between the two variables was tested.

RESULTS

Proximate composition and pH

The pH of raw minced chicken thighs was 6.30. The composition was: total solids, 23.60%; fat, 3.75%; total nitrogen, 2.89%; ash, 1.09%.

Lipid oxidation

Preliminary test

Concerning raw samples, temperature controls (RT) and pressurised samples (RP) did not differ significantly from untreated samples (RU) at 1 day (Fig 1). There were no significant differences between RU and RT samples throughout the experiment. The TBARS

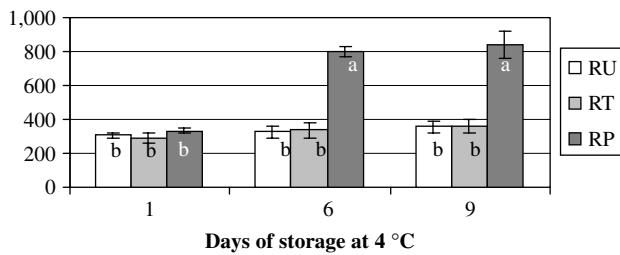


Figure 1. Thiobarbituric acid reactive substances values (malondialdehyde equivalents, ppm × 10⁻³) of raw minced chicken thighs stored in contact with air. Abbreviations: RU, untreated; RT, temperature controls (50 °C/30 min); RP, pressured treated (500 MPa/50 °C/30 min). Bars ($n = 4$) with a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

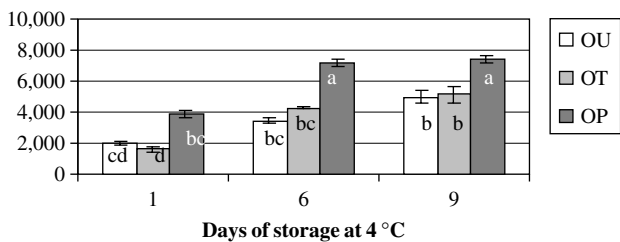


Figure 2. Thiobarbituric acid reactive substances values (malondialdehyde equivalents, ppm × 10⁻³) of overcooked (100 °C/60 min) minced chicken thighs stored in contact with air. Abbreviations: OU, untreated; OT, temperature controls (50 °C/30 min); OP, pressure treated (500 MPa/50 °C/30 min). Bars ($n = 4$) with a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

values of those samples did not increase with storage. In contrast, RP samples showed marked amounts of secondary oxidation compounds at 6 and 9 days.

Overcooked samples (Fig 2) showed TBARS values 10-fold higher than those of raw samples (Fig 1), which indicates an important pro-oxidative effect of heating. It is interesting to remark that an increase in TBARS values during storage occurred in all overcooked samples, whereas in the case of raw samples it only occurred in pressure-treated ones. Again, temperature controls (OT) were not significantly different from untreated samples (OU) throughout the experiment, but pressurised samples (OP) were significantly more oxidised than the other overcooked samples throughout the experiment, even at 1 day.

Second experiment

Samples presented lower TBARS values than those of the preliminary test. At 1 day after the treatments, there were no statistical differences in TBARS values among untreated samples, temperature controls and pressurised samples either for 30 min or for 60 min treatments (Table 1). Therefore pressure treatments did not enhance the generation of secondary oxidation compounds when chicken samples were vacuum stored. Cooked samples presented 20–35-fold higher values than all the other samples.

Table 1. Thiobarbituric acid reactive substance values (malondialdehyde equivalents, ppm × 10⁻³) of minced chicken thighs vacuum stored for 1 and 9 days at 4 °C^a

	Temp (°C)	Day 1		Day 9	
		30 min	60 min	30 min	60 min
T	-10	47.37b	44.76b	49.58b	63.74b
	5	49.52b	48.56b	48.88b	47.29b
	20	31.56b	49.24b	46.81b	50.33b
	50	41.49b	40.01b	38.33b	45.27b
P	-10	59.29b	54.00b	52.33b	55.95b
	5	55.01b	56.98b	61.33b	42.96b
	20	37.05b	42.58b	45.13b	46.80b
	50	32.77b	37.11b	37.24b	39.43b
C		1171.27a		1258.99a	
U		36.64b		40.70b	

^a Abbreviations: T, temperature controls (-10, 5, 20 and 50 °C/30 and 60 min); P, pressure treated (500 MPa/-10, 5, 20 and 50 °C/30 and 60 min); C, cooked (90 °C/15 min); U, untreated.

Values ($n = 4$) followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

No significant differences in TBARS values were observed among pressure-treated samples. Pressurisation for different times (30 and 60 min) generated similar amounts of secondary oxidation products.

When samples were vacuum stored for 9 days, TBARS contents did not differ significantly. Therefore lipid oxidation did not increase with storage time. Again, pressure treatment time did not influence the results.

Colour

Marked colour changes occurred when samples were pressurised or cooked (Table 2). For pressure-treated samples, the higher the temperature the greater was the total colour difference (ΔE).

Minced chicken thighs became pale when pressure or heat treated. Pressurised and cooked samples presented L values significantly higher than those of

Table 2. Colour parameters (L , a and b) and total colour difference (ΔE) of processed minced chicken thighs vacuum stored for 1 day at 4 °C^a

	Temp (°C)	L	a	b	ΔE
T	-10	45.75e	8.96c	13.60ab	2.70e
	5	45.17e	8.93c	13.74a	0.85ef
	20	45.49e	9.31b	13.75a	1.85ef
	50	53.06d	9.84a	12.84de	8.32d
P	-10	59.25c	7.32d	13.45abc	14.45c
	5	62.63b	7.08d	13.21bcd	17.81b
	20	63.76b	6.96d	12.49e	18.98b
	50	68.77a	5.14e	11.04f	24.24a
C		56.80c	5.48e	12.97de	12.32c
U		44.86e	8.50c	13.06cd	

^a Abbreviations: T, temperature controls (-10, 5, 20 and 50 °C/60 min); P, pressure treated (500 MPa/-10, 5, 20 and 50 °C/60 min); C, cooked (90 °C/15 min); U, untreated.

Values ($n = 12$) followed by a common letter within a column are not significantly different ($P < 0.05$).

untreated samples. The significantly palest samples were those pressurised at 20 and 50 °C. Temperature controls did not differ significantly from untreated samples except when the processing temperature was 50 °C.

Redness tended to decrease with pressurisation or cooking. Pressurised samples displayed a more important redness decrease with increasing treatment temperature. Cooked and 50 °C pressurised samples showed the significantly lowest *a* values. The rest of the pressure-treated samples presented a less intense *a* value reduction but were still significantly different from untreated samples. Temperature controls had *a* values closer to those of untreated samples than to those of pressure-treated samples.

Pressure and heat treatments also decreased yellowness, but not so markedly as redness. Samples pressurised at 50 °C showed the significantly lowest *b* values.

The total colour difference (ΔE) indicated that samples pressurised at 20 and especially 50 °C were modified in a stronger way than samples cooked or pressurised at -10 or 5 °C. Temperature controls processed at 50 °C also changed considerably.

DISCUSSION

Lipid oxidation

In the preliminary test a pro-oxidative effect of pressurisation at 500 MPa was clearly observed in raw and overcooked samples which were stored in contact with air. Secondary oxidation compounds of pressurised samples increased with time of storage, as lipid stability was altered by pressure. The induction of oxidation can be essentially attributed to pressure magnitude (500 MPa), because the low values detected in temperature controls confirm that processing time (30 min) and temperature (50 °C) did not affect lipid stability by themselves when applied under atmospheric pressure.

Overcooked samples displayed higher TBARS values than raw samples. Notice that the *y*-axis scales of Figs 1 and 2 are different. It is interesting to evaluate how high pressure affects chicken lipid stability when it is applied after heating. Heat treatment induced oxidation, and subsequent contact with air enhanced TBARS generation, which resulted in an increase in secondary oxidation compounds during storage. Some authors have found high pressure to increase oxidation in pork meat with treatments of up to 300 MPa,¹⁵⁻¹⁸ whereas turkey thigh pressurised at 500 MPa showed TBARS values similar to those of turkey thigh treated at 100 °C for 10 min.¹⁹ The preliminary test of this work indicated that chicken thighs were prone to lipid destabilisation when treated at 500 MPa and kept in contact with air. These results are in accordance with the pre-established belief about pressure-induced lipid oxidation. Owing to the severity of the heat treatment, OU samples were expected to have higher TBARS values than RP samples.

It was necessary to elucidate what occurred if pressure-treated chicken was kept under proper storage conditions, and how a conventional heat treatment affected lipid stability. Therefore the second part of the experiment was performed with pressurised and cooked chicken samples kept under refrigeration in darkness.

The TBARS values obtained in the second experiment were lower than those detected in the preliminary test, because a vacuum was maintained throughout storage in the second experiment. We did not observe lipid oxidation in raw chicken thighs pressurised at 200 and 300 MPa (data not shown). Fig 1 shows that 500 MPa pressure treatment of vacuum-packaged chicken thighs was less severe than conventional heat treatment. On the other hand, the processing temperature during the pressure treatments did not have any effect on lipid oxidation. As a vacuum was maintained during storage of processed chicken thighs, the damage induced by pressure was not strong enough to promote oxidation at such a low oxygen percentage.

Results from the second experiment are in agreement with those reported by Orlien *et al*,²⁰ which indicated that pressurisation at 500 MPa did not generate oxidation in chicken breast. Those authors kept the samples under vacuum storage and induced lipid oxidation by light. They worked with chicken breast (which contains less fat than thigh) that had been frozen and thawed, which can modify the TBARS values obtained. It would have been interesting to study the effect of light on samples stored in contact with air.

Colour

Both, pressure and heat treatments greatly modified the colour of minced chicken thighs, in such a way that the resulting product cannot be considered minimally processed. Pressurised samples had a cooked appearance, very different from that of fresh minced chicken. Redness plays a major role in meat colour evaluation. Thus there is a marked decrease in *a* value observed in pressurised samples with increasing temperature.

Trends are the same as those reported in a previous study with egg yolk, chicken thigh and liver.²⁵ Yuste *et al*,²⁶ with mechanically recovered poultry meat, and Carlez *et al*⁵ and Goutefongea *et al*,²² with beef meat, also reported an increase in lightness, and a decrease in redness induced by pressure.

CONCLUSIONS

High-pressure processing is a suitable treatment to obtain chicken thighs with minimal lipid oxidation and extended preservation if they are vacuum stored under refrigeration. Chicken thigh colour is modified by pressure treatment. Therefore pressurised meat and poultry cannot be marketed as fresh products, but can be incorporated as ingredients in ready-to-eat meals. It will be necessary to develop new sealed packages

to obtain processed foods that will satisfy consumer needs.

ACKNOWLEDGEMENT

This study has been supported by the Spanish Government under grant 1999FI-00771 and project ALI98-0508-C-02-01.

REFERENCES

- O'Brien JK and Marshall RT, Microbiological quality of raw ground chicken processed at high isostatic pressure. *J Food Protect* **59**:146–150 (1996).
- Yuste J, Pla R, Capellas M, Ponce E and Mor-Mur M, High pressure processing applied to cooked sausages: bacterial populations during chilled storage. *J Food Protect* **63**:1093–1099 (2000).
- Gray JL, Gomaa EA and Buckley DJ, Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci* **43**:111–123 (1996).
- Morrissey PA, Sheehy PJA, Galvin K, Kerry JP and Buckley DJ, Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci* **49**:73–86 (1998).
- Carlez A, Veciana-Nogués T and Cheftel JC, Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *Lebensm Wiss Technol* **28**:528–538 (1995).
- Raharjo S and Sofos JN, Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. *Meat Sci* **35**:145–169 (1993).
- Fernández J, Pérez-Álvarez JA and Fernández-López JA, Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem* **59**:345–353 (1997).
- Wang C, Zhu L and Brewer MS, Comparison of 2-thiobarbituric acid reactive substances determination methods in various types of frozen, fresh meat. *J Food Lipids* **4**:87–96 (1997).
- Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ and Trakatellis AG, Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* **42**:1931–1937 (1994).
- Ruiz JA, Pérez-Vendrell AM and Esteve-García E, Effect of dietary iron and copper on performance and oxidative stability in broiler leg meat. *Br Poultry Sci* **41**:163–167 (2000).
- Grau A, Guardiola F, Boatella J, Barroeta A and Codony R, Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters. *J Agric Food Chem* **48**:1155–1159 (2000).
- Tanaka M, Xueyi Z, Nagashima Y and Taguchi T, Effect of high pressure on the lipid oxidation in sardine meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**:957–963 (1991).
- Ohshima T, Ushio H and Koizumi K, High pressure processing of fish and fish products. *Trends Food Sci Technol* **4**:370–375 (1993).
- Angsupanich K and Ledward DA, High pressure treatments effect on cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chem* **63**:39–50 (1998).
- Cheah PB and Ledward DA, High-pressure effects on lipid oxidation. *J Am Oil Chem Soc* **72**:1059–1063 (1995).
- Cheah PB and Ledward DA, High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Sci* **45**:123–134 (1996).
- Cheah PB and Ledward DA, Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *J Food Sci* **62**:1135–1141 (1997).
- Cheftel JC and Culioli J, Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Sci* **46**:211–236 (1997).
- Dissing J, Bruun-Jensen L and Skibsted LH, Effect of high-pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage. *Z Lebensm Untersuch Forsch* **205**:11–13 (1997).
- Orlien V, Hansen E and Skibsted LH, Lipid oxidation in high pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *Eur Food Res Technol* **211**:99–104 (2000).
- Hayashi R, High pressure in food processing and preservation: principle, application and development. *High Press Res* **7**:15–21 (1991).
- Goutefongea R, Rampon V, Nicolas N and Dumont JP, Meat colour changes under high pressure treatment. *Proc 41st Int Congr of Meat Science and Technology*, San Antonio, TX, pp 384–384 (1995).
- Carlez A, Rosec JP, Richard N and Cheftel JC, High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *Lebensm Wiss Technol* **26**:357–363 (1993).
- McNeal JE, Meat and meat products, in *Official Methods of Analysis*. 15th edn, Ed by Helrich K. AOAC (Association of Official Analytical Chemists), Arlington, VA, pp 931–948 (1990).
- Beltran E, Yuste J, Pla R and Mor-Mur M, Colour evaluation in cooked and pressurized poultry products. *Proc XXI World Poultry Congr*, Montreal, CD-rom, Code W5.01 (2000).
- Yuste J, Mor-Mur M, Capellas M, Guamis B and Pla R, Mechanically recovered poultry meat sausages manufactured with high hydrostatic pressure. *Poultry Sci* **78**:914–921 (1999).

**3.2. LIPID OXIDATION OF PRESSURIZED AND COOKED CHICKEN:
ROLE OF SODIUM CHLORIDE AND MECHANICAL PROCESSING ON
TBARS AND HEXANAL VALUES**

Beltran, E., R. Pla, J. Yuste y M. Mor-Mur

Meat Science, 64, 19-25 (2003)

Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values

E. Beltran, R. Pla, J. Yuste, M. Mor-Mur*

*CER Planta de Tecnologia dels Aliments (CeRTA, XIT), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària,
Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

Received 31 January 2002; received in revised form 20 May 2002; accepted 20 May 2002

Abstract

Lipid oxidation of pressurized (300 and 500 MPa for 30 min at 20 °C) or cooked (90 °C for 15 min) minced chicken breast and slurries was evaluated. Mechanical processing, before and after pressurization and cooking, and addition of sodium chloride were also tested as prooxidant factors. At 1, 3, 6 and 9 days of storage at 4 °C, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and hexanal were quantified by means of the TBARS test and solid phase microextraction, respectively. In general, pressurized samples presented less oxidation compounds than cooked samples. Thiobarbituric acid reactive substances and hexanal values tended to rise with increasing storage time. Both parameters showed similar patterns throughout the experiment. Salt and mechanical processing had greater prooxidant effect on pressurized samples. Pre-treatment slurries presented more oxidation than post-treatment slurries. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Chicken; High pressure processing; Lipid oxidation; TBARS; SPME

1. Introduction

Lipid oxidation is one of the most important parameters that influence the quality and acceptance of meat and poultry. This reaction occurs easily in poultry, whose fat is highly unsaturated. It is known that heat treatment enhances lipid oxidation, and so the food industry is interested in developing new technologies that allow to process meat, poultry and derived products in a non-oxidant way.

High pressure processing has been applied experimentally to poultry products during the last 10 years. Under certain pressure–time–temperature combinations, marked decreases in initial bacterial counts occur and so the microbiological quality is greatly improved (Yuste, Pla, Capellas, Ponce, & Mor-Mur, 2000; O'Brien & Marshall, 1996).

With pressurization, colour changes in poultry are unavoidable (Beltran, Yuste, Pla, & Mor-Mur, 2000;

Goutefongea, Rampon, Nicolas, & Dumont, 1995; Carlez, Veciana-Nogués, & Cheftel, 1995). Furthermore, treatment conditions that are enough to inactivate microorganisms toughen the product (Cheftel & Culioli, 1997). For these reasons, pressurized poultry cannot be commercialized as a fresh product. However, treatment could be advantageous when working with comminuted products, which could be properly texturized by pressure, or with cured products, whose colour is not modified by pressure. With pressurization, it is possible to obtain gels from minced meat and poultry (Yoshioka, Kage, & Omura, 1992) and to enhance meat slurries coagulation (Shigehisa, Ohmori, Saito, Taji, & Hayashi, 1991). These facts open a wide area to develop new meat products ready to eat and with a high added value.

Lipid oxidation of pressurized foods is a challenging field to study. The analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is a commonly used technique when meat and poultry lipooxidation is evaluated (Fernández, Pérez-Álvarez, & Fernández-López, 1997).

The first work concerning lipooxidation from pressure-treated meat is that of Cheah and Ledward (1995),

* Corresponding author. Tel.: +34-93-581-1446; fax: +34-93-581-2006.

E-mail address: montserrat.mor-mur@uab.es (M. Mor-Mur).

where it was reported that rendered pork fat suffered irreversible changes when submitted to 800 MPa. These changes led to lipooxidation increase when working at water activities between 0.4 and 0.55. However, lipooxidation was lower than controls if processing rendered pork fat at fresh meat water activity. In another study (Cheah & Ledward, 1996), pork meat and washed pork fibers treated at 300 MPa oxidized more than untreated ones. Pork meat oxidized more intensively than washed fibers, and so hemoproteins were not the only oxidation starting agent, because washed fibers also oxidized. In this sense, Cheftel and Culioli (1997) suggested that oxidation might be initiated in the non-soluble fraction of muscle, and stated that it is unlikely that hemoproteins initiate oxidation. Cheah and Ledward (1997) tested antioxidant effect of: citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), crystalline butylated hydroxytoluene (BHT), and crystalline butylated hydroxyanisole (BHA), and defensed transition metal ions as the oxidation initiators.

In a recent study, Dissing, Bruun-Jensen, and Skibsted (1997) observed that turkey treated at 500 MPa for 30 min at 10 °C had TBARS amount close to that of cooked turkey (100 °C for 10 min). Orlien, Hansen, and Skibsted (2000) pressurized chicken and reported that a treatment at 800 MPa for 10 min at 10 °C was necessary to reach TBARS values similar to those obtained with cooking at 80 °C for 10 min. The magnitude of pressure was found much more important than the length of exposure time. Iron release was not observed when pressurizing; so, it was suggested that oxidation could be initiated in the cell membrane.

Warmed over flavours (WOF) are considered an essential quality parameter in cooked meats since Tims and Watts (1958) defined them. Hexanal is the most important WOF compound. Solid phase microextraction (SPME) is a solvent-free technique that allows to quantify volatile compounds rapidly (Arthur & Pawliszyn, 1990). In the case of processed meat, hexanal is the most characteristic volatile compound that can be measured by SPME (Brunton, Cronin, Monahan, & Durcan, 2000). Analysis of hexanal levels by SPME as a measure of oxidation is very reliable, and different fibers and treatment conditions have been tested in cooked and raw turkey (Brunton, Cronin, & Monahan, 2001; Brunton et al., 2000). There are some studies that properly correlate the amounts of TBARS and hexanal (Brunton et al., 2000; Nielsen, Sørensen, Skibsted, & Bertelsen, 1997).

In view of the foregoing, the aims of this work were: (1) to investigate the influence of sodium chloride and mechanical processing, before and after pressure and heat treatments, on chicken lipid oxidation; (2) to compare and evaluate the effectiveness of TBARS test and SPME to quantify lipooxidation of pressurized and cooked chicken breast.

2. Materials and methods

2.1. Experimental procedure

Fig. 1 shows the schematic diagram for sample processing.

2.2. Sample preparation and pre-treatment mechanical processing (slurries)

Whole chicken breast was obtained from a local market. Bones and connective and adipose tissues were removed, and then muscle was minced. Sodium chloride was added to minced chicken. The doses tested were 0% (M# and M###) and 5% (A# and A###). From one part of the batch, pre-treatment slurries (MS# and AS#) were made by mixing the product with water (1:3, w/w) at 15,000 rpm for 30 s at 20 °C with a high-speed homogenizer (Heidolph, Schwabach, Germany). Cellulose casing portions (Nojax[®], Viskase, Bagnolet, France) were filled with MS# and AS# samples. Pre-treatment slurries and the other part of the batch were vacuum-packaged in BB4L plastic bags (Cryovac, Sealed Air Co., Sant Boi de Llobregat, Spain), stored in darkness at 4 °C and treated the same day.

2.3. High pressure and heat treatments

Samples were pressurized at 300 MPa (M3, A3, MS3 and AS3) and 500 MPa (M5, A5, MS5 and AS5) for 30 min at 20 °C. A discontinuous isostatic press (ALSTOM, Nantes, France) was used. The pressure chamber and the water inside were held at 20 °C, monitored with a thermocouple, by circulating hot water through a coil. Samples were allowed to reach the treatment temperature in this chamber before pressurization.

Other samples were cooked in a water bath at 90 °C for 15 min (MC, AC, MSC and ASC) and, immediately after, cooled in running tap water for 30 s. Some samples were not treated (M0, A0, MS0 and AS0). The experiment was performed twice.

2.4. Refrigeration storage and post-treatment mechanical processing (slurries)

After the treatments, the bags were opened to allow contact with air. Pre-treatment slurries were put in glass capped pots after removing the cellulose casing. All samples were kept in darkness at 4 °C.

Post-treatment slurries (M#S and A#S) were made from one part of the treated minced chicken just before analyses (M0S, M3S, M5S, MCS, A0S, A3S, A5S and ACS).

TBARS analysis and SPME were performed at 1, 3, 6 and 9 days after the treatments.

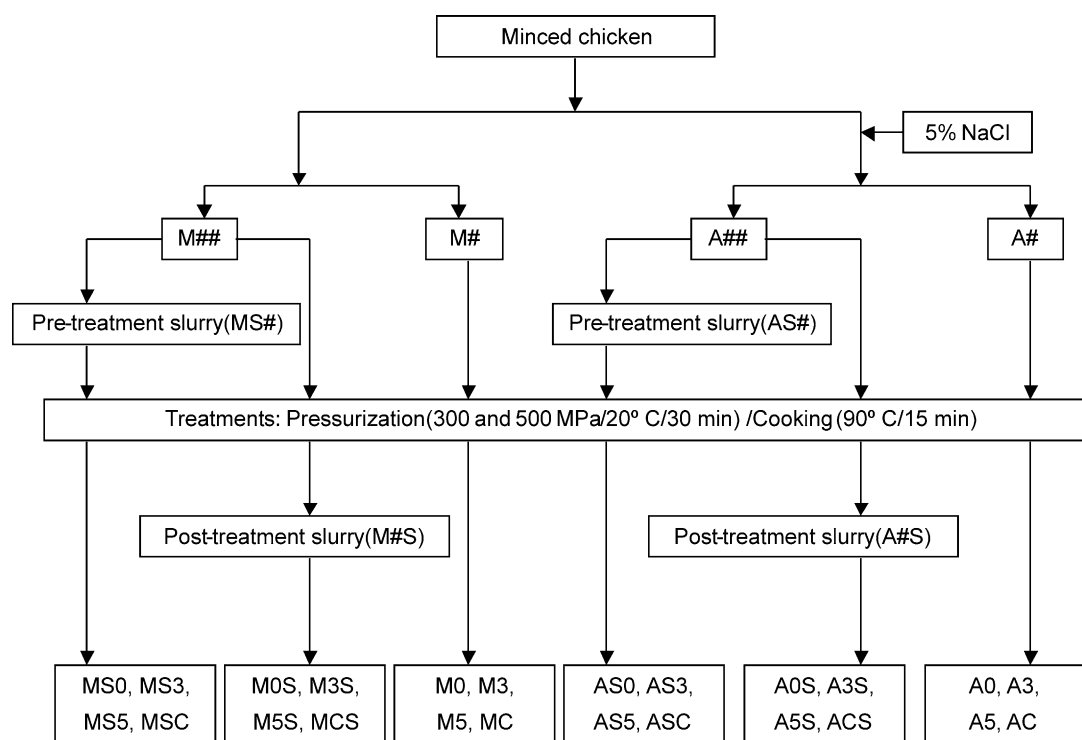


Fig. 1. Diagram of minced chicken processing. Sample codification is shown.

2.5. Thiobarbituric acid reactive substances analysis

The extraction method of Botsoglou et al. (1994) was applied to all samples, and suggestions from Grau, Guardiola, Boatella, Barroeta, and Codony (2000) were considered. Butylated hydroxytoluene (Sigma, Steinheim, Germany) at 0.08% in hexane (Riedel-de Haën, Seelze, Germany) was added to samples to protect from the oxidation induced by the analytical procedure. Other reagents were supplied by Panreac (Barcelona, Spain) and Sigma. Absorbance was measured with a spectrophotometer (Cecil Instruments, Cambridge, UK) at 521 nm at the third derivative spectrum, produced by electronic differentiation of the normal spectrum. Results are expressed in ppm of malondialdehyde equivalents, because they also include other TBARS. Two replicates of each sample were analyzed.

2.6. Solid phase microextraction

Hexanal headspace quantification was performed by SPME; the equipment was from Supelco (Bellefonte, Philadelphia, USA). A gas chromatograph, equipped with a flame ionization detector and splitless injection port (Hewlett Packard, Willmington, Germany) was used. Volatile compounds were separated by using a 5% diphenyl capillary column (30 m length, 0.32 mm internal diameter, 1 µm coating thickness; Tracer, Sant Cugat del Vallès, Spain). The carrier and make-up gas was high-purity helium at a flow rate of 23.1 and 45 ml/

min, respectively. High-purity hydrogen (30 ml/min) and compressed air (450 ml/min) were supplied to the flame ionization detector. The injector and detector temperatures were 250 and 300 °C, respectively. The column oven temperature was programmed at increasing temperature from 40 to 240 °C at a rate of 10 °C/min, and from 240 to 250 °C at a rate of 5 °C/min. The output signal from the detector was integrated with a Hewlett Packard Chemstation software. Hexanal was identified and quantified by using a standard (Chem Service, West Chester, Philadelphia, USA).

Solid phase microextraction was applied to pre-treatment and post-treatment slurries. An aliquot (1 ml) was put into a 4 ml vial fitted with plastic septum (Chromacol, Herts, UK). The SPME fibre (75 µm carboxen-polydimethylsiloxane film thickness; Supelco, Bellefonte, Philadelphia, USA) was introduced into the vial headspace and equilibrated at 45 °C for 30 min with shaking. The fibre was then removed from the headspace and desorbed at the gas chromatograph injection port for 10 min.

2.7. Statistical analysis

Thiobarbituric acid reactive substances and hexanal values were subjected to analysis of variance of the General Linear Models Procedure of SAS software (the SAS System for Windows, release 6.12, SAS Institute, Cary, NC, USA). Level of significance was set for $P < 0.05$. Differences among means were determined.

3. Results and discussion

3.1. Thiobarbituric acid reactive substances analysis

In the first part of the experiment, mechanical processing effect on minced chicken (M#) and chicken slurries (MS# and M#S) was determined. Mechanical processing causes cellular damage and oxygen incorporation, and so induces oxidation. Slurries were made before (MS#) and after (M#S) pressure and heat treatments to evaluate how important is the moment of application of the mechanical processing and how does it influence lipoxidation. The results are shown in Fig. 2(a–c). For minced chicken, minimal TBARS levels were found in M0, M3 and M5 throughout the experiment [Fig. 2(a)]. In contrast, MC presented higher values since the first day of storage. It seems that oxidation was not initiated in untreated and pressurized samples. So, the 500 MPa treatment was not enough to induce oxidation in minced chicken breast.

The mechanical processing applied after pressure and heat treatments did not affect M0S, M3S and M5S, but enhanced oxidation in MCS [Fig. 2(b)]. Values of MCS were two-fold higher than those of MC. The cooked sample presented the significantly highest values again.

Fig. 2(c) shows TBARS values of slurries made before pressure and heat treatments. MS0 did not differ from M0 or M0S, which indicates that mechanical processing did not affect untreated samples in terms of oxidation. However, mechanical processing affected MS5 and MSC, which had higher TBARS values than M5 and MC. When comparing Fig. 2(c) and (b) it is seen that pressurization at 500 MPa increased TBARS values in pre-treatment slurries more than cooking. This means that mechanical processing caused structural changes that allow subsequent 500 MPa pressurization to induce greater oxidation. Pre-treatment mechanical action especially influenced samples pressurized at 500 MPa, which indicates that pressure and heat treatments alters differently chicken meat structure.

Orlien et al. (2000) established 500 MPa as the critical pressure to process chicken breast without indication of rancidity. This was also found in this work: oxidation was not enhanced in minced chicken breast treated at 500 MPa. However, mechanical actions had a very important effect over pressurized and cooked samples. It is essential to know how chicken is handled during the processing to predict the degree of oxidation. The results of this work confirm the relation between lipid oxidation and cellular membrane damage, as suggested by Orlien et al. (2000).

In the second part of the experiment, 5% of sodium chloride was added to minced chicken. The prooxidant effect of salt has been widely reported (Rhee & Ziprin, 2001; Kanner, Harel, & Jaffe, 1991); so TBARS values were expected to increase when sodium chloride was

added. In general, an increase in TBARS values of samples with salt is observed [Fig. 2(d–f)], compared to the samples with no salt [Fig. 2(a–c)]. Notice that Fig. 2 has different scales in parts a–c and d–f. For minced chicken, AC and A0 presented the highest and the lowest values, respectively [Fig. 2(d)]. The prooxidant effects of sodium chloride and pressurization or cooking were synergistic, but the effect of salt was more marked in A5 than in AC samples.

When slurries were made after pressure and heat treatments, oxidation was enhanced in A5S and ACS samples [Fig. 2(e)]. The differences among the four slurries (A0S, A3S, A5S and ACS) were clearer at 1 and more days of storage than those observed in Fig. 2(d). Compared to samples with no salt [Fig. 2(b)], the increase in values was higher in A5S samples than in ACS.

For salted pressurized samples, the highest TBARS values occurred in pre-treatment slurries with A5S being statistically more oxidized than ASC [Fig. 2(f)]. In cooked samples, the increase in TBARS levels was less marked. In fact, ASC had lower values than ACS until 6 days of storage.

It is essential to know how sodium chloride influences lipid oxidation because it is commonly used in meat and poultry industries. In the present work, it is shown that it affects more pressurized samples than conventionally cooked ones.

3.2. Solid phase microextraction

There are no published data about SPME in pressurized poultry but hexanal has been described as a good parameter to measure rancidity in cooked meats (Brunton et al., 2000; Nielsen et al., 1997).

The pattern of hexanal generation was very similar to that observed when measuring TBARS. Untreated samples (M0S and MS0) did not present hexanal [Fig. 3(a,b)]. This was expected because hexanal is a volatile compound characteristic of cooked meat and poultry. Pressurization at 300 MPa (M3S and MS3) did not induce hexanal production. However, cooking generated considerable hexanal amount at 1 and more days of storage. Hexanal values of MCS and MSC showed trends very similar to those of TBARS production; but in MCS, hexanal content was always higher than in MSC. The hexanal amount was very low in M5S, whereas MS5 had an hexanal content very similar to that of MSC. This corroborates the hypothesis that the mechanism of pressure-induced oxidation is related to the effect on the cell membrane. The greater the damage in cell membrane, the higher the rancidity of the product.

Untreated samples with sodium chloride (A0S and AS0) did not present hexanal throughout the experiment [Fig. 3(c,d)]. Cooked samples (ACS and ASC) had hexanal amounts similar to those of cooked samples

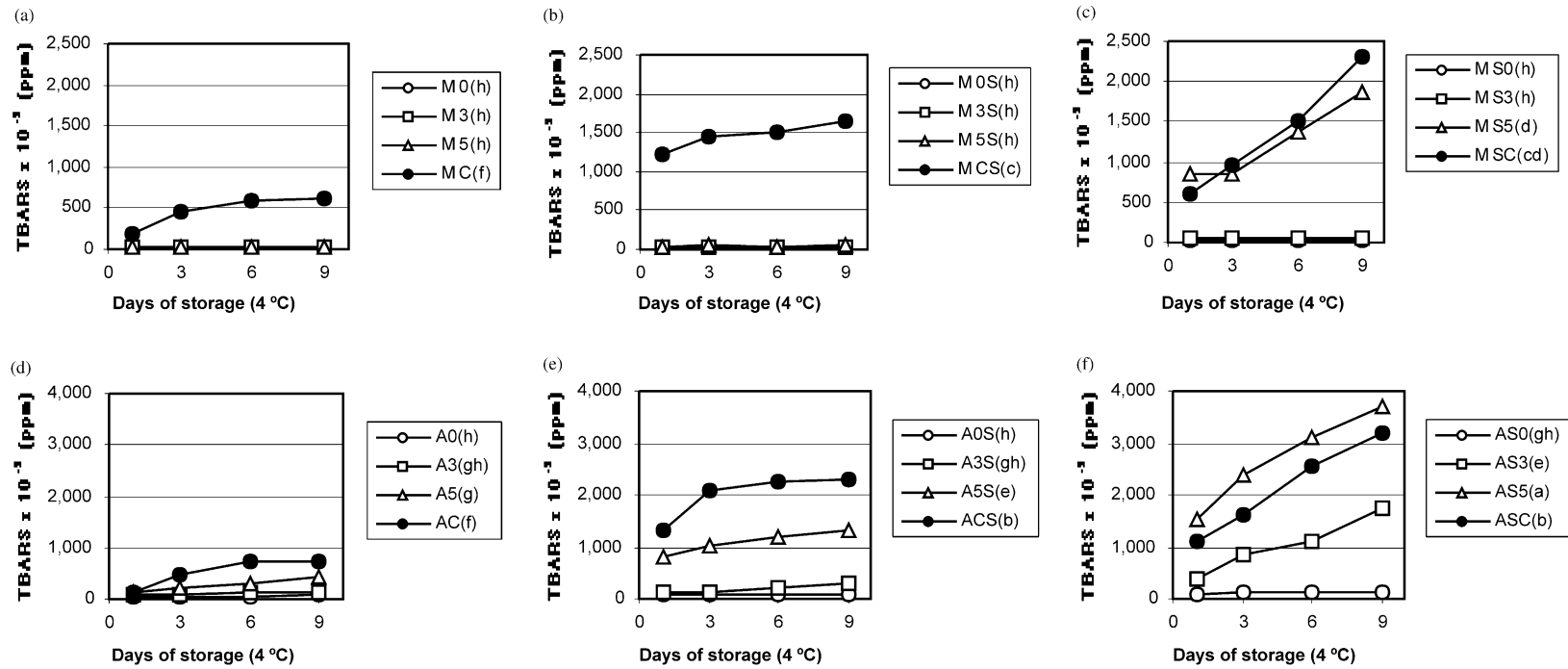


Fig. 2. TBARS values of pressurized (300 and 500 MPa/20 °C/30 min) or cooked (90 °C/15 min) samples containing 0% (a–c) or 5% (d–f) of sodium chloride: (a and d) minced chicken; (b and e) post-treatment slurries (15,000 rpm/20 °C/30 s); (c and f) pre-treatment slurries (15,000 rpm/20 °C/30 s). Treatments that are followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

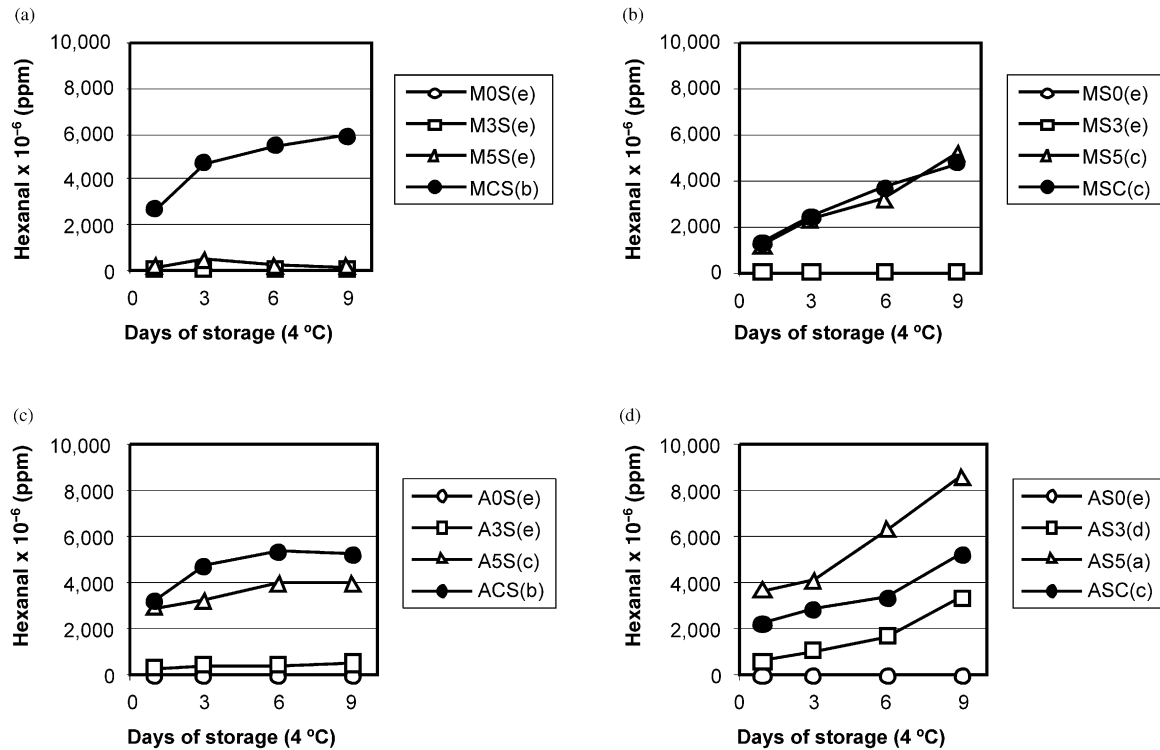


Fig. 3. Hexanal values of pressurized (300 and 500 MPa/20 °C/30 min) or cooked (90 °C/15 min) samples containing 0% (a and b) or 5% (c and d) of sodium chloride: (a and c) post-treatment slurries (15,000 rpm/20 °C/30 s); (b and d) pre-treatment slurries (15,000 rpm/20 °C/30 s). Treatments that are followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

with no salt (MCS and MSC). When applying SPME to measure hexanal, a prooxidant effect of sodium chloride in cooked samples was not observed. So, it seems that salt did not influence oxidation of cooked samples if measured in terms of hexanal.

In contrast, sodium chloride had an important prooxidant effect on samples that were pressurized (A3S, A5S, AS3 and AS5), which displayed higher hexanal levels than the samples without salt (M3S, M5S, MS3 and MS5). Samples pressurized at 300 MPa presented lower amounts of hexanal than those pressurized at 500 MPa. If pressurization is compared with cooking, hexanal values of A5S were lower than those of ACS [Fig. 3(c)], but AS5 had higher hexanal levels than ASC [Fig. 3(d)].

4. Conclusions

In general, pressurization up to 500 MPa induces less oxidation than cooking, both for minced chicken breast and pre-treatment slurries. Lipid oxidation of pressurized chicken samples is connected with cell membrane damage. Solid phase microextraction is a technique as valid as the TBARS test to measure rancidity in pressurized and cooked chicken. In terms of oxidation, sodium chloride and mechanical processing have greater effect on pressurized samples than on cooked ones.

As oxidation of pressurized meat and poultry products is strongly influenced by formulation and all manufacture steps, it is very important in the industry to monitor the overall process so that oxidation of pressure-treated products can be minimized.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Jacob H. Nielsen for SPME training in the Foulum Research Centre at the Danish Institute of Agricultural Sciences (Foulum, Denmark). This work has been financially supported by the Spanish project AL198-0508-C-02-01 and grant 1999FI00771.

References

- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148.
- Beltran, E., Yuste, J., Pla, R., & Mor-Mur, M. (2000). Colour evaluation in cooked and pressurized poultry products. In *Proceedings XXI World's Poultry Congress*, 20–24 August 2000, Montreal, Canada.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931–1937.

- Brunton, N. P., Cronin, D. A., & Monahan, F. J. (2001). The effects of temperature and pressure on the performance of Carboxen/PDMS fibres during solid phase microextraction (SPME) of headspace volatiles from cooked and raw turkey breast. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 294–302.
- Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J., & Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, 68, 339–345.
- Carlez, A., Veciana-Nogués, T., & Cheftel, J. C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 528–538.
- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1995). High-pressure effects on lipid oxidation. *Journal of the American Oils Chemists' Society*, 72(9), 1059–1063.
- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43(2), 123–134.
- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1997). Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *Journal of Food Science*, 62(6), 1135–1141.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46(3), 211–236.
- Dissing, J., Bruun-Jensen, L., & Skibsted, L. H. (1997). Effect of high-pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und-Forschung*, 205, 11–13.
- Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59(3), 345–353.
- Goutefongea, R., Rampon, V., Nicolas, N., & Dumont, J. P. (1995). Meat colour changes under high pressure treatment. In *Proceedings 41th International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 384–385), 20–25 August 1995, San Antonio, TX.
- Grau, A., Guardiola, F., Boatella, J., Barroeta, A., & Codony, R. (2000). Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1155–1159.
- Kanner, J., Harel, S., & Jaffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1017–1021.
- Nielsen, J. H., Sørensen, B., Skibsted, L. H., & Bertelsen, G. (1997). Oxidation in pre-cooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Science*, 46(2), 191–197.
- O'Brien, J. K., & Marshall, R. T. (1996). Microbiological quality of raw ground chicken processed at high isostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 59, 146–150.
- Orlien, V., Hansen, E., & Skibsted, L. H. (2000). Lipid oxidation in high pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research and Technology*, 211, 99–104.
- Rhee, K. S., & Ziprin, Y. A. (2001). Pro-oxidative effects of NaCl in microbial growth-controlled and uncontrolled beef and chicken. *Meat Science*, 57, 105–112.
- Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S., & Hayashi, R. (1991). Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 207–216.
- Tims, M. J., & Watts, B. M. (1958). Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technology*, 12, 240–243.
- Yoshioka, K., Kage, Y., & Omura, H. (1992). Effect of high pressure on texture and ultrastructure of fish and chicken muscles and their gels. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, & P. Masson (Eds.), *High pressure and biotechnology (Colloque INSERM Vol. 224)* (pp. 325–327). Montrouge, France: John Libbey Eurotext/Les Editions INSERM.
- Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., Ponce, E., & Mor-Mur, M. (2000). High pressure processing applied to cooked sausages: bacterial populations during chilled storage. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1093–1099.

3.3. USE OF ANTIOXIDANTS TO MINIMIZE RANCIDITY IN PRESSURIZED AND COOKED CHICKEN SLURRIES

Beltran, E., R. Pla, J. Yuste y M. Mor-Mur

Meat Science, 66, 719-725 (2004)

Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries

E. Beltran, R. Pla, J. Yuste, M. Mor-Mur*

CER Planta de Tecnologia dels Aliments (CeRTA, XIT), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 6 January 2003; received in revised form 11 July 2003; accepted 25 July 2003

Abstract

Sodium chloride (5%) and some antioxidants (400 ppm rosemary extract; 2000 ppm acerola extract; 50 ppm ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA); 1,000, 2,000, and 5,000 pm of sodium hexametaphosphate or 5 and 10% egg white powder) were added to minced chicken. From these mixtures, slurries were made by mixing with water (1:3) at 15,000 rpm for 30 s at 20 °C. Samples were pressurized (300, 500 and 900 MPa for 30 min at 20 °C) or cooked (90 °C for 15 min). Hexanal was quantified by solid phase microextraction at 1, 3, 6 and 9 days of 4 °C storage in contact with air. Hexanal values increased with pressure and storage time. Cooked slurries had higher hexanal contents than samples pressurized at 300 MPa, but lower than those treated at 500 and 900 MPa. Rosemary extract was an antioxidant for pressure-treated samples, but had little effect on cooked ones. Acerola extract was not an effective antioxidant, but EDTA strongly inhibited oxidation. Hexamethaphosphate also showed antioxidant ability. Egg white powder inhibited hexanal generation, which can be a new way for revalorizing egg constituents.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Chicken slurry; High pressure processing; Sodium chloride; Lipid oxidation; SPME; Antioxidants

1. Introduction

Warmed over flavours (WOF), first defined by Tims and Watts (1958), reduce shelf life of cooked meats (Mielche & Bertelsen, 1994). It is essential to control lipid oxidation to delay the development of those WOF, because this is one of the major reasons for spoilage of meat-based products. Further research about its origin and prevention needs to be done.

Solid phase microextraction (SPME) is an analytical procedure developed by Arthur and Pawliszyn (1990). Hexanal, which is the most important marker of WOF development (Ajuyah, Fenton, Hardin, & Sim, 1993; Antony, Rieck, & Dawson, 2000), is used as an indicator of the rancidity status. Hexanal has been previously tested as qualitatively comparable to the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test (Nielsen, Sørensen, Skibsted, & Bertelsen, 1997; Brunton, Cronin, Monahan, & Durcan, 2000; Brunton,

Cronin, & Monahan, 2001; Beltran, Pla, Yuste, & Mor-Mur, 2003), and its determination is faster and easier than conventional methods for evaluating lipid oxidation.

High pressure processing improves the microbiological sanitary quality of raw chicken (O'Brien & Marshall, 1996; Yuste, Pla, Capellas, Ponce, & Mor-Mur, 2000), but some important appearance changes occur (Carlez, Veciana-Nogués, & Cheftel, 1995; Cheftel & Culioli, 1997). There are few studies on lipid oxidation of pressurized meats. It was observed that pressurized pork oxidized more than untreated pork, and that the oxidation initiators were not only haemo-proteins but also the non-soluble fraction of muscle (Cheah & Ledward, 1995, 1996; Cheftel & Culioli, 1997). Cheah and Ledward (1997) suggested transition metals as lipid oxidation catalysts, after testing some antioxidants on pressure-treated pork meat. If studies from Dissing, Bruun-Jensen, and Skibsted (1997) and Orlien, Hansen, and Skibsted (2000) are compared, turkey lipids seemed to be more pressure-sensitive than chicken lipids, but oxidation rate increased in both meats after pressurization. Orlien et al. (2000) did not detect iron release after pressurization and stated that

* Corresponding author. Tel.: +34-93-581-14-46; fax.: +34-93-581-20-06.

E-mail address: montserrat.mor-mur@uab.es (M. Mor-Mur).

lipid oxidation can be initiated in the cell membrane. In fact, Kato and Hayashi (1999) had already concluded that high pressure decreases biomembrane fluidity, which induces membrane breakage and concomitant bilayer destruction with membrane protein denaturation.

The authors (Beltran et al., 2003) reaffirmed that lipid stability of pressurized poultry, evaluated by means of TBARS test and SPME, is related to cell membrane integrity. They found that pressure treatments up to 500 MPa did not enhance lipid oxidation of minced chicken breast, whereas cooking did. A mechanical action performed previously to the treatments over samples containing 5% of sodium chloride, affected extremely the lipid stability of pressurized chicken. This probably occurred because the free metal ions attacked the disorganized cell membrane and lipid oxidation was easily induced.

Sodium chloride is an important muscle food prooxidant (Higgins, Kerry, Buckley, & Morrissey, 1999; Rhee & Ziprin, 2001) for several reasons: (1) ionic iron release from its binding macromolecules (Kanner, Harel, & Jaffe, 1991); (2) membrane lipids exposure to oxidation initiators because of cell membrane damage by sodium chloride (Ahn, Wolfe, & Sim, 1993); (3) decrease in antioxidant enzymes activity (Lee, Mei, & Decker, 1997); (4) some microelements contaminating the salt (El-Alim, Lugasi, Haari, & Dworschock, 1999). However, sodium chloride is extensively used in meat and poultry formulations due its antimicrobial, technological and sensory properties. So, the food industry needs to know how to prevent its prooxidant effect on lipids.

The use of antioxidants to extend shelf-life of cooked poultry has been extensively investigated (Lopez-Bote, Gray, Goma, & Flegal, 1998; Nissen, Månsson, Bertelsen, Huynh-Ba, & Skibsted, 2000). Nowadays, consumers are concerned about the health risks related to consumption of some synthetic antioxidants, and so research is focusing on the use of natural antioxidants (Ahn et al., 1993; Antony et al., 2000).

The aim of this work was to test the role of several antioxidants in chicken slurries submitted to several pressure conditions and or cooked.

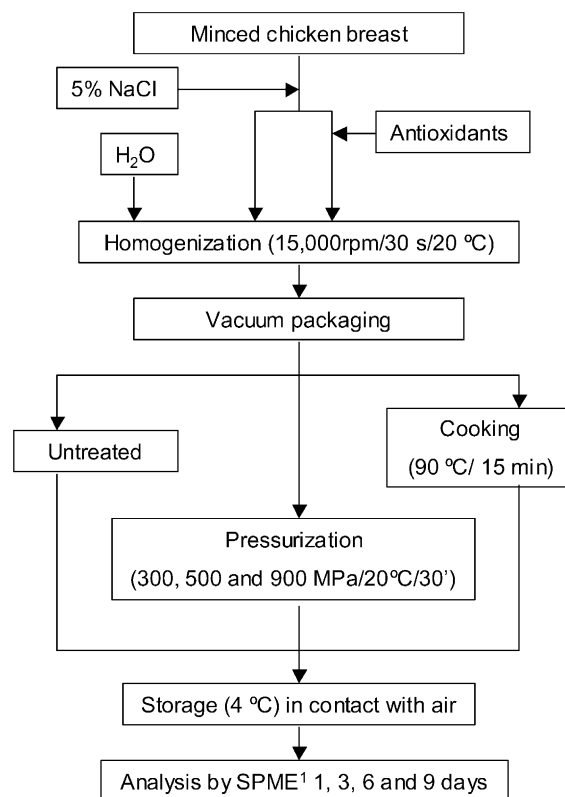
2. Materials and methods

2.1. Experimental procedure

Fig. 1 shows the schematic diagram for sample processing.

2.2. Sample preparation

Whole chicken breast was obtained from a local market. Breast muscle was minced with a household mincer after removing bones, connective and adipose tissues. Then, 5% of sodium chloride (w/w) and several



¹SPME: Solid phase microextraction

Fig. 1. Diagram for sample processing.

antioxidants (Table 1) were added to the minced chicken. Slurries were made by blending each mixture with water (1:3, w/w) at 15,000 rpm for 30 s at 20 °C with a high-speed homogenizer (Heidolph, Schwabach, Germany). Cellulose casing portions (Nojax[®], Viskase, Bagnolet, France) were filled with the samples (ca. 25 g), and then vacuum-packaged in BB4L plastic bags (Cryovac, Sealed Air Co., Sant Boi de Llobregat, Spain), stored in darkness at 4 °C and treated the same day. The experiment was performed twice.

2.3. High pressure and heat treatments

In the first part of the experiment, some samples were pressurized at 300 and 500 MPa for 30 min at 20 °C. The same treatments plus one at 900 MPa were performed in the second part of the experiment. A discontinuous isostatic press (Stansted Fluid Power, Stansted, UK) was used. The pressure chamber and the water inside were held at 20 °C, monitored with a thermocouple, by circulating hot water through a coil. Samples were allowed to reach the treatment temperature in this chamber before pressurization.

Other samples were cooked in a water bath at 90 °C for 15 min and, immediately after, cooled in running tap water for 30 s.

Some samples were not treated.

Table 1
Antioxidants added to minced chicken with 5% of sodium chloride

Antioxidant	Code	Dose	Supplier
Rosemary extract ^a (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	RE ^b	400 ppm	Laboratorios Amerex (Madrid, Spain)
Acerola extract ^c (<i>Malpighia punicifolia</i>)	AE ^b	2,000 ppm	Exquim (Sant Cugat del Vallès, Spain)
Ethylenediamine tetraacetic acid	EDTA ^b	50 ppm	Probus (Barcelona, Spain)
Sodium hexametaphosphate	HMP ^d	1,000, 2,500 and 5,000 ppm	Sucesores José Escuder (Rubí, Spain)
Egg white powder	EW ^d	5 and 10%	Degussa Texturant Systems España (Rubí, Spain)

^a 6% of carnosol and 6% of rosmanol.

^b Tested in the first experiment.

^c 17% of ascorbic acid.

^d Tested in the second experiment.

2.4. Refrigeration storage

After the treatments, the bags were opened to allow contact with air. The slurries were put into glass capped pots after removing the cellulose casing. All samples were kept in darkness at 4 °C for 9 days.

2.5. Solid phase microextraction

Hexanal headspace quantification was performed by SPME at 1, 3, 6 and 9 days after the treatments. A gas chromatograph (Supelco, Bellefonte, PA, USA) equipped with a flame ionization detector and splitless injection port (Hewlett Packard, Willmington, Germany) was used. Analysis was performed as described by Beltran et al. (2003).

2.6. Statistical analysis

Hexanal values were analyzed by using a mixed model for repeated measures. A mixed model was developed using SAS software (the SAS System for Windows, release 8, SAS Institute, Cary, NC, USA). For repeated measures an heterogeneous autoregressive, ARH-(1), structure of covariance was adjusted. Least square means are the means adjusted by the model. Multiple tests were developed to compare least square means of the samples in pairs. Statistical significance was set at 5% level.

3. Results and discussion

The adjusted covariance structure, ARH-(1), assumed a 0.6 correlation between periods, which means that the repeated measures are highly correlated. The variance of the response was heterogeneous, and increased with storage evolution. Both the effects of treatment, antioxidant and time, and the interactions among the effects were significant ($P < 0.05$). So, the effects of treatment, antioxidant and time were not independent.

In this work, hexanal amount increased during storage in pressurized and cooked chicken without antioxidants, and in some samples with antioxidants. This

was also observed by other authors (Beltran et al., 2003; Brunton et al., 2000; Nielsen et al., 1997), and is related to rancidity development.

Cooking has been found to be a prooxidant treatment, and in the presence of sodium chloride, ionic iron release from the heme pigment has been detected (Halliwell & Gutteridge, 1984). Chen, Pearson, Gray, Foadi, and Ku (1984), confirmed this fact, and stated that heating caused an increase in WOF. Concerning pressure treatment, iron release was not detected after processing (Orlien et al., 2000), and minced chicken breast kept its lipids stable up to 500 MPa (Beltran et al., 2003).

Hexanal values of the first part of the experiment are shown in Table 2. The values increased as storage progressed, and time was found to influence them significantly ($P < 0.05$). Hexanal values of slurries without antioxidants increased significantly with higher pressures. Hexanal contents of cooked samples were higher than those of slurries treated at 300 MPa, but significantly lower than those pressurized at 500 MPa. In a previous study (Beltran et al., 2003) the authors observed similar patterns of hexanal and TBARS values.

Rosemary extract (RE) showed antioxidative effect on pressurized samples if compared with those without antioxidants, but it did not protect lipids of cooked samples (Table 2). Slurries with RE, treated at 300 MPa had hexanal values significantly lower than slurries with RE treated at 500 MPa. The antioxidative substances of RE are phenolic compounds that neutralize free radicals by donating an hydrogen atom (Barbut, Josephson, & Maurer, 1985; Resurrection & Reynolds, 1990; Wong, Hashimoto, & Shibamoto, 1995), but there is evidence that RE also acts as a metal chelator (Basaga, Tekkaya, & Acikel, 1997). In this experiment, RE protected effectively pressurized slurries, in which the induction period was extended. The inability to protect cooked slurries could be explained by the presence of a larger amount of radicals or a more intense disorganization of the muscle caused by cooking treatment. A higher dose of RE would probably have had an antioxidant effect on cooked samples, but 400 ppm was the dose recommended by the

Table 2

Least square means of hexanal values ($\text{ppm} \times 10^{-6}$) of pressurized and cooked chicken slurries (15,000 rpm/30 s/20 °C) containing 5% of sodium chloride and antioxidants, and stored at 4 °C in contact with air^a

Antioxidants	Treatments	Days			
		1	3	6	9
No antioxidant	U (c)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (b)	709.4	2575.8	3143.4	4143.0
	5 (a)	5741.0	5814.8	6620.0	10,371.0
	C (b)	2031.2	2150.0	4760.0	5867.0
Rosemary extract (400 ppm)	U (c)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (c) ^b	0.0	45.3	196.0	528.4
	5 (a) ^b	2503.8	4671.0	8432.0	6905.6
	C (b)	1906.0	2462.6	7750.0	4325.4
Acerola extract (2,000 ppm)	U (c)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (b)	1586.2	1893.6	4865.7	8859.8
	5 (a)	4372.2	4544.0	7802.1	8839.8
	C (b)	1738.0	2424.2	6676.0	6121.6
EDTA ^c (50 ppm)	U (a)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (a) ^b	0.0	0.0	0.0	0.0
	5 (a) ^b	0.0	0.0	0.0	0.0
	C (a) ^b	0.0	0.0	0.0	0.0
EDTA ^c + acerola extract (50 + 2,000 ppm)	U (a)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (a) ^b	0.0	0.0	0.0	0.0
	5 (a) ^b	0.0	0.0	72.2	851.6
	C (a) ^b	0.0	0.0	1497.2	3911.6
EDTA ^c + Rosemary extract (50 + 400 ppm)	U (a)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (a) ^b	0.0	0.0	0.0	0.0
	5 (a) ^b	0.0	0.0	0.0	0.0
	C (a) ^b	0.0	0.0	0.0	0.0

^a U: untreated. 3: 300 MPa/30 min/ 20 °C. 5: 500 MPa/30 min/20 °C. C: 15 min/90 °C. For each antioxidant or combination of antioxidants, treatments followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

^b Treatments caused significantly lower hexanal values than that of their respective samples without antioxidant.

^c EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid.

supplier. Murphy, Kerry, Buckley, and Gray (1998) detected inhibition of lipid oxidation in cooked beef with higher doses of rosemary extract (500–1000 ppm). Hexanal content of slurries with RE and pressurized at 500 MPa or cooked were substantially different throughout the experiment, but at the end of the storage, both samples showed similar values. The hexanal reductions observed in slurries treated at 500 MPa or cooked, at 9 days of storage at 4 °C could be due to aldehyde breaking in shorter chains at later stages of storage (Brewer, Ikins, & Harbers, 1992), or reaction between carbonyl groups and proteins in a non-oxygen dependant process (Nissen et al., 2000). So, the termination step of the oxidative chain in those samples could have started because phenolic compounds limit radical production and oxidation reaction does not propagate extensively.

Acerola extract (AE) is rich in ascorbic acid. The highest content (2424 mg/100 g) is in the immature

green stage of acerola fruit (Assis, Lima, & Faria Oliveira, 2001). Ascorbic acid has been widely used as a food additive because it inhibits metmyoglobin formation and lipid oxidation in meat products (Lee, Hendricks, & Conforth, 1999). It regenerates primary antioxidants, inactivates pro-oxidant metals and scavenges reactive oxygen radicals; but it acts as a pro-oxidant in the presence of iron and hydrogen peroxide or hydroperoxide (Niki, 1991). Lately, it is believed that it is only effective in preventing metmyoglobin formation (Sánchez-Escalante, Djenane, Torrescano, Beltran, & Roncalés 2001), but it has little, if any, beneficial effect on meat stability (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, & Buckley, 1998). No antioxidant effect was observed either in pressurized or cooked slurries with AE, no pattern differences were observed respect non added samples (Table 2).

As metal ions have been described as the main cause of WOF (Gray & Pearson, 1987), ethylenediamine

tetraacetic acid (EDTA), a well-known metal chelator was tested. This molecule has been described as an oxidation inhibitor in cooked meats (Igene, King, Pearson, & Gray, 1979). Cheah and Ledward (1997) found 1 and 2% EDTA effective to inhibit TBARS induction in pressurized minced pork and washed pork fibres. Those authors stated that metal chelators are appropriate antioxidants to prevent lipid oxidation in pressure-processed meat. Transition metal ion catalysis was the major factor involved in increase of lipid oxidation. Isaacs (1981) reported that reduction from ferric to ferrous state is enhanced by pressure treatment as the reaction has a negative activation volume. Ferrous ion is a strong oxidation catalyst that is rapidly oxidized to ferric ion during storage, but that can induce lipid oxidation during the treatments. Table 2, shows that hexanal production was totally inhibited in slurries with EDTA. The same occurred when the chelator was combined with RE. Some hexanal was detected in EDTA plus AE samples pressurized at 500 MPa or cooked, from 6 days of storage, but it was not significantly dif-

ferent from other slurries added with EDTA plus AE. Those results indicate that lipid oxidation is linked to the presence of free metals when a strong disorganization of the muscle has been produced.

In the second part of the experiment other chelators were tested and a higher pressure (900 MPa) was applied to better evaluate the action of pro-oxidant and antioxidant factors.

Again, slurries without antioxidants displayed pressure-dependent hexanal values (Table 3); however, differences between treatments at 500 and 900 MPa were not significant. This indicates that increasing pressure does not cause a linear increasing oxidative response. It is possible that pressure has a maximum oxidative effect but, also, that the oxidation in the slurry is limited, i.e. more oxidation can not be induced in this substrate, and samples without antioxidants pressurized at 500 and 900 MPa are close to the maximum oxidation point.

Phosphates are extensively used in the meat and poultry industries for several purposes. Their chelating effect was reported by Tims and Watts (1958) and, since

Table 3

Least square means of hexanal values ($\text{ppm} \times 10^{-6}$) of pressurized and cooked chicken slurries (15,000 rpm/30 s/20 °C) containing 5% of sodium chloride and antioxidants and stored at 4 °C in contact with air^a

Antioxidants	Treatments	Days			
		1	3	6	9
No antioxidant	U (d)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (c)	536.5	990.9	1461.7	1914.0
	5 (a)	3358.6	3967.8	4695.4	7060.2
	9 (a)	2685.0	4510.8	5899.4	8020.1
	C (b)	1728.3	2791.1	3316.8	4734.2
Hexametaphosphate (2,500 ppm)	U (b)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (b)	7.0	26.5	243.8	270.6
	5 (a)	1410.2	3193.4	4165.7	5574.2
	9 (a)	2079.8	3365.6	5049.8	7510.4
	C (b)	862.1	1472.6	2106.3	2010.2
Hexametaphosphate (5,000 ppm)	U (c)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (c)	0.0	28.0	89.2	91.0
	5 (b) ^b	390.8	1316.3	1426.1	4568.0
	9 (a)	1922.6	3867.4	5249.4	8655.6
	C (c) ^b	589.7	1105.4	1651.4	2429.8
Egg white (5%)	U (b)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (b)	8.5	24.1	435.4	771.6
	5 (a) ^b	1077.0	1549.7	2524.6	3596.2
	9 (a) ^b	900.0	1130.6	2274.2	4041.2
	C (a)	707.0	1221.7	2604.8	4559.8
Egg white (10%)	U (a)	0.0	0.0	0.0	0.0
	3 (a)	0.0	35.7	99.81	200.3
	5 (a) ^b	136.1	227.2	746.3	1358.4
	9 (a) ^b	405.8	546.7	1258.3	1885.6
	C (a) ^b	263.5	358.3	1036.7	1630.4

^a U: untreated. 3: 300 MPa/30 min/20 °C. 5: 500 MPa/30 min/20 °C. C: 15 min/ 90 °C. For each antioxidant or combination of antioxidants, treatments followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$)

^b Treatments caused significantly lower hexanal values than that of their respective samples without antioxidant.

then, several studies have dealt with these molecules, which induce a slight increase in pH and a more stable environment in terms of lipid oxidation (Stoick, Gray, Booren, & Buckley, 1991; Murphy et al., 1998). Tripolyphosphate and hexametaphosphate (1000 ppm) were added in a preliminary study and no antioxidant effect was observed in any case (data non shown). Hexametaphosphate (HMP) was tested at two higher doses: samples with 2500 ppm of HMP had not significantly lower hexanal values than their respective non-aded samples, but slurries with 5000 ppm of HMP showed lower values when treated at 500 MPa or cooked. Sodium tripolyphosphate (5000 ppm) was found beneficial for lipid stability of cooked chicken breast patties (Ang & Young, 1989). In general, the higher the dose of HMP, the lower the hexanal value (Table 3). Lipid oxidation rate of samples treated at 300 MPa was lowered throughout the experiment, and the sample was not distinct from non treated sample. So, HPM could have induced the termination of the oxidative chain prior to the exponential progress. There is evidence that 2500 ppm of HMP prevented effectively lipid oxidation of slurries treated at 300 MPa, and these samples were much more stable than cooked ones. Hexametaphosphate had more marked effect on slurries pressurized at 500 MPa than on those treated at 900 MPa when added at 5000 ppm. While slurries without antioxidants tested at 500 and 900 MPa did not differ, when HMP was added, the 900 MPa treatment caused deeper changes in lipid stability that were more difficult to neutralize.

Finally, egg white powder (EW) was tested at 5 and 10%. Some proteins have antioxidant activity due to ion metal chelation (Wong & Kitts, 2001). Ovotransferrin, also called conalbumin, is a 13% of the total egg white proteins and binds iron reversibly (Croguennec, Nau, Pezennec, & Brulé, 1999). Ladikos and Lougouois (1990) stated that conalbumin and some aminoacids have chelating ability, which minimize the iron effect on lipid oxidation. In this work, EW showed a clear dose-dependent antioxidant effect (Table 3). Egg white had been reported to increase thiobarbituric acid reactive substances values in turkey meat patties, but it showed an antioxidant effect in sodium chloride-added patties (Ahn et al., 1993). The present work proved the antioxidant action of EW in the presence of sodium chloride, with greater effectiveness if used at 10%, but with more antioxidative action on pressurized than in cooked samples if used at 5%. Untreated and treated slurries with 10% of EW did not show significant differences in hexanal values among them. So, EW is a robust antioxidant for some pressure-treated foods, besides improving their nutritive value by increasing the protein content.

4. Conclusions

Lipid oxidation of minced chicken muscle depends on the magnitude of pressure treatment. The increase in oxidation rate is not linear. Rosemary extract, metal chelators and egg white were effective on controlling oxidation of pressure-treated samples. Acerola extract did not show any antioxidative potential. The use of proteins as antioxidant is an easy and healthy way for improving lipid stability of treated samples. It can be a new way for using proteins and revaluing egg constituents.

Acknowledgements

The authors thank Joan Valls from the *Servei d'Estadística* at the *Universitat Autònoma de Barcelona*, for his statistics advice. This work has been financially supported by the Spanish project ALI98-0508-C-02-01 and grant 1999FI00771.

References

- Ahn, D. U., Wolfe, F. H., & Sim, J. S. (1993). Prevention of lipid oxidation in pre-cooked turkey meat patties with hot packaging and antioxidant combinations. *Journal of Food Science*, *58*, 283–287.
- Ajuyah, A. O., Fenton, T. W., Hardin, R. T., & Sim, J. S. (1993). Measuring lipid oxidation volatiles in meats. *Journal of Food Science*, *58*, 270–277.
- Ang, C. Y. W., & Young, L. L. (1989). Factors relating to oxidative stability of cooked broiler breast patties treated with sodium tripolyphosphate. *Journal of Food Science*, *54*, 1151–1154.
- Antony, S., Rieck, J. R., & Dawson, P. L. (2000). Effect of dry honey on oxidation in turkey breast. *Poultry Science*, *79*, 1846–1850.
- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica fibers. *Analytical Chemistry*, *62*, 2145–2148.
- Assis, S. A., Lima, D. C., & de Faria Oliveira, O. M. M. (2001). Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of development. *Food Chemistry*, *74*, 133–137.
- Barbut, S., Josephson, D. B., & Maurer, A. J. (1985). Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *Journal of Food Science*, *50*, 1356–1359.
- Basaga, H., Tekkaya, C., & Acikel, F. (1997). Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, *30*, 105–108.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., & Mor-Mur, M. (2003). Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science*, *64*, 19–25.
- Brewer, M. S., Ikins, W. G., & Harbers, C. A. Z. (1992). TBA values, sensory characteristics, and volatiles in ground pork during long-term frozen storage: effects of packaging. *Journal of Food Science*, *57*, 558–563.
- Brunton, N. P., Cronin, D. A., & Monahan, F. J. (2001). The effects of temperature and pressure on the performance of carboxen/PDMS fibres during solid phase microextraction (SPME) of headspace volatiles from cooked and raw turkey breast. *Flavour and Fragrance Journal*, *16*, 294–302.

- Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J., & Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, 68, 339–345.
- Carlez, A., Veciana-Nogués, T., & Cheftel, J. C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 28, 528–538.
- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1995). High-pressure effects on lipid oxidation. *Journal of the American Oil's Chemist's Society*, 72, 1059–1063.
- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43, 123–134.
- Cheah, P. B., & Ledward, D. A. (1997). Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *Journal of Food Science*, 62, 1135–1141.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46, 211–236.
- Chen, C. C., Pearson, A. M., Gray, J. I., Fooladi, M. H., & Ku, P. K. (1994). Some factors influencing the nonheme iron content of meat and its implications on oxidation. *Journal of Food Science*, 49, 581–584.
- Croguennec, T., Nau, F., Pezennec, S., & Brulé, G. (1999). Chromatographic heterogeneity of ovotransferrin from egg white. In *proceedings VII European symposium on The quality of eggs and egg Products* (pp. 47–53), 19–23 September 1999, Bologna, Italy.
- Dissing, J., Bruun-Jensen, L., & Skibsted, L. H. (1997). Effect of high-pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und-Forschung*, 205, 11–13.
- El-Alim, S. S. L. A., Lugasi, A., Hóvári, J., & Dworschák, E. (1999). Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked meat patties during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 277–285.
- Gray, J. I., & Pearson, A. M. (1987). Rancidity and warmed over flavour. *Advanced Meat Research*, 3, 221–269.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 1, 1396–1397.
- Higgins, F. M., Kerry, J. P., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (1999). Effects of α -tocopheryl acetate supplementation and salt addition on the oxidative stability (TBARS) and warmed-over flavour (WOF) of cooked turkey meat. *British Poultry Science*, 40, 59–64.
- Igene, J. O., King, J. A., Pearson, A. M., & Gray, J. I. (1979). Influence of heme pigments, nitrite and non-heme iron on development of warmed over flavour (WOF) in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 838–842.
- Isaacs, N. S. (1981). Effects of pressure on rate processes. In N. S. Isaacs (Ed.), *Liquid-phase high-pressure chemistry* (pp. 181–353). New York: John Wiley and Sons.
- Kanner, J., Harel, S., & Jaffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1017–1021.
- Kato, M., & Hayashi, R. (1999). Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 1321–1328.
- Ladikos, D., & Lougouois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chemistry*, 35, 295–314.
- Lee, B. J., Hendricks, D. G., & Conforth, D. P. (1999). A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef patty model system. *Meat Science*, 51, 245–253.
- Lee, S. K., Mei, L., & Decker, E. A. (1997). Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. *Meat Science*, 46, 349–355.
- López-Bote, C. J., Gray, J. I., Gomaa, A., & Flegal, C. J. (1998). Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *British Poultry Science*, 39, 235–240.
- Mielche, M. M., & Bertelsen, G. (1994). Approaches to the prevention of warmed-over flavour. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 322–327.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73–S83.
- Murphy, A., Kerry, J. P., Buckley, J., & Gray, I. (1998). The anti-oxidative properties of Rosemary oleoresin and inhibition of off-flavours in pre-cooked roast beef slices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 235–243.
- Nielsen, J. H., Sørensen, B., Skibsted, L. H., & Bertelsen, G. (1997). Oxidation in pre-cooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Science*, 46, 191–197.
- Niki, E. (1991). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 227–253.
- Nissen, L. R., Månsson, L., Bertelsen, G., Huynh-Ba, T., & Skibsted, L. H. (2000). Protection of dehydrated chicken meat by natural antioxidants as evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5548–5556.
- O'Brien, J. K., & Marshall, R. T. (1996). Microbiological quality of raw ground chicken processed at high isostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 59, 146–150.
- Orlien, V., Hansen, E., & Skibsted, L. H. (2000). Lipid oxidation in high pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research and Technology*, 211, 99–104.
- Resurrection, A. V. A., & Reynolds, A. E. (1990). Evaluation of natural antioxidants in frankfurters containing chicken and pork. *Journal of Food Science*, 55, 629–631.
- Rhee, K. S., & Ziprin, Y. A. (2001). Pro-oxidative effects of NaCl in microbial growth-controlled and uncontrolled beef and chicken. *Meat Science*, 57, 105–112.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrecano, G., Beltran, J. A., & Roncalés, P. (2001). The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 58, 421–429.
- Stoick, S. M., Gray, J. I., Booren, A. M., & Buckley, D. J. (1991). Oxidative stability of restructured beef steaks processed with oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone and sodium tryptophosphate. *Journal of Food Science*, 56, 597–600.
- Tims, M. J., & Watts, B. M. (1958). Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technology*, 12, 240–243.
- Wong, J. W., Hashimoto, K., & Shibamoto, T. (1995). Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2707–2712.
- Wong, P. Y. Y., & Kitts, D. D. (2001). An iron binding assay to measure activity of known food sequestering agents: studies with buttermilk solids. *Food Chemistry*, 72, 245–254.
- Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., Ponce, E., & Mor-Mur, M. (2000). High pressure processing applied to cooked sausages: bacterial populations during chilled storage. *Journal of Food Protection*, 63, 1093–1099.

3.4. COLOR AND LIPID STABILITY OF PRESSURE- AND HEAT-TREATED EGG YOLK

Beltran, E., M. Mor-Mur, J. Yuste, M. Buffa y R. Pla

3

4

5

6

7

8 **COLOR AND LIPID STABILITY OF PRESSURE- AND HEAT-TREATED EGG YOLK.**

9

10

11

12

13 **Color and Lipid Stability of Pressure- and Heat-Treated Egg Yolk. Role of pH,**

14 **Sodium Chloride and Antioxidants**

15

16 E. Beltran, M. Mor-Mur, J. Yuste, M. Buffa, R. Pla¹

17

18 *CER Planta de Tecnologia dels Aliments (CeRTA, XIT),*

19 *Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària,*

20 *Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

21

¹ To whom correspondence should be addressed: reyes.pla@uab.es. Dr. Reyes Pla. Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CeRTA, XIT), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. [Tel.](tel:+34935814112) - +34 93 581 41 12. [Fax.](tel:+34935811494) +34 93 581 14 94

1 **COLOR AND LIPID STABILITY OF PRESSURE- AND HEAT-TREATED EGG YOLK.**

2

3 **Color and Lipid Stability of Pressure- and Heat-Treated Egg Yolk. Role of pH,**
4 **Sodium Chloride and Antioxidants**

5

6

7

8

9 **ABSTRACT**

10 *Egg yolk with added sodium chloride (0 and 5 %) was treated with high pressure (500 or*
11 *900 MPa/ 15 min/ 20 °C) and heat (15 min/ 80 °C) at three different pH values (6.2, 5.0*
12 *and 3.0) and then stored for 9 days under refrigeration conditions. Ethylene diamine*
13 *tetraacetic acid (EDTA) and egg white powder (EW) antioxidant abilities were tested.*
14 *Sodium chloride, pH and the treatments influenced significantly egg yolk color. Values of*
15 *TBARS determined on salted egg yolk were strongly influenced by pH. Hydroperoxides*
16 *and ultraviolet compounds analyses gave no conclusive results that indicated the need to*
17 *improve the methods used. The fatty acid profile was not considerably modified by pH, the*
18 *treatments and storage time. EDTA performed a better antioxidant action than EW at pH 3,*
19 *which was the most pro-oxidant pH value.*

20

21

22 *Key words: egg yolk, high pressure processing, lipid oxidation, pH, sodium chloride*

23

24

25

INTRODUCTION

26

27

28 The increasing demand of convenience foods pushes industry to develop new
29 products that satisfy consumer needs. Non-thermal technologies play an important role on
30 this area, because they make it possible to obtain convenient processed foods with high
31 quality standards and not very different from fresh products.

32 For many years, eggs have been classified as a food associated with important
33 health risks. Nowadays, *Salmonella* spp. Infections are more controlled because egg
34 production is more sanitized than some years ago, and consumers are concerned about
35 the proper manipulation of eggs. On the other hand, latest studies related to
36 cardiovascular diseases affirm that egg consumption is not as linked to these health
37 problems as it was thought in the past (Hu *et al.*, 1999). Eggs have excellent nutritional
38 properties and are a cheap protein source. It is very interesting for the industry to develop
39 high-value-added egg products, and few studies into this area have been done at the
40 moment.

41 High pressure processing has been applied experimentally to egg products for
42 more than ten years. Several works (Ponce *et al.*, 1998a,b,c) have shown that
43 pressurization improves the sanitary status of liquid whole egg, and some works
44 concerning egg physical properties have also been published (Iametti *et al.*, 1999; Lee *et*
45 *al.*, 1999; Ponce, 2000; Ponce *et al.*, 2002). However, there is no information about lipid
46 stability of pressurized eggs, which is essential to estimate the quality of pressurized egg
47 products.

48 Eggs treated with high pressure are strongly protected against alteration. Despite
49 containing abundance of lipids and metal catalysts in the egg yolk, raw egg lipids are very
50 stable against oxidation (Pike and Peng, 1985, 1988a; Marshall *et al.*, 1994; Cherian *et al.*,
51 1996). Botsoglou *et al.* (1997) detected basal levels of malondialdehyde (MDA) when

52 performing thiobarbituric acid (TBA) test over raw egg yolk. Malondialdehyde is not
53 generated during shell egg storage, but it can be found in fresh eggs because it is
54 produced *in vivo* by hens. Malondialdehyde contents differ when determined by different
55 methods, so it is essential to be careful when absolute values are compared.

56 Several studies (Pike and Peng, 1988b; Botsoglou *et al.*, 1997) have shown that
57 increased acidity enhances lipid oxidation in foods and model food systems, and egg
58 products are not an exception. Denaturation or hydrolysis of egg yolk protein results in
59 amplified lipid oxidation, with the action of metal catalysts, as iron and copper, being
60 probably the primary reason (Pike and Peng, 1988a). Phosvitin is a protein whose
61 conformation determines its ability to link iron (Weller, 1979). So, phosvitin could be
62 involved in lipid oxidation by releasing iron (Pike and Peng, 1988a,b).

63 Preliminary experiments performed by the authors showed that high pressure and
64 heat treatments affected slightly the lipid stability of egg yolk processed at its native pH.

65 The aim of the first part of this work was to investigate the consequences, in terms
66 of color and lipid stability, of processing egg yolk with pressure and heat under conditions
67 simulating those found in the industry: sodium chloride was added to egg yolk and different
68 pH values were evaluated. Secondly, some antioxidants were tested at different pH values
69 to find ways for control lipid oxidation.

70

71

MATERIALS AND METHODS

72

Experimental Procedure

74

Figure 1 shows the schematic diagram for sample processing.

75 **Raw Materials**

76 Fresh shell hen eggs were obtained from a local market. Egg yolk was isolated,
77 homogenized by hand, and filtered. Potentiometric measurements of pH were done with a
78 penetration pH-meter combination electrode¹.

79 In the first part of the experiment (single lines in Figure 1), 0 and 5 % (w/w) of
80 sodium chloride were added to the homogenate and the samples were coded as non-
81 salted (##N) and salted (##S). Some samples were processed at its native pH (pH=6.2;
82 6##). By adding chlorhydric acid (3 N)² under constant stirring, the pH of the other samples
83 was lowered to 5.0 (5##) and 3.0 (3##).

84 The second part of the experiment (double lines in Figure 1) was performed with
85 egg yolk at pH 3.0 (3##) with 5 % of sodium chloride. Samples were directly processed
86 (##0) or some antioxidants were added previously to the treatments: ethylene diamine
87 tetraacetic acid³ (EDTA; 100 pm; ##E) and egg white powder (EW; 10 % w/w; ##A). As
88 EW addition made egg yolk pH change from 3.0 to 4.0 (4##), the pH of half of those
89 samples was readjusted to 3.0 (3##) with some more 3N HCl.

90 Cellulose casing portions (Nojax[®])⁴ were filled with samples (ca. 25 g) at the
91 different pH values, vacuum packaged in BB4L plastic bags⁵, stored in darkness at 4 °C,
92 and pressure or heat treated the same day.

93

94 **Pressure and Heat Treatments**

95 Some samples were pressurized at 500 (#p#) and 900 MPa (#P#) for 15 min at 20
96 °C. A discontinuous isostatic press⁶ was used. The pressure chamber and the water inside

¹ CRISON, Alella, Spain

² Panreac, Madrid, Spain

³ Panreac, Madrid, Spain

⁴ Viskase, Bagnolet, France

⁵ Cryovac, Sealed Air Co., Sant Boi de Llobregat, Spain

⁶ Stansted Fluid Power, Stansted, UK

97 were held at 20 °C, monitored with a thermocouple, by circulating hot water through a coil.
98 Samples were allowed to reach the treatment temperature in this chamber before
99 pressurization. Other samples were heated in a water bath at 80 °C for 15 min (#C#) and,
100 immediately after, cooled in running tap water for 30 min. Some samples were not treated
101 (#U#). After the treatments, the bags were opened and the samples were put into glass-
102 capped pots after removing the cellulose casing. Samples were stored in darkness at 4 °C
103 until analyses at 1, 3, 6 and 9 days after the treatments.

104 The first part of the experiment was performed twice and the second part was
105 repeated three times.

106

107 ***Proximate Composition***

108 The AOAC official methods of analysis were applied to determine egg yolk
109 composition at the starting point of the experiment (Helrich, 1990).

110

111 ***Color***

112 Three color parameters, *L* (lightness), *a* (redness) and *b* (yellowness) values, were
113 determined with a portable HunterLab spectrophotometer⁷ and total color difference was
114 calculated: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$. Samples were homogenized by hand and
115 measurements were done just after the treatments by using a non-reflecting capsule. Six
116 measurements were done for each group of samples.

117

118 ***Lipid Extraction***

119 Egg yolk fat was extracted by following the method of Blight and Dyer (1959) at
120 days 1, 6, and 9. Reagents were from Panreac (Barcelona, Spain), Riedel-de Haën
121 (Seelze, Germany) and Sigma (Steinheim, Germany). ***Hydroperoxides*** and ***ultraviolet***

122 compounds were measured as described by Shantha and Decker (1994) and Grau *et al.*
123 (2000), respectively. The **Fatty acid profile** was determined. For this purpose the
124 extracted lipids were methylated as indicated by Morrison and Smith (1964), and 0.5µL
125 samples were injected into a gas chromatograph, equipped with a flame ionization detector
126 and splitless injection port⁸. Methylated fatty acids were separated by using a 30% methyl
127 + 70% cyanopropyl-polysiloxane capillary column (BPX70; 30 m length, 0.53 mm internal
128 diameter, 0.5 µm coating thickness)⁹. The carrier and make-up gas was high-purity helium
129 at a flow rate of 23.1 and 45.0 mL/min, respectively. High-purity hydrogen (30 mL/min) and
130 compressed air (450 mL/min) were supplied to the flame ionization detector. The injector
131 and detector temperatures were 280 °C. The column oven temperature was programmed
132 at increasing temperature from 75 to 148 °C at 4 °C/min, from 148 to 158 °C at 2.5 °C/min,
133 and from 158 to 225 °C at 5 °C/min. The output signal from the detector was integrated
134 with a Hewlett Packard Chemstation software. Fatty acids were identified and quantified by
135 retention times and by addition of standards¹⁰.

136

137 **TBA Test**

138 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) analysis was performed at days 1,
139 3, 6 and 9 as described by Beltran *et al.* (2003). Results are expressed in ppm of MDA
140 equivalents, because they include TBARS other than MDA. Two and three replicates of
141 each sample were analyzed in the first and second parts of the experiment respectively.

142

⁷ MiniScan XE™, Hunter Associates Laboratory, Reston, Virginia, USA

⁸ Hewlett Packard, Willmington, Germany

⁹ SGE, Ringwood, Australia

¹⁰ Chem Service, West Chester, Philadelphia, USA

143 **Statistics**

144 Color, TBARS, hydroperoxides and fatty acids values were subjected to analysis of
145 variance of the General Lineal Models Procedure of SAS software (the SAS System for
146 Windows, release 6.12)¹¹. Level of significance was set for $P < 0.05$. Differences among
147 means were determined.

148

149

RESULTS AND DISCUSSION

150

151 ***Proximate Composition***

152 The pH of homogenized and filtered egg yolk was 6.2, and its composition was:
153 49.4 % of total solids; 30.0 % of fat; 2.5 % of total nitrogen; and 2.2 % of ash. These
154 results are normal composition parameters for hen egg yolk and similar values have been
155 reported by Anton (1998).

156

157 ***Color***

158 Color is a very important physical property and greatly determines consumer
159 acceptance of food. With heat processing, considerable variations are unavoidable. High
160 pressure processing has been described as an alternative treatment with a special impact
161 over food color (Hayashi, 1991). In a previous experiment (Beltran *et al.*, 2000), no marked
162 changes in lightness and redness were detected when pressurized and heated egg yolk
163 samples were compared with untreated samples. However, heated egg yolk showed the
164 lowest yellowness and it was clearly different from the other samples, whereas yellowness
165 of pressurized egg yolk did not change and a hard gel was obtained despite processing
166 samples at room temperature.

¹¹ SAS Institute, Cary, North Carolina, USA

167 Addition of 5 % of sodium chloride to the yolk affected color parameters: *L*, *a* and *b*
168 values were significantly lower in 6US than in 6UN (Table 1). So, the original egg yolk was
169 lighter, and with more intense redness and yellowness than the salted untreated sample at
170 pH 6.2.

171 Concerning color modifications induced by pH in #US, lightness decreased
172 significantly when pH was modified from 6.2 to 5.0. However, at pH 3 this parameter
173 increased, probably due to the gel structure induced by protein denaturation under acidic
174 conditions. Similar trends were observed for redness and yellowness (Table 1).

175 The conventional heat treatment considerably affected egg yolk lightness if
176 compared with their respective untreated samples. It caused a significant increase in *L*
177 value, which was more marked with decreasing pH. Redness increased significantly in
178 heated samples at pH 6.2 and 5.0, whereas at pH 3.0 no significant differences occurred.
179 A significant yellowness increase was also detected at the three pH values, which is not in
180 agreement with the strong decrease detected in the previous experiment (Beltran *et al.*,
181 2000) with non-salted egg yolk. Sodium chloride affects yolk constituents and,
182 subsequently the color of the product.

183 Pressure treatment influenced differently the color parameters, depending on the
184 process intensity. Pressurization significantly decreased lightness and yellowness in 6##
185 and 5p#, whereas the opposite effect was observed in 3## and 5P#. These facts could be
186 explained by the effect of pressure and pH on protein denaturation. At pH 5.0 the 500 MPa
187 treatment could not be enough to generate an opaque protein gel that enhances egg yolk
188 lightness. A general increase in redness was observed, being more marked at 900 than at
189 500 MPa. Redness decrease occurred only in the case of 6p# samples.

190 Regarding total color difference, if compared with 6UN, untreated and pressurized
191 samples at pH 5.0 and heated samples at pH 3.0 showed the highest numbers. When total
192 data are evaluated by comparing data within pH groups, it is clearly observed that total

193 color difference values of pressurized samples are closer to values of untreated samples
194 than to those of heated samples.

195 Therefore, modifying pH, sodium chloride content, and type and conditions of
196 treatment can control egg yolk color, so that the final color fits with the use given to the egg
197 yolk product. Some more experiments are needed to study it.

198

199 ***Fatty Acid Profile***

200 The fatty acid profile obtained matches with that reported by Anton (1998). The
201 percentages were: almost 40% of monounsaturated, more than 30% of saturated and less
202 than 30% of polyunsaturated. There were four major fatty acids: C18:1 > C18:2 > C16 >
203 C18 (Table 2), and five minor fatty acids: C20:4 > C18:3 > C22:6 > C16:1 > C14 (Table 3).

204 No marked changes in the egg yolk fatty acid profile occurred with the processing
205 of samples (Tables 2 and 3). At the first day after the treatments, significant differences
206 depending on pH and treatment were only observed in the case of C22:6. From days 1 to
207 9, it was detected a significant decrease of C16 and C18 in heated samples at pH 6.2 and
208 3.0, and a significant increase of C16:1 in heated samples at pH 3.0 and of C18:3 in all
209 heated samples.

210 At 9 day after the treatments, differences were detected for the four major fatty
211 acids (C16, C18, C18:1 and C18:2): C16 and C18 were found in a significantly lower
212 percentage in heated samples at pH 3.0 and 6.2. Such samples at pH 3.0 displayed a
213 significantly higher percentage of C18:1 and C18:2 than samples pressurized,
214 respectively, at 900 MPa. Moreover, significant changes in C18:3 were detected at 9 days:
215 samples at pH 5.0 pressurized at 500 MPa displayed a percentage significantly lower than
216 heated samples at pH 6.2 and 3.0, whereas pH 6.2 cooked egg yolk showed a percentage
217 of C18:3 significantly higher than that of untreated and pressurized samples.

218 Despite the significant modifications described above, when analyzing them, the
219 change magnitudes are not found to be relevant. Fatty acid percentage remains quite
220 stable and it is not lipid oxidation dependant.

221 So, it is assumed that the treatments and conditions applied do not markedly
222 modify fatty acid profile. Surely, those changes would not impact considerably the
223 consumer nutritional balance, as they would become “diluted” in the global diet.
224 Hypothetically, it could be postulated that the different fatty acids were affected globally.

225

226 ***Ultraviolet Compounds***

227 It is a common practice in the food area to detect conjugated dienes by ultraviolet
228 analysis. Thus, hydroperoxides are quantified indirectly by measuring absorbance of
229 conjugated dienes at 230-235 nm, because those are intermediate compounds generated
230 in conversion of fatty acids to hydroperoxides. The fatty acid profile strongly influences that
231 analysis (Dobarganes and Velasco, 2002). No conclusive results were obtained. So,
232 probably the procedure followed is not useful to evaluate egg yolk lipid oxidation. The data
233 are not shown.

234

235 ***Hydroperoxydes***

236

237 Results from the hydroperoxide analysis, expressed in terms of absorbance divided
238 by the fat extract weight, are shown in Figure 2. The same scale in the y-axis is used for
239 samples at pH 6.2 and 5.0, but higher numbers are necessary to represent data from
240 samples at pH 3.0.

241 Only some samples at pH 3 developed significantly higher hidroperoxyde values: at
242 6 days untreated egg yolk; and at 9 days egg yolk pressurized at 500 MPa. These results

243 suggest the need of performing analyses in shorter time intervals, to quantify lipid oxidation
244 through primary oxidation compounds (i.e., hydroperoxides).

245

246 **TBARS**

247

248 The TBARS contents determined in the first part of the experiment showed the
249 effect of treatment and pH on egg yolk with 5% of sodium chloride at 1, 6 and 9 days of
250 refrigeration storage (Table 4). At day 1, 3PS displayed significant higher value than the
251 other samples except 3pS. At 6 days after the treatments, lipid oxidation was more marked
252 in samples at pH 3: 3PS showed again the significantly highest value, followed by 3pS and
253 3CS. After 9 days of storage, it was reaffirmed that samples adjusted at pH 3.0 were the
254 most oxidized. By then, stronger differences among samples within this group were
255 observed. The three treated samples were significantly different from samples at pH 5.0
256 and 6.2, with TBARS values of 3PS being the highest, followed by 3pS and 3CS.

257 Increases in lipid oxidation throughout storage were only significant in pressurized
258 samples at pH 3.0. So, under strong acidic conditions lipid alteration is enhanced,
259 especially in pressure-treated egg yolk.

260 These results are in agreement with the study of Botsoglou *et al.* (1997) where no
261 formation of TBARS was detected in untreated egg yolk at native pH and in samples
262 adjusted to pH 5, whereas more acidic samples (pH 4, 3 and 2) showed increased TBARS
263 level, especially those adjusted at pH 3. Low pH may cause phosvitin denaturation and
264 subsequent oxidation due to iron release, but phosvitin appears to exert its protective
265 action in a pH range from 2 to 7.

266 The objective of the second part of the experiment was to minimize lipid oxidation
267 of samples with the highest TBARS values in the first part. Analyses were carried out at 1,
268 3, 6 and 9 days after in samples at pH 3.0 with added antioxidants (EDTA or EW). As EW

269 increased the egg yolk pH from 3.0 to 4.0, some of those samples were readjusted at pH
270 3.0 with HCl.

271 The results displayed a high variability, but trends were very similar in the three
272 repetitions (Table 5). No significant differences were detected after 3 days, despite the fact
273 that there is evidence of increasing TBARS values in some samples.

274 At 6 days, TBARS had increased significantly in 3PO and 3PA if compared with day
275 3; and 3pO had a significantly higher value at day 6 than at day 1 of storage.

276 At 9 days, TBARS contents in 3PO and 3PA significantly increased again if
277 compared with day 6. In the case of 3pO, also had a significantly higher TBARS content at
278 day 9 than at day 3. It is clearly seen that the pH is a key factor to control lipid oxidation of
279 egg yolk.

280 At 1 and 3 days, no significant differences were found among samples. At 6 days,
281 3PO and 3PA showed the significantly highest TBARS values, whereas 3pO was
282 significantly more oxidized than most of the other samples (Table 5).

283 At 9 days, untreated samples had similar TBARS values, and the same occurred
284 with heated samples. So, antioxidant addition did not prevent lipid oxidation in those
285 samples. In samples pressurized at 500 MPa, sample with no antioxidant was significantly
286 the most oxidized. TBARS contents of 3PO and 3PA were the significantly highest at 9
287 days of storage.

288 The conclusion of this second part of the experiment is that the antioxidants only
289 minimize lipid oxidation in pressurized samples from 6 days of refrigeration storage.
290 TBARS values of untreated and heated egg yolk do not increase significantly throughout
291 the storage, and are not affected by EDTA or egg albumen. EDTA is an effective
292 antioxidant for pressurized samples, whereas EW antioxidant ability is lower than EDTA's
293 at pH 3.0, and it becomes pro-oxidant in samples treated at 900 MPa and stored for 6 and
294 9 days. TBARS generation in egg yolk at pH 3.0 can be interfered by adding chelating

295 molecules. The higher antioxidant effect of EW at pH 4.0 must be due to the lower acidic
296 conditions at which the samples were processed by pressure or heat.

297

298

ACKNOWLEDGMENTS

299

300 This work has been financially supported by the Spanish project ALI98-0508-C-02-
301 01 and grant 1999FI00771.

302

303

REFERENCES

304

305 Anton, M. 1998. Structure and functional properties of hen egg yolk constituents. Recent
306 Res. Develop. Agr. Food Chem. 2, 839-864.

307 Beltran, E., R. Pla, J. Yuste, and M. Mor-Mur. 2003. Lipid oxidation of pressurized and
308 cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and
309 hexanal values. Meat Sci. 64:19-25.

310 Beltran, E., J. Yuste, R. Pla, and M. Mor-Mur. 2000. Colour evaluation in cooked and
311 pressurized poultry products. In Proceedings of the XXI World's Poultry Congress.
312 Montreal, Canada.

313 Blight, E.G., and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification.
314 Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-917.

315 Botsoglou, N.A., A.L. Yannakopoulos, D.J. Fletouris, A.S. Tserveni-Goussi, and P.D.
316 Fortomaris. 1997. Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. J.
317 Agr. Food Chem. 45:3711-3716.

318 Cherian, G., F.W. Wolfe, and J.S. Sims. 1996. Feeding dietary oils with tocopherols: effect
319 on internal qualities of eggs during storage. J. Food Sci. 61:15-18.

320 Dobarganes, M.C., and J. Velasco. 2002. Analysis of lipid hydroperoxides. *Eur. J. Lipid*
321 *Sci. Technol.* 104:420-428.

322 Grau, A., F. Guardiola, J. Boatella, M.D. Baucells, and R. Codony. 2000. Evaluation of lipid
323 ultraviolet absorption as a parameter to measure lipid oxidation in dark chicken
324 meat. *J. Agr. Food Chem.* 48:4128-4135.

325 Hayashi, R. 1991. High pressure in food processing and preservation: principle, application
326 and development. *High Pressure Res.* 7:15-21.

327 Helrich, K. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. AOAC (Association of Official
328 Analytical Chemists), Arlington, VA.

329 Hu, F.B., M.J. Stampfer, E.B. Rimm, J.E. Manson, A. Ascherio, G.A. Colditz, B.A. Rosner,
330 D. Spiegelman, F.E. Speizer, F.M. Sacks, C.H. Hennekens, and W.C. Willett. 1999.
331 A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men
332 and women. *J. Amer. Med. Assoc.* 281:1387-1394.

333 Iametti, S., E. Donizelli, P. Pittia, P.P. Rovere, N. Squarcina, and F. Bonomi. 1999.
334 Characterization on high-pressure-treated egg albumen. *J. Agr. Food Chem.*
335 47:3611-3616.

336 Marshall, A.C., A.R. Sams, and M.E. Van Elswyk. 1994. Oxidative stability and sensory
337 quality of stored eggs from hens fed 1.5% Menhaden Oil. *J. Food Sci.* 59:561-563.

338 Morrison, W.R., and M.L. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and
339 dimethylacetats from lipids with boron trifluoride methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.

340 Pike, O.A., and I.C. Peng. 1985. Stability of shell egg and liquid yolk to lipid oxidation.
341 *Poultry Sci.* 64:1470-1475.

342 Pike, O.A., and I.C. Peng. 1988a. Effect of protein disruption by denaturation and
343 hydrolysis on egg yolk lipid oxidation. *J. Food Sci.* 53:428-431.

344 Pike, O.A., and I.C. Peng. 1988b. Influence of pH on egg yolk lipid oxidation. *J. Food Sci.*
345 53:1245-1246.

- 346 Ponce, E., R. Pla, M. Capellas, B. Guamis, and M. Mor-Mur. 1998a. Inactivation of
347 *Escherichia coli* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure. Food
348 Microbiol. 15:265-272.
- 349 Ponce, E., R. Pla, M. Mor-Mur, R. Gervilla, and B. Guamis. 1998b. Inactivation of *Listeria*
350 *innocua* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure. J Food
351 Protect. 61:119-122.
- 352 Ponce, E., R. Pla, E. Sendra, B. Guamis, and M. Mor-Mur. 1998c. Combined effect of nisin
353 and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia*
354 *coli* in liquid whole egg. Int. J. Food Microbiol. 43:15-19.
- 355 Ponce, E., R. Pla, E. Sendra, B. Guamis, and M. Mor-Mur. 1999. Destruction of
356 *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure:
357 comparative study in selective and non-selective media. Food Microbiol. 16:357-
358 365.
- 359 Ponce, E. 2000. Aplicación de alta presión hidrostática en ovoproductos. Ph.D.
360 dissertation. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
- 361 Ponce, E., E. Sendra, E. Beltran, J. Yuste, M. Mor-Mur, and R. Pla. 2002. Manufacture of
362 caramel cream type dessert by means of high hydrostatic pressure at temperatures
363 below 0°C. Alimentaria. 335:133-137.
- 364 Shantha, N.C., and E.A. Decker. 1994. Rapid, sensitive, iron based spectrophotometric
365 methods for determination of peroxide values of food lipids. J. AOAC Int. 77:421-
366 424.
- 367 Weller, M. 1979. Cited by Pike and Peng, (1988a).

FIGURE 1. Egg yolk processing diagram. Single and double lined arrows indicate the first and second parts of the experiment, respectively.

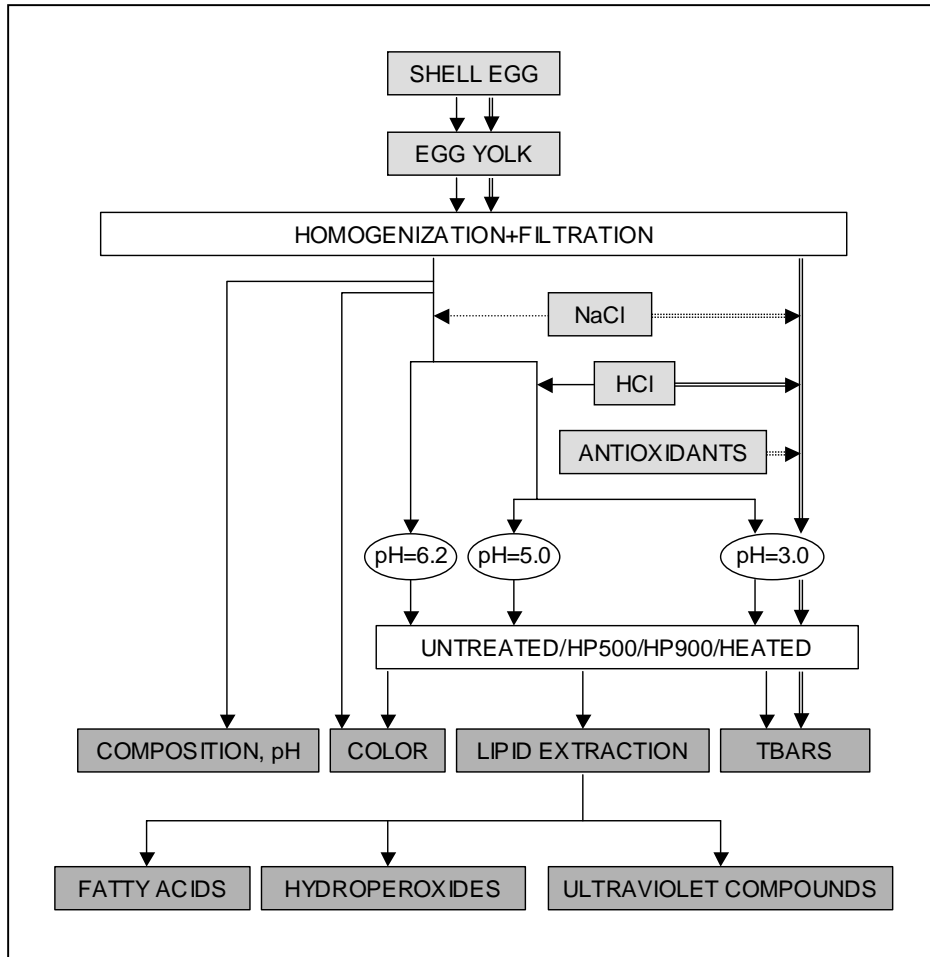
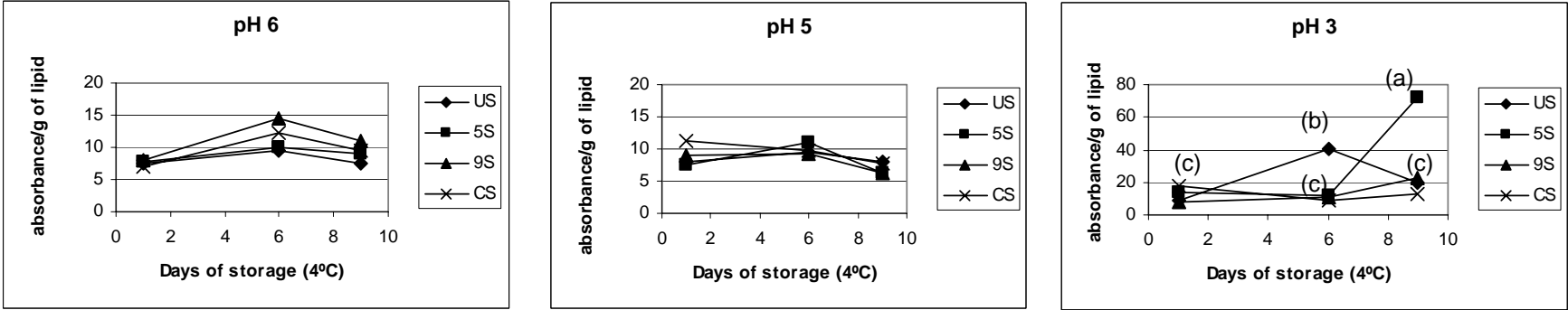


TABLE 1. Color parameters [*L* (lightness), *a* (redness), *b* (yellowness)] and total color difference (ΔE) of pressure- and heat-treated egg yolk at day 1

Sample	Color parameters			
	<i>L</i> value	<i>a</i> value	<i>b</i> value	ΔE
6UN	52.52 ^(e)	11.28 ^(a)	25.26 ^(a)	--
6US	46.45 ^(g)	10.16 ^(c)	22.26 ^(d)	6.85 ^(ef)
6pS	43.13 ^(hi)	8.63 ^(f)	20.83 ^(f)	10.70 ^(c)
6PS	43.72 ^(h)	10.90 ^(b)	21.29 ^(e)	9.65 ^(d)
6CS	53.32 ^(d)	10.81 ^(b)	23.34 ^(b)	2.12 ⁽ⁱ⁾
5US	40.22 ^(j)	6.26 ^(h)	17.54 ⁽ⁱ⁾	15.36 ^(b)
5pS	38.15 ^(k)	8.31 ^(g)	17.07 ^(j)	16.80 ^(a)
5PS	42.94 ⁽ⁱ⁾	10.82 ^(b)	20.09 ^(g)	10.89 ^(c)
5CS	57.95 ^(b)	9.31 ^(e)	21.19 ^(e)	7.06 ^(e)
3US	50.49 ^(f)	9.76 ^(d)	19.59 ^(h)	6.21 ^(fg)
3pS	57.22 ^(c)	10.15 ^(c)	22.29 ^(d)	5.68 ^(gh)
3PS	56.98 ^(c)	11.20 ^(a)	22.74 ^(c)	5.12 ^(h)
3CS	68.75 ^(a)	9.81 ^(d)	22.86 ^(c)	16.47 ^(a)

Abbreviations: (6##): pH 6.2. (5##): pH 5.0. (3##): pH 3.0. (#U#): untreated. (#p#): 500 MPa/ 15 min/ 20 °C. (#P#): 900 MPa/ 15 min/ 20 °C. (#C#): 15 min/ 80 °C. (##N) 0 % of sodium chloride. (##S) 5 % of sodium chloride. Values within the same column followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2. Hydroperoxide content (absorbance/g of extracted lipid) of untreated, pressurized and heated egg yolk adjusted at different pH values and containing 5 % of sodium chloride.



US: untreated. **5S:** 500 MPa/ 15 min/ 20 °C. **9S:** 900 MPa/ 15 min/ 20 °C. **CS:** 15 min/ 80 °C. Different letters (a-c) mean significant differences ($P < 0.05$).

TABLE 2. Major fatty acid profiles (%) of pressure- and heat-treated egg yolk processed at different pH, at 1 and 9 days after the treatments

	C16		C18		C18:1		C18:2	
	day 1	day 9	day 1	day 9	day 1	day 9	day 1	day 9
3US	23.85	23.82 ^a	9.06	8.96 ^a	36.96	36.74 ^{ab}	24.50	24.70 ^{ab}
3CS	23.40 ^x	18.80 ^{y,b}	8.69 ^x	5.70 ^{y,b}	37.37	41.51 ^a	24.93	27.63 ^{ab}
3pS	23.52	22.85 ^a	8.72	8.71 ^a	37.56	38.85 ^{ab}	23.95	23.70 ^b
3PS	23.61	23.62 ^a	8.79	8.57 ^a	36.40	35.94 ^b	25.25	26.00 ^{ab}
5US	23.98	23.34 ^a	8.80	8.35 ^a	36.21	36.59 ^{ab}	25.29	25.79 ^{ab}
5CS	21.64	21.07 ^a	7.13	6.87 ^a	38.80	38.79 ^{ab}	26.87	27.18 ^{ab}
5pS	23.77	24.08 ^a	8.84	8.79 ^a	35.50	36.70 ^{a,b}	26.07	24.58 ^{ab}
5PS	24.18	22.86 ^a	8.91	8.04 ^a	36.50	37.78 ^{ab}	25.31	25.26 ^{ab}
6US	23.72	22.84 ^a	8.78	8.40 ^a	36.95	37.42 ^{ab}	24.93	25.36 ^{ab}
6CS	23.14 ^x	18.27 ^{y,b}	8.51 ^x	5.90 ^{y,b}	37.35	41.48 ^a	25.11	27.98 ^a
6pS	24.09	23.84 ^a	8.96	8.82 ^a	36.01	36.56 ^{ab}	26.13	26.96 ^{ab}
6PS	23.86	23.37 ^a	8.95	8.73 ^a	36.86	36.98 ^{ab}	24.94	24.99 ^{ab}

Abbreviations: (6##): pH 6.2. (5##): pH 5.0. (3##): pH 3.0. (#U#): untreated. (#p#): 500 MPa/ 15 min/ 20 °C. (#P#): 900 MPa/ 15 min/ 20 °C. (#C#): 15 min/ 80 °C. (##S) 5 % of sodium chloride. For each fatty acid, values within the same column (a,c) and values within the same row (x-y) followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

TABLE 3. Minor fatty acid profiles (%) of pressure- and heat-treated egg yolk processed at different pH, at 1 and 9 days after the treatments

	C14		C16:1		C18:3		C20:4		C22:6	
	day 1	day 9	day 1	day 9	day 1	day 9	day 1	day 9	day 1	day 9
3US	0.28	0.29	1.00	1.03	1.27	1.32 ^{bc}	1.89	1.93	1.17 ^a	1.21
3CS	0.28	0.30	1.00 ^y	1.13 ^x	1.28 ^y	1.44 ^{x,ab}	1.88	2.14	1.18 ^a	1.36
3pS	0.28	0.31	1.00	1.04	1.29	1.32 ^{bc}	1.87	1.95	1.20 ^a	1.28
3PS	0.29	0.29	1.05	1.09	1.33	1.31 ^{bc}	1.96	1.92	1.33 ^a	1.26
5US	0.28	0.29	0.99	1.07	1.29	1.35 ^{bc}	1.94	1.97	1.22 ^a	1.24
5CS	0.30	0.29	1.09	1.10	1.36 ^y	1.40 ^{x,abc}	1.79	2.01	1.02 ^{ab}	1.29
5pS	0.28	0.29	1.01	1.03	1.33	1.30 ^c	1.96	1.94	1.25 ^a	1.29
5PS	0.29	0.31	1.04	1.12	1.24	1.35 ^{bc}	1.63	1.97	0.91 ^{ab}	1.31
6US	0.32	0.30	1.00	1.06	1.29	1.35 ^{bc}	1.87	2.01	1.13 ^a	1.25
6CS	0.29	0.31	1.03	1.13	1.34 ^y	1.48 ^{x,a}	1.94	2.11	1.28 ^a	1.34
6pS	0.28	0.28	1.04	1.07	1.26	1.32 ^{bc}	1.57	1.93	0.66 ^b	1.25
6PS	0.29	0.29	0.99	1.06	1.30	1.33 ^{bc}	1.77	1.95	1.04 ^{ab}	1.30

Abbreviations: (6##): pH 6.2. (5##): pH 5.0. (3##): pH 3.0. (#U#): untreated. (#p#): 500 MPa/ 15 min/ 20 °C. (#P#): 900 MPa/ 15 min/ 20 °C. (#C#): 15 min/ 80 °C. (##S) 5 % of sodium chloride. For each fatty acid, values within the same column (a,c) and values within the same row (x-y) followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

TABLE 4. TBARS (ppm× 10⁻³) content of untreated, pressurized and cooked egg yolk adjusted at different pH values and containing 5 % of sodium chloride

	Days at 4 °C		
	1	6	9
6US	36.96 ^b	31.29 ^c	30.76 ^e
6CS	62.83 ^b	50.99 ^c	49.79 ^{de}
6pS	37.38 ^b	35.28 ^c	32.31 ^e
6PS	96.94 ^b	93.48 ^c	97.69 ^{de}
5US	28.50 ^b	39.09 ^c	53.19 ^{de}
5CS	44.08 ^b	67.26 ^c	101.34 ^{de}
5pS	32.77 ^b	41.06 ^c	78.88 ^{de}
5PS	43.69 ^b	62.30 ^c	92.08 ^{de}
3US	49.06 ^b	106.74 ^c	207.45 ^{cd}
3CS	183.15 ^b	256.81 ^b	273.56 ^c
3pS	147.79 ^{ab,x}	263.45 ^{b,x}	511.53 ^{b,y}
3PS	265.13 ^{a,x}	971.05 ^{a,y}	1,936.99 ^{a,z}

Abbreviations: (**6##**): pH 6.2. (**5##**): pH 5.0. (**3##**): pH 3.0. (**#U#**): untreated. (**#p#**): 500 MPa/ 15 min/ 20 °C. (**#P#**): 900 MPa/ 15 min/ 20 °C. (**#C#**): 15 min/ 80 °C. (**##S**) 5 % of sodium chloride. Values within the same row (x-z) or column (a-e) followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

TABLE 5. TBARS (ppm× 10⁻³) content of untreated, pressurized and cooked egg yolk adjusted at different pH values and containing 5 % of sodium chloride

	Days at 4 °C			
	1	3	6	9
3UE	55.05	63.05	157.84 ^d	654.46 ^{de}
4UA	22.67	38.68	48.82 ^d	57.43 ^e
3UO	63.42	113.25	329.04 ^{cd}	760.26 ^{cde}
3UA	80.47	146.36	585.80 ^{cd}	767.17 ^{cde}
3CE	79.82	93.59	152.19 ^d	514.35 ^{de}
4CA	48.71	51.32	61.40 ^d	72.87 ^e
3CO	63.96	91.86	131.03 ^d	154.33 ^e
3CA	60.25	99.57	126.36 ^d	170.08 ^e
3pE	74.41	83.24	153.50 ^d	554.55 ^{de}
4pA	39.86	28.03	43.96 ^d	48.92 ^e
3pO	211.18 ^z	370.87 ^{y,z}	966.52 ^{bc,xy}	1,437.93 ^{c,x}
3pA	85.58	179.98	345.23 ^{cd}	720.47 ^{de}
3PE	163.65	194.61	390.54 ^{cd}	856.18 ^{cd}
4PA	58.20	51.88	63.32 ^d	68.06 ^e
3PO	259.16 ^z	761.97 ^z	1,640.04 ^{a,y}	2,587.86 ^{b,x}
3PA	169.19 ^z	636.84 ^z	1,845.80 ^{a,y}	3,439.27 ^{a,x}

Abbreviations: (3##): pH 3.0. (4##): pH 4.0. (#U#): untreated. (#C#): 15 min/80 °C. (p##): 500 MPa/15 min/20 °C. (P##): 900 MPa/15 min/20 °C. (##E): 100 ppm EDTA. (##A): 10% egg white powder. (##O): no antioxidant. Values within the same row (x-z) or column (a-e) followed by a common letter are not significantly different ($P < 0.05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos llevados a cabo se han centrado en el estudio de los efectos de las altas presiones sobre productos avícolas, si bien se dividen en dos grupos según la materia prima empleada:

- Carne de pollo.- El primer experimento se realizó con carne de muslo, mientras que los dos siguientes se efectuaron con carne de pechuga por ser sus piezas musculares más fáciles de aislar del tejido conjuntivo y estar constituidas por lípidos más susceptibles a la oxidación.
- Yema de huevo.- En el último experimento, se estudiaron los efectos de las altas presiones sobre esta materia prima.

Los resultados obtenidos en los cuatro experimentos se reparten en dos apartados que deben discutirse de forma independiente: color y oxidación lipídica.

4.1. COLOR

Las altas presiones no modifican el color de las frutas y las verduras (Indrawati y col., 2003). Sin embargo, esta tecnología produce importantes cambios del color de la carne, que adquiere un aspecto muy diferente del del producto sin tratar (Cheftel y Culioli, 1997).

De los trabajos publicados sobre este tema es especialmente interesante el de Carlez, Veciana-Nogués y Cheftel (1995), en el que incrementa la claridad de la carne de ternera y disminuye el grado de rojo, lo que confiere el color rosa-gris característico de las

piezas cocidas. Los autores ofrecen una posible explicación a este fenómeno: la desnaturalización de la globina y la liberación o desplazamiento del grupo hemo se apuntan como causas del aumento de la claridad de la carne sometida a 200-350 MPa, mientras que la oxidación de la mioglobina a metamioglobina ocurre sólo por encima de 400 MPa. En contraposición, Goutefongea, Rampon, Nicolas y Dumont (1995) detectaron un incremento del grado de rojo en carnes de cerdo y ternera tratadas por alta presión, pero coinciden con Carlez y col. (1995) en afirmar que la carne presurizada presenta mayor claridad, y esto se atribuye a la coagulación de las proteínas plasmáticas provocada por la disminución de su solubilidad. Asimismo, se ha determinado que la mayor resistencia de los productos curados al cambio de color rojo inducido por la alta presión se debe a que la nitrosomioglobina está protegida por el óxido nítrico frente a la oxidación de la forma ferrosa (Carlez y col., 1995; Goutefongea y col., 1995; Bruun-Jensen y Skibsted, 1996).

a) Efecto de la temperatura del tratamiento por alta presión sobre el color del muslo de pollo

Los resultados del primer experimento muestran que la claridad del muslo de pollo aumenta al ser procesado por calor, pero no tanto como cuando es tratado por alta presión. Además, el incremento de la claridad es más importante cuando las presiones se aplican a alta temperatura: el valor L de la muestra control de temperatura (50°C) es significativamente más alto que el de la muestra no tratada, pero inferior al de las muestras tratadas por presión. En cuanto al grado de rojo (a), la carne de pollo presurizada presenta una disminución que también se hace más patente al aumentar la temperatura de tratamiento, de manera que las muestras presurizadas a 50°C alcanzan valores mínimos y llegan a no diferenciarse de las muestras cocidas. Estos resultados coinciden con los observados en un experimento anterior con carne de pollo (Beltran, Yuste, Pla y Mor-Mur, 2000), con las tendencias observadas por Carlez y col. (1995) en carne de ternera y, en términos de claridad, con los publicados por Goutefongea y col. (1995). Cabe destacar que la variación en claridad es mucho más amplia que la de rojo en valores absolutos aunque porcentualmente pueda ocurrir lo contrario.

Los mecanismos mediante los cuales las altas presiones ocasionan cambios de color en carne se deben estudiar más a fondo. La disociación parcial de pares iónicos causada por la presión induce el descenso del pH, la rotura de interacciones electroestáticas, y una probable desnaturalización de las globinas o cierto desplazamiento

del grupo hemo. El descenso de pH, a su vez, podría facilitar la oxidación del grupo hemo a estado férrico. Por otro lado, se desconoce el efecto de la presión sobre las enzimas oxidantes de la mioglobina y reductoras de la metamioglobina. Finalmente, hay que considerar que ciertas moléculas resultantes de la oxidación de los lípidos pueden catalizar la oxidación del grupo hemo (Cheftel y Culioli, 1997).

b) Efecto de la presión sobre el color de la yema de huevo. Influencia del pH y la fuerza iónica

Los datos obtenidos en el cuarto experimento no concuerdan con las tendencias observadas en la yema de huevo en un trabajo anterior (Beltran y col., 2000), en el que los cambios causados por la alta presión, respecto al control, fueron mínimos en claridad y grado de rojo y amarillo, mientras que la yema cocida se diferenciaba claramente del resto debido a la bajo grado de amarillo. Los descensos de intensidad de rojo y amarillo se atribuyen a la degradación de los carotenoides, por lo que los resultados de este trabajo indicaron que la presión no destruye a estas moléculas y el tratamiento por calor sí lo hace.

En este experimento, la simple adición de cloruro sódico modifica el color de la yema sin tratar y, lo que es más importante, la susceptibilidad de las muestras a modificar su color al ser procesadas posteriormente. Al añadir cloruro sódico, se incorpora un número considerable de cargas eléctricas, que alteran los enlaces débiles de las proteínas y pueden llegar a causar su desnaturalización. Cuando cambia la conformación espacial de las proteínas, se modifica el índice de refracción de la luz y, por lo tanto, el color.

Se detectó que el descenso de pH también afecta el color de la yema de huevo: a pH 5 los valores “L”, “a” y “b” se reducen, aunque una mayor acidificación (pH 3) los aumenta de manera que los cambios revierten y el color de la yema se vuelve a parecer al original (pH 6). Si se agrupan las muestras según el pH, se observa que aunque la diferencia total de color respecto a la yema sin sal es superior en las muestras presurizadas que en las cocidas; al comparar las muestras de un mismo pH, las cocidas se alejan más que las presurizadas de las respectivas muestras sin tratar. Esto indica que, en todos los casos, el tratamiento por calor provoca mayores cambios en la yema que las altas presiones.

4.2. OXIDACIÓN LIPÍDICA

4.2.1. CARNE DE POLLO

El objetivo principal de esta tesis consiste en describir los efectos generales de la alta presión sobre la fracción lipídica de la carne de pollo, para adquirir nuevos conocimientos y establecer futuras líneas de investigación. Al iniciar este trabajo, la bibliografía disponible sobre este tema (Tanaka y col., 1991; Wada, 1992; Ohshima y col., 1993; Carlez y col., 1995; Cheah y Ledward, 1995, 1996, 1997; Cheftel y Culioli, 1997; Dissing y col., 1997; Severini y col., 1997; Angsupanich y Ledward, 1998) trataba sobre otras materias primas -pescado, carne de cerdo y pavo, aceites, etc.- y se postulaba una clara acción prooxidante del tratamiento por alta presión. Se afirmaba que los tratamientos superiores a 300 MPa potenciaban la oxidación de los lípidos de los sistemas musculares (Cheftel y Culioli, 1997). Como se verá a continuación, muchos factores influyen sobre la estabilidad lipídica de la carne de pollo tratada por alta presión, pero no se puede atribuir a dicho tratamiento, de manera general, mayor capacidad oxidante que al tratamiento convencional por calor.

La cantidad de compuestos de oxidación en los alimentos cocidos varía según los precursores de aquéllos presentes en la materia prima, y la forma y el tamaño de corte de las piezas. Las porciones pequeñas tienen menores cantidades de compuestos de oxidación y pérdidas por cocción porque se han tratado por calor durante menos tiempo (Pikul y Kummerow, 1990). En cambio, el tratamiento por presión es homogéneo en todo el alimento y se transmite de manera casi instantánea por lo que, al no existir un gradiente de presión, no debe esperarse que los compuestos de oxidación generados varíen según la forma y el tamaño de la muestra.

a) Efectos de la intensidad de presión y de la presencia de oxígeno durante el almacenamiento

En un primer ensayo, al tratar mediante alta presión (500 MPa/50°C/30 min) muestras de carne cruda y sobrecocida (100°C/60 min) de muslo de pollo y ser almacenadas a 4°C en contacto con el aire, se detectó cierta acción prooxidante ya el primer día en el caso de la muestra sobrecocida y el sexto en el caso de la cruda. Este efecto es totalmente atribuible a la presión ya que los controles de temperatura (muestras tratadas a la misma temperatura y durante el mismo tiempo pero a presión atmosférica)

no incrementaron su contenido en sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) respecto a las muestras control ni tampoco durante su almacenamiento. Estos primeros resultados coinciden con los observados en pescado (Tanaka y col., 1991; Wada, 1992; Ohshima y col., 1993; Angsupanich y Ledward, 1998), cerdo (Cheah y Ledward, 1995,1996,1997) e incluso pavo (Dissing y col., 1997).

En los trabajos posteriores, se investigaron de forma paralela los efectos del tratamiento convencional por calor y el de presión, ya que la cantidad de TBARS de las muestras sobrecocidas fue 10 veces superiores a la de las muestras crudas, lo que indica una gran capacidad oxidativa de las altas temperaturas. Ya se había establecido que los enlaces débiles que mantienen las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas de la carne se modifican de manera distinta por el calor o la presión: el tratamiento térmico convencional afecta principalmente a los puentes de hidrógeno, mientras que la presión no altera estos enlaces y sí las interacciones hidrofóbicas y electroestáticas (Angsupanich y Ledward, 1998).

Al imitar las condiciones habituales de almacenamiento de un producto cárnico (refrigeración a 4°C, oscuridad y vacío), se obtuvieron valores de TBARS inferiores a los del primer ensayo en todos los casos y no se detectó que los tratamientos por presión (500 MPa) provocaran oxidación lipídica, independientemente de la temperatura de tratamiento y del tiempo de conservación de las muestras (ver trabajo 1), hecho previsible ya que el almacenamiento fue al vacío. Sin embargo, la carne de muslo de pollo cocida (90°C/15 min) mostró valores de TBARS 20-35 veces superiores a los del resto de muestras. Así, se concluye que el tratamiento convencional por calor es mucho más agresivo que el de alta presión a 500 MPa en carne de pollo conservada en refrigeración al vacío, y se cuestiona la capacidad prooxidante de la alta presión, observada en la primera parte del experimento y descrita por otros autores ya citados.

Al obtener estos resultados, se plantearon nuevas hipótesis de trabajo consistentes en determinar las diferencias en los mecanismos de iniciación de la oxidación de los dos procesos evaluados. Se pasó a trabajar con carne de pechuga de pollo porque sus masas musculares se separan con facilidad del resto de tejidos. Aunque los valores de TBARS son más altos en el muslo de pollo, por contener más lípidos que la pechuga, la fracción lipídica de ésta contiene el doble de malondialdehído ya que es mucho más rica en fosfolípidos (Pikul y Kummerow, 1990).

Del segundo experimento se concluye que son necesarios tratamientos por presión muy extremos para inducir la oxidación lipídica en la carne de pollo. En este caso, las muestras de pechuga se almacenaron en refrigeración y oscuridad tras los tratamientos, pero en contacto con el aire para provocar mayor oxidación que la detectada en los muslos de pollo envasados al vacío del primer experimento. Los lípidos de la pechuga presurizada (300 y 500 MPa/20°C/30 min) no se oxidaron tras 9 días en contacto con el aire, mientras que la oxidación fue intensa en los de la carne cocida (90°C/15 min).

Estos resultados corroboran los obtenidos por Orlien y col. (2000), que indican que 500 MPa es el valor crítico de presión a partir del cual los lípidos de la pechuga de pollo se oxidan significativamente respecto a los de las muestras no tratadas, e incluso proponen un modelo predictivo de la progresión de la oxidación lipídica según la presión aplicada. También afirman que la intensidad de presión es un factor de más peso que el tiempo de tratamiento en la generación de TBARS. Los resultados del segundo experimento del presente trabajo indican que los lípidos pueden resistir la oxidación en condiciones más adversas que las aplicadas por Orlien y col. (2000), ya que en su trabajo las muestras estaban almacenadas al vacío, y hay estudios que determinan que la estabilidad oxidativa de la carne de pechuga de pollo envasada al vacío es mayor que la de las muestras en contacto con la atmósfera, en el caso de muestras crudas y tratadas por calor (Conchillo, Ansorena y Astiasarán, 2003).

b) Parámetros estimadores de la oxidación: TBARS vs. hexanal

Igene y Pearson (1979) detectaron una correlación positiva entre los valores de TBARS y los parámetros sensoriales en carnes de ternera y pollo. Estudios posteriores (St. Angelo, 1996; Ajuyah, Fenton, Hardin y Sim, 1993b) han seguido encontrando buenas correlaciones entre los datos obtenidos por análisis químico (TBARS) e instrumental (hexanal y compuestos volátiles totales) y los atributos de flavor. En productos avícolas cocidos se han propuesto como marcadores el hexanal, el pentanal y la 2,3-octanodiona, junto con otros compuestos volátiles menos importantes. Los tres marcadores son productos secundarios de la oxidación del ácido linoleico (St. Angelo, 1996). El hexanal es el compuesto volátil mayoritario aislado de los músculos blanco y rojo de pollo, y su concentración se incrementa durante el almacenaje aunque llega un momento en el que los valores decrecen (Ajuyah y col., 1993b). La degradación de las proteínas de la carne también se ha relacionado con la desaparición del flavor deseable, hecho que también contribuye al deterioro del flavor de la carne. En los productos cárnicos curados el flavor

no se deteriora porque los nitritos impiden la formación de compuestos carbonílicos (Shahidi y Pegg, 1994).

Estos antecedentes suscitaron la realización de análisis paralelos de TBARS y de hexanal en las muestras de pollo para determinar si los compuestos de oxidación generados por el tratamiento por alta presión son similares a los provocados por la cocción, y si la correlación entre las cantidades de ambos compuestos existe y se mantiene en el tiempo. Los resultados del segundo experimento concluyen que TBARS y hexanal son parámetros válidos para determinar la oxidación lipídica en carne de pechuga de pollo tratada por presión o calor, y que existe una correlación entre los dos métodos analíticos.

c) Efectos de la acción mecánica previa y posterior a los tratamientos

Diversos autores apuntan la posibilidad de que el mecanismo de oxidación lipídica inducido por la alta presión se relacione con la estabilidad de las estructuras celulares (Cheftel y Culioli, 1997; Kato y Hayashi, 1999; Orlie y col., 2000). El sarcoplasma de las células musculares de pavo contiene compuestos reductores, con acción antioxidante que se modifica al afectarse el medio en que se encuentran (Kanner y col., 1991).

La aplicación, antes y después de los tratamientos, de una intensa acción mecánica a mezclas de carne picada de pechuga de pollo y agua (1:3, p/p) demostró la importancia de preservar la integridad de la estructura celular para mantener la estabilidad lipídica, y permitió evaluar la susceptibilidad a la oxidación de los tejidos dañados en diferentes momentos del proceso.

Se analizaron TBARS y hexanal de los homogeneizados obtenidos, y se observaron patrones similares en todos los casos, por lo que los dos parámetros se consideran válidos para estimar la oxidación lipídica en carne de pollo, tal y como se había señalado en estudios previos (Ajuyah y col., 1993b; Shahidi y Pegg, 1994; Nielsen y col., 1997; Brunton y col., 2000). Shahidi y Pegg (1994) indican que durante las fases iniciales del almacenamiento el hexanal es mejor indicador del estado oxidativo que las TBARS.

La aplicación de una acción mecánica intensa antes o después de los tratamientos desestructura el sistema celular de la carne, de manera que las muestras deberían presentar una susceptibilidad muy diferente a la oxidación. La acción mecánica practicada

tras los tratamientos no causó ningún efecto sobre los lípidos de las muestras presurizadas ni sobre los de los controles, pero sí potenció la oxidación lipídica de las muestras cocidas. Sin embargo, al aplicar la acción mecánica antes de los tratamientos, las muestras tratadas a 500 MPa presentaron una oxidación lipídica comparable a la de las muestras cocidas y significativamente superior a las presurizadas a 300 MPa y los controles. La capacidad prooxidante de las acciones mecánicas aplicadas antes de los tratamientos es mucho mayor en muestras tratadas a 500 MPa que en muestras cocidas. Se establece así que la integridad de las estructuras celulares es un factor clave para prevenir la oxidación lipídica causada por la alta presión, y que la magnitud de la presión aplicada se correlaciona positivamente con la producción de compuestos secundarios de oxidación.

Al cuantificar hexanal en el último experimento, se observó de nuevo el mismo patrón de diferenciación del grado de oxidación lipídica en los homogeneizados obtenidos previamente a los tratamientos: los controles permanecieron en niveles basales, las muestras tratadas a 300 MPa se mostraron en un nivel intermedio no siempre significativamente inferior al de las muestras cocidas, y las muestras tratadas a 500 y 900 MPa tuvieron los valores significativamente más altos. El hecho de que las muestras tratadas a 900 MPa mostraran cantidades de hexanal no significativamente superiores a las de las tratadas a 500 MPa puede indicar que el incremento lineal de la respuesta oxidativa sólo es válido hasta cierta magnitud de presión. Esto puede deberse a que la presión tiene un valor umbral de capacidad prooxidante, o que el sustrato presurizado alcanza la máxima degradación lipídica posible.

d) Acción de los prooxidantes

El cloruro sódico es un reconocido prooxidante de uso extendido en la industria cárnica y avícola debido a su acción positiva sobre los procesos tecnológicos y los productos elaborados. Su adición a la carne en un 5% (p/p) incrementó significativamente los valores de TBARS de las muestras tratadas a 500 MPa respecto a los controles, pero las muestras cocidas fueron de nuevo las más oxidadas. El efecto prooxidante del cloruro sódico es proporcionalmente más importante en las muestras presurizadas que en las cocidas, hecho que puede relacionarse con la alteración de los enlaces débiles que produce el aumento de carga iónica provocado por la sal. Estos enlaces débiles ya alterados pueden ser atacados más fácilmente por la alta presión y liberarse, así, una mayor cantidad de hierro de las macromoléculas. Sin embargo, aunque se ha observado

que la cocción provoca cierta liberación de hierro del grupo hemo (Halliwell y Gutteridge, 1984), en el estudio de Orlie y col. (2000) no se detectó liberación de hierro al tratar por presión la pechuga de pollo. La acción prooxidante del cloruro sódico también puede deberse a una mayor exposición de los lípidos de membrana causada por la alteración de ésta por la presión, o a la inactivación de enzimas antioxidantes que el tratamiento de presión por sí mismo no provocaría.

El cloruro sódico también fue prooxidante en las mezclas de carne de pollo y agua, efecto que coincidiendo con lo observado en la carne picada, fue proporcionalmente mucho más marcado en muestras tratadas por presión que en cocidas. De hecho, los valores de hexanal de los homogeneizados cocidos fueron similares en presencia y ausencia de cloruro sódico. El mayor grado de oxidación, evaluado mediante determinación de TBARS y hexanal, se detectó en muestras con cloruro sódico que fueron sometidas a la acción mecánica previamente a los tratamientos. En estas condiciones, los valores de TBARS y hexanal fueron altos y similares para muestras tratadas a 500 MPa y cocidas, intermedios para las tratadas a 300 MPa y mínimos para los controles. Con estos datos, se confirma que, en condiciones desfavorables (desestructuración celular y presencia de sal) el tratamiento por alta presión potencia la oxidación lipídica de manera dependiente de la intensidad aplicada.

e) Acción de los antioxidantes

En el último experimento realizado con carne de pollo, se evaluó el efecto antioxidante de diversos compuestos sobre las muestras cuyos lípidos habían resultado más susceptibles a la oxidación (acción mecánica previa al tratamiento y adición de cloruro sódico), para establecer pautas de control del proceso oxidativo.

La dosis de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) usada en este trabajo (400 ppm) fue suficiente para inhibir significativamente la oxidación lipídica de las muestras tratadas a presiones inferiores a 500 MPa y prolongar la fase de inducción de la reacción, pero no fue eficaz en las muestras cocidas. La incapacidad para actuar en homogeneizados tratados por calor puede deberse a una mayor presencia de radicales libres o a una extrema alteración de la estructura del músculo causada por la cocción. Será interesante probar este antioxidante a dosis superiores, ya que existen trabajos en los que se ha documentado un efecto antioxidante de este producto sobre carne cocida (Murphy, Kerry, Buckley y Gray, 1998).

El extracto de acerola (*Malpighia punicifolia*) se incluyó en el experimento por tratarse de una sustancia muy rica en ácido ascórbico y ser éste un antioxidante de uso muy extendido en la industria alimentaria. Su efecto más importante es la inhibición de la formación de metamioglobina, mientras que su acción sobre la estabilidad lipídica de la carne es mínima o inexistente (Morrisey y col., 1998; Sánchez-Escalante, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncalés, 2001). Los resultados del presente trabajo coinciden con esta última afirmación, ya que no se observaron diferencias significativas respecto a las muestras sin antioxidantes.

Diversos autores (St. Angelo, 1996) han descrito que la producción de *warmed over flavours* (WOF) se relaciona directamente con la presencia de iones metálicos, por lo que con el uso de un quelante potente se podría valorar la importancia de estas moléculas en el proceso de desestabilización lipídica.

El ácido etilendiaminotetracético (EDTA) es un quelante de metales que, en el presente experimento, resultó ser extremadamente eficaz para controlar la oxidación lipídica de las muestras tratadas por calor y presión. Así, se demostró el importante papel prooxidante que desempeñan los iones metálicos libres sobretodo cuando se ha producido una profunda desestructuración celular.

La última parte del experimento reconfirmó el papel de los iones metálicos en la oxidación lipídica, pues demostró la eficacia de los fosfatos y el albumen de huevo en el control del proceso oxidativo. Los fosfatos y determinados componentes del albumen tienen cierta capacidad quelante de los iones metálicos. El tripolifosfato sódico inhibe la producción de carbonilos debido a su capacidad quelante, y es capaz de neutralizar el efecto prooxidante del cloruro sódico (Shahidi y Pegg, 1994). Los fosfatos son aditivos de frecuente aplicación en la industria cárnica debido a su capacidad antioxidante, a que aumentan el pH y la fuerza iónica, y mejoran el rendimiento de los productos cárnicos cocidos (Cheng y Ockerman, 2003). Por otro lado, se ha observado que el uso de una capa de solución acuosa de albumen de huevo en carne de pechuga de pollo cruda y cocida controla eficazmente la oxidación lipídica (Armitage, Hettiarachchy y Monsoor, 2002). La aplicación de 5.000 ppm de fosfatos hizo indiferenciable el homogeneizado tratado a 300 MPa del control, inhibió significativamente la oxidación lipídica en muestras tratadas a 500 MPa y cocidas, pero no pudo controlar la lipoxidación en muestras tratadas a 900 MPa. El albumen fue más eficaz en muestras presurizadas que en cocidas, pero al ser aplicado a un 10% (p/p) el grado de oxidación de las diferentes muestras fue

equivalente. Los resultados indican una acción antioxidante proporcional a la dosis de fosfatos y de albumen de huevo, pese a que el albumen actúa de manera más robusta. Aunque la alteración lipídica de las muestras sin antioxidantes sometidas a 900 MPa fue semejante a la provocada a 500 MPa, la menor acción del fosfato sobre las muestras tratadas a 900 MPa permite concluir que el mayor daño sufrido por las muestras sometidas a dicha presión hace que éstas sean más difícilmente controlables.

En algunos casos, el contenido en hexanal detectado tras 9 días de almacenamiento fue inferior al registrado tras 6 días. Esta disminución puede deberse a la ruptura de aldehídos en cadenas más cortas, o a la reacción de los carbonilos con proteínas mediante un proceso independiente del oxígeno. También podría haberse iniciado la fase de terminación de la reacción de oxidación. La misma tendencia fue observada por Shahidi y Pegg (1994), quienes al comprobar que los valores de hexanal, tras alcanzar valores máximos el sexto día, disminuían, indican que el aldehído se oxida y los compuestos resultantes se ligan a diversos componentes de la carne.

4.2.2. YEMA DE HUEVO

a) Compuestos primarios de oxidación

No se obtuvieron resultados concluyentes con los análisis de compuestos ultravioletas e hidroperóxidos. El tipo de muestra analizada condiciona el resultado de estos análisis (Dobarganes y Velasco, 2002), lo que hace pensar que los métodos aplicados no son adecuados para cuantificar estos componentes en la yema. Se debería adaptar las técnicas a la estructura del producto, y sería recomendable analizar muestras en fases muy iniciales del almacenamiento para recabar información esencial sobre los compuestos primarios de oxidación.

b) Perfil lipídico

El perfil lipídico obtenido de la yema coincide, en términos generales, con el descrito por otros autores (Anton, 1998). Se observaron cuatro ácidos grasos mayoritarios que, en orden porcentual decreciente, son: C18:1, C18:2, C16 y C18; y cinco minoritarios que, en orden decreciente, son: C20:4, C18:3, C22:6, C16:1, C14. Del total de ácidos grasos determinado, el conjunto de los monoinsaturados se acerca a un 40%, el de

saturados es algo superior a un 30% mientras que el de poliinsaturados es inferior a un 30%.

No se detectaron cambios importantes en el perfil de ácidos grasos de la yema tras 1 y 9 días de almacenamiento en refrigeración, en la oscuridad y en contacto con la atmósfera, después de ser tratadas por presión o calor. Aunque en las Tablas 2 y 3 del cuarto experimento se presentan algunas diferencias significativas en el porcentaje de diversos ácidos grasos, este hecho no tiene la relevancia suficiente para impactar en la dieta del consumidor y la estabilidad lipídica de las muestras. La robustez de los resultados indica que la fracción lipídica del huevo está muy protegida frente a posibles cambios degenerativos, aunque existe la posibilidad de que los ácidos grasos se afectaran de manera general y esto no se reflejara en el análisis. Igene y Pearson (1979) observaron que la cocción no altera demasiado el perfil lipídico de los triglicéridos de la carne de pollo pero sí implica cierta desaparición de fosfolípidos que puede atribuirse a autooxidación, descomposición hidrolítica, pardeamiento de lípidos o copolimerización con proteínas. Será muy interesante la cuantificación de los fosfolípidos de la yema de huevo tratada por calor o presión.

c) TBARS

Los valores de TBARS obtenidos en la primera parte del cuarto experimento indican que el pH es el factor que más influye en la estabilidad lipídica de la yema. Botsoglou, Yannakopoulos, Fletouris, Tserveni-Goussi y Fortomaris (1997) describieron un aumento de los valores de TBARS de la yema de huevo a pH inferior a 5, que puede atribuirse a la desnaturalización de la fosvitina y la consecuente liberación de hierro, aunque esta proteína también manifestó cierta acción protectora frente a la oxidación a pH entre 2 y 7 por lo que su actuación es controvertida.

El primer día tras los tratamientos, la muestra a pH 3 tratada a 900 MPa fue la única que se diferenció del resto, aunque se observaron tendencias al alza en las otras muestras a pH 3 tratadas por presión o calor. Estas diferencias aumentaron durante el almacenamiento. Las muestras a pH 3 tratadas por presión fueron las únicas con incrementos significativos de los valores de TBARS en el tiempo. La muestra a pH 3 cocida presentó una estabilidad lipídica comparable a la de la tratada a 500 MPa, del mismo pH, hasta el sexto día de almacenamiento en refrigeración. No está claro si se da una acción prooxidante del cloruro sódico en las muestras a pH 3 tratadas, pero es seguro

que ésta no se produce a un pH superior. Habrá que determinar si el flavor de las muestras a pH 3 tratadas por alta presión es diferente del resto.

d) Antioxidantes

En la última parte del cuarto experimento, los valores de TBARS de las muestras no tratadas y las cocidas no aumentaron significativamente durante el almacenamiento, por lo que no se pudo evaluar el efecto de los antioxidantes. Dicho efecto sí se puso de manifiesto el sexto día tras los tratamientos por presión. El EDTA mostró mayor capacidad antioxidante que el albumen de huevo, ya que éste último no protegió a las muestras a pH 3 tratadas a 900 MPa. Cabe destacar que los valores de TBARS observados en las muestras a pH 4 con albumen de huevo pueden ser menores que los del resto debido más a la influencia del pH que a la propia acción del antioxidante.

5. CONCLUSIONES

Color

- La alta presión (500 MPa/60 min) provoca cambios significativos en el color original de la carne de pollo, más intensos que los inducidos por el tratamiento por calor (90°C/15 min). Además, al aumentar la temperatura (-10, 5, 20 y 50°C) a la que se aplica la presión, aumenta la magnitud de este efecto.
- El color de la yema de huevo con un 5 % de cloruro sódico también se altera con el tratamiento de alta presión (500 y 900 MPa/20°C/15 min), pero en este caso el cambio es menor que el que causa el tratamiento por calor (80°C/15 min). La concentración de cloruro sódico y el pH de la yema son factores esenciales para controlar los cambios de color de los ovoproductos presurizados y cocidos.
- Los productos avícolas presurizados o cocidos estudiados en este trabajo se diferencian visualmente de los no tratados, por lo que se debe descartar la presurización si se busca una apariencia similar a la de los productos frescos.

Técnicas analíticas

- Las técnicas de cuantificación de TBARS y hexanal empleadas son válidas para evaluar la oxidación lipídica en carne de pechuga de pollo tratada por presión o calor. Existe una buena correlación entre ambos métodos.
- La técnica de absorción al ultravioleta utilizada para la cuantificación de compuestos de oxidación en yema de huevo no es adecuada. Del mismo modo, la metodología de

evaluación de peróxidos se debe ajustar para obtener valores fiables, y los análisis deben concentrarse en la fase inicial de almacenamiento.

Estabilidad lipídica

- El tratamiento de alta presión a 500 MPa es significativamente menos prooxidante que el de calor (90°C/15 min) en carne de pollo conservada al vacío en refrigeración durante 9 días. Esto es válido para cualquier temperatura (-10, 5, 20 y 50°C) y tiempo (30 y 60 min) ensayados.
- En los lípidos de la yema de huevo, a su pH nativo, no se observa oxidación después de 1 ni 9 días de los tratamientos de presión (500 y 900 MPa/20°C/15 min) o calor (80°C/15 min), y estar almacenados en refrigeración en contacto con el aire.
- La magnitud de presión aplicada se correlaciona positivamente con la producción de compuestos secundarios de oxidación. Esto se percibe con mayor claridad cuando intervienen en el proceso factores prooxidantes, tales como la desintegración de estructuras celulares y la presencia de cloruro sódico en el caso de la carne, y la acidificación en el de la yema.
- Los tratamientos de presión (500 y 900 MPa/20°C/15 min) y calor (80°C/15 min) no provocan cambios destacables en el perfil de ácidos grasos de la yema de huevo de forma inmediata ni tras 9 días de almacenamiento en refrigeración en contacto con el aire. Por lo tanto, la presión mantiene la calidad organoléptica y nutritiva de los lípidos de la yema.

Acción mecánica y cloruro sódico

- La integridad de las estructuras celulares es un factor clave para prevenir la oxidación de la carne causada por la presión. Si la ruptura de aquéllas es anterior al tratamiento de presión la velocidad de producción de TBARS y hexanal aumenta, así como la máxima susceptibilidad de oxidación de la carne.
- El efecto prooxidante del cloruro sódico es proporcionalmente más intenso en carne presurizada que en cocida, hecho atribuible a la alteración de enlaces débiles causada por el aumento de carga iónica provocado por la sal.

Antioxidantes

- El extracto de *Rosmarinus officinalis* (400 ppm) alarga la fase de inducción de la oxidación de carne de pollo presurizada, de manera más eficaz en muestras tratadas a 300 que a 500 MPa, pero no es útil en carne cocida a 90°C durante 15 min.
- El extracto de acerola (2.000 ppm) no muestra efecto antioxidante en carne de pollo ya sea tratada por presión (300 o 500 MPa/20°C/15min) o calor (90°C/15 min).
- Los quelantes de metales (EDTA: 50 ppm; hexametáfosfato sódico: 2.500 y 5.000 ppm; albumen de huevo deshidratado: 5 y 10 %) son muy eficaces en el control de la oxidación de muestras de carne tratadas por calor (90°C/15 min) o presión (300 o 500 MPa/20°C/15min). Los metales libres desempeñan un importante papel prooxidante cuando se ha producido una profunda desestructuración celular, y la acción antioxidante de los fosfatos y del albumen de huevo es dependiente de la dosis a la que se utilizan. Por lo tanto, la formulación del alimento se debe realizar en función de estrés oxidativo al que se vaya a someter.
- Se consigue un mejor control de la oxidación de la yema de huevo a pH 3 tratada por presión (500 y 900 MPa/20°C/ 15 min) o calor (80°C/15 min) con EDTA (100 ppm) que con albumen de huevo (10 %). Así pues, la capacidad prooxidante de la presurización disminuye en presencia de quelantes de metales.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ajuyah, A.O., D.U. Ahn, R.T. Hardin y J.S. Sim (1993a) Dietary antioxidants and storage affect chemical characteristics of omega-3 fatty acids enriched broiler chicken meat. *Journal of Food Science*, 58, 43-46.
- Ajuyah, A.O., T.W. Fenton, R.T. Hardin y J.S. Sim (1993b) Measuring lipid oxidation volatiles in meats. *Journal of Food Science*, 58, 270-274.
- Álvarez, J.M. (2003) La producción de huevos de consumo en España. De sol a sol. *NANTA*. 3, 37-40.
- Andersen, M.L. y L.H. Skibsted (2002) Detection of early events in lipid oxidation by electron spin resonance spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 65-68.
- Angsupanich, K. y D.A. Ledward (1998) High pressure treatment effect on cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chemistry*, 63, 39-50.
- Anton, M. (1998) Structure and functional properties of hen egg yolk constituents. *Recent Research and Development in Agricultural and Food Chemistry*, 2, 839-864.
- Armitage, D.B., N.S. Hettiarachchy y M.A. Monsoor (2002) Natural antioxidants as a component of an egg albumen film in the reduction of lipid oxidation in cooked and uncooked poultry. *Journal of Food Science*, 67, 631-634.
- Arthur, C.L. y J. Pawliszyn (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145-2148.
- Asghar, A., J.I. Gray, D.J. Buckley, A.M. Pearson y A.M. Booren (1988) Citados por Gray y col. (1996).
- Barroeta, A.C. y A.J. King (1991) Effect of carotenoids on lipid oxidation in stored poultry muscle. *Poultry Science*, 74, 1388-1394.
- Baucells, M.D., N. Crespo, A.C. Barroeta, S. López-Ferrer y M.A. Grashorn (2000) Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poultry Science*, 79, 51-59.
- Beltran, E., J. Yuste, R. Pla y M. Mor-Mur (2000) Colour evaluation in cooked and pressurized poultry products. XXI World's poultry congress. Montreal (Canadá).
- Benedict, R.C., E.D. Strange y C.E. Swift (1975) Effect of lipid antioxidants on the stability of meat during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 167-173.
- Bernheim, F., M.L.C. Bernheim y K.M. Wilbur (1948) Citados por Guillén-Sans y Guzmán-Chozas (1998).
- Bilgili, S.F. (2002) Poultry meat processing and marketing-What does the future hold? *Poultry International*, 9, 12-22.

- Botsoglou, N.A., D.J. Fletouris, G.E. Papageorgiou, V.N. Vassilopoulos, A.J. Mantis y A.G. Trakatellis (1994) Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931-1937.
- Botsoglou, N.A., A.L. Yannakopoulos, D.J. Fletouris, A.S. Tserveni-Goussi, y P.D. Fortomaris (1997). Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3711-3716.
- Brunton, N.P., D.A. Cronin y F.J. Monahan (2001) The effects of temperature and pressure on the performance of carboxen/PDMS fibres during solid phase microextraction (SPME) of headspace volatiles from cooked and raw turkey breast. *Flavor and Fragrance Journal*, 16, 294-302.
- Brunton, N.P., D.A. Cronin, F.J. Monahan y R. Durcan (2000) A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, 68, 339-345.
- Bruun-Jensen, L. y L.H. Skibsted (1996) High-pressure effects on oxidation of nitrosylmyoglobin. *Meat Science*, 44, 145-149.
- Carballo, J., P. Fernandez y F. Jiménez-Colmenero (1996) Citados por Cheftel y Culioli (1997).
- Carlez, A, T. Veciana-Nogués y J.C. Cheftel (1995) Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 528-538.
- Cepero, R. (2001) Producción de huevos: situación actual y nueva normativa comunitaria. Jornadas sobre el huevo y los ovoproductos. Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).
- Codony, R. (2001) Composición y valor nutritivo del huevo. Jornadas sobre el huevo y los ovoproductos. 12-13 de noviembre. Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).
- Conchillo, A., D. Ansorena e I. Astiasarán (2003) Combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with and without air) on lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 66, 840-846.
- Cortinas, L. (2004) Niveles de ácidos grasos poliinsaturados y α -tocoferol en el pienso de broilers: equilibrio entre composición lipídica y estabilidad oxidativa de la carne. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).
- Cruz, J. (2002) Panorama del sector cárnico español en el 2001. *Eurocarne*, 103, 27-38.

- Csallany, A.S., M.D. Guan, J.D. Manwaring y P.B. Addis (1984) Citados por Raharho y Sofos (1993).
- Cubero, N., A. Monferrer y J. Villalta (2002) Antioxidantes. En "Aditivos alimentarios". Págs. 79-96. Mundi-Prensa, Madrid.
- Cheah, P. B. y D.A. Ledward (1995). High-pressure effects on lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1059-1063.
- Cheah, P. B. y D.A. Ledward (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43, 123-134.
- Cheah, P. B. y D.A. Ledward (1997). Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *Journal of Food Science*, 62, 1135-1141.
- Cheftel, J. C. y J. Culioli (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46, 211-236.
- Cheng, J. y H.W. Ockerman (2003) Effect of phosphate with tumbling on lipid oxidation of precooked roast beef. *Meat Science*, 65, 1353-1359.
- Cherian, G., F.H. Wolfe y J.S. Sim (1996). Feeding dietary oils with tocopherols: effects on internal qualities of eggs during storage. *Journal of Food Science*, 61, 15-18.
- Decker, E.A. y Z. Xu (1998) Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technology*, 52, 54-59.
- Deliza, R., A. Rosenthal y A.L.S. Silva (2003) Consumer attitude towards information on non conventional technology. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 43-49.
- Dissing, J., L. Bruun-Jensen y L.H. Skibsted (1997) Effect of high-pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 205, 11-13.
- Dobarganes, M.C. y J. Velasco (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 420-428.
- Elmore, J.S., D.S. Mottram y E. Hierro (2000) Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork. *Journal of Chromatography A*, 905, 223-240.
- Emi-Miwa, M., A. Okitani y M. Fujimaki (1976) Citados por Kanner (1994).
- Eskin, N.A. y R. Przybylski (2001) Antioxidants and shelf life of foods. En "Food shelf life stability". Eds. N.A.M. Eskin y D.S. Robinson. Págs. 175-209. CRC Press., Boca Raton, Florida, EUA.
- Fernández, J., J.A. Pérez-Álvarez y J.A. Fernández-López (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59, 3, 345-353.

- Galobart, J., A.C. Barroeta, M.D. Baucells y F. Guardiola (2001) Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and cantaxanthin supplementation. *Poultry Science*, 80, 327-337.
- Garriga, M., M.T. Aymerich y M. Hugas (2002) Tecnologías emergentes en la conservación de productos cárnicos: altas presiones hidrostáticas en jamón cocido loncheado. *Eurocarne*, 104, 77-83.
- Goutefongea, R, V. Rampon, N. Nicolas y J.P. Dumont (1995) Meat colour changes under high pressure treatment. 41st International congress of meat science and technology". San Antonio, Texas, EUA.
- Gray, J.I., E.A. Goma y D.J. Buckley (1996) Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, s111-s123.
- Guardiola, F., R. Codony, P.B. Addis, M. Rafecas y J. Boatella (1996) Citados por Morrissey y col. (1998).
- Guillén-Sans, R. y M. Guzmán-Chozas (1998) The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 315-330.
- Gutteridge, J.M.C. y B. Halliwell (1990) Citados por Gray y col. (1996).
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 1, 1396-1397.
- Hendrickx, M., L. Ludikhuyze, I. Van de Broek y C. Weemaes (1998) Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 197-203.
- Hu, F.B., M.J. Stampfer, E.B. Rimm, J.E. Manson, A. Ascherio, G.A. Colditz, B.A. Rosner, D. Spiegelman, F.E. Speizer, F.M. Sacks, C.H. Hennekens y W.C. Willett (1999) A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *The Journal of the American Medical Association*, 281, 1387-1394.
- Hugas, M., M. Garriga y J.M. Monfort (2002) New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359-371.
- IEC Review nº68, 72-73, 2002 (2003) Situación y previsiones del mercado del huevo para España. *Selecciones Avícolas*, 6, 408-409.
- Igene, J.O. y A.M. Pearson (1979) Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. *Journal of Food Science*, 44, 1285-1290.

- Indrawati, A., Van Loey, C. Smout y M. Hendrickx (2003). High hydrostatic pressure technology in food preservation. En "Food preservation techniques" Eds. P. Zeuthen y L. Bøgh-Sørensen. Págs. 428-448. Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido.
- Iwasaki, T. y K. Yamamoto (2002) Effect of high hydrostatic pressure on chicken myosin subfragment-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30, 227-232.
- Jiménez-Colmenero, F., S. Cofrades, J. Carballo, P. Fernández y F. Fernández-Martín (1998) Heating of chicken and pork meat batters under pressure conditions: protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4706-4711.
- Jorgensen, K. y L.H. Skibsted (1993) Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 196, 423-429.
- Käferstein, F. y M. Abdussalam (1999) La inocuidad de los alimentos en el siglo XXI. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*. 1, 111-115.
- Kakuda, Y., D.W. Stanley y F.R. Van de Voort (1981). Citados por Raharho S. y J.N. Sofos (1993).
- Kanner, J. (1994) Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, 36, 169-189.
- Kanner, J. y L. Doll (1991) Ferritin in turkey muscle tissue: a source of catalytic iron ions for lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 247-249.
- Kanner, J., S. Harel y R. Granit (1992) Citados por Gray y col. (1996).
- Kanner, J., M.A. Salan, S. Harel y I. Shegalovich (1991) Lipid peroxidation of muscle food: the role of the cytosolic fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 242-246.
- Kato, M. y R. Hayashi (1999) Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 1321-1328.
- Kavouridou, K. (2004) Efecto del perfil en ácidos grasos de la ración sobre la composición corporal en broilers. Trabajo de investigación. Programa de doctorado de Producción animal. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).
- Kehrer, J.P. (1993) Citado por Morrissey y col. (1998).
- Kehrer, J.P. y C.V. Smith (1994) Citados por Morrissey y col. (1998).
- Kohn, H.I. y M. Liversedge (1944) Citados por Guillén-Sans y Guzmán-Chozas (1998).

- Kubov, S. (1993) Citado por Morrisey y col. (1998).
- Kwon, T.W. y B.M. Watts (1963) Citados por Raharho y Sofos (1993).
- Madsen, H.L. y G. Bertelsen (1995) Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 271-277.
- Mandava, R., I. Fernandez y M. Juillerat (1995) Citados por Cheftel y Culioli (1997).
- Marshall, A.C., A.R. Sams y M.E. Van Elswyk (1994) Oxidative stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1.5% Menhaden oil. *Journal of Food Science*, 59, 561-563.
- Meyer, R.S., K.L. Cooper, D. Knorr y H.L.M. Lelieveld (2000) High-pressure sterilization of foods. *Food Technology*, 54, 11, 67-72.
- Miyazawa, T., M. Kashima y K. Fujimoto (1993) Citados por Dobarganes y Velasco (2002).
- Mor-Mur, M. y J. Yuste (2000b) Alta presión isostática. Una nueva tecnología para conservar la carne de pollo y sus derivados. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, XIX (3), 61-65.
- Mor-Mur, M. y J. Yuste (2000a) Aplicación del tratamiento por alta presión isostática en las industrias cárnica y avícola. *Eurocarne*, 87, 49-54.
- Morrisey, P.A., S. Brandon, D.J. Buckley, P.J.A. Sheehy y M. Frigg (1997) Citados por Morrisey y col. (1998).
- Morrisey, P.A., D.J. Buckley, P.J.A. Sheehy y F.J. Monahan (1994) Citados por Morrisey y col. (1998).
- Morrisey, P.A., P.J.A. Sheehy, K. Galvin, J.P. Kerry y D.J. Buckley (1998) Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, s73-s86.
- Mozhaev, V.V., K. Heremans, J. Frank, P. Masson y C. Balny (1994) Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12, 493-501.
- Murphy, A., J.P. Kerry, J. Buckley e I. Gray (1998) The antioxidative properties of Rosemary oleoresin and inhibition of off-flavors in pre-cooked roast beef slices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 235-243.
- Nawar, W.W. (1998) Biochemical processes: lipid instability. En "Food storage stability". Eds. I. A. Taub y P. Singh. Págs. 89-103. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA.
- Nielsen, J.H., B. Sørensen, L.H. Skibsted y G. Bertelsen (1997) Oxidation in pre-cooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Science*, 46, 191-197.

- Niki, E. (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 227-253.
- Ohshima, T., H. Ushio y K. Koizumi (1993) High pressure processing of fish and fish products. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 370-375.
- Orlien, V., E. Hansen y L.H. Skibsted (2000) Lipid oxidation in high pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research and Technology*, 211, 99-104.
- Patton, S. y G.W. Kurtz (1951) Citados por Guillén-Sans y Guzmán-Chozas (1998).
- Penton, Z.E. (1997) Sample preparation for gas chromatography with solid-phase-extraction and solid-phase-microextraction. *Advances in Chromatography*, 37, 205-236.
- Pike, O.A. e I.C. Peng (1985) Stability of shell egg and liquid yolk to lipid oxidation. *Poultry Science*, 64, 1470-1475.
- Pikul, J. y F.A. Kummerow (1990) Lipid oxidation in chicken muscles and skin after roasting and refrigerated storage of main broiler parts. *Journal of Food Science*, 55, 30-37.
- Pikul, J. y F.A. Kummerow (1991) Thiobarbituric acid reactive substance formation as affected by distribution of polyenoic fatty acids in individual phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 451-457.
- Pikul, J. y D.E. Leszczynski (1986) Citados por Raharho S. y J.N. Sofos (1993).
- Pikul, J., D.E. Leszczynski y F.A. Kummerow (1983) Citados por Raharho y Sofos (1993).
- Pikul, J., D.E. Leszczynski y F.A. Kummerow (1989) Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1309-1313.
- Ponce, E. (2000) Aplicación de alta presión hidrostática en ovoproductos. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).
- Ponce, E., R. Pla, M. Capellas, B. Guamis y M. Mor-Mur (1998) Inactivation of *Escherichia coli* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*, 15, 265-272.
- Ponce, E., R. Pla, M. Mor-Mur, R. Gervilla y B. Guamis (1998) Inactivation of *Listeria innocua* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 61, 119-122.

- Ponce, E., R. Pla, E. Sendra, B. Guamis y M. Mor-Mur (1998) Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 15-19.
- Ponce, E., R. Pla, E. Sendra, B. Guamis y M. Mor-Mur (1999) Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. *Food Microbiology*, 16, 357-365.
- Ponce, E., E. Sendra, E. Beltran, J. Yuste, M. Mor.Mur y R. Pla (2002) Elaboración de flanes de huevo mediante alta presión hidrostática a temperaturas inferiores a 0°C. *Alimentaria*, 335, 133-137.
- Protopopova, T.V. y A.P. Skoldinov (1956) Citados por Raharho y Sofos (1993).
- Raharho, S. y J.N. Sofos (1993) Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. *Meat Science*, 35, 145-169.
- SADA, P.A. S.A. (2002) Expectativas y hábitos de consumo de la carne de pollo. *Eurocarne*, 108, 23-28.
- Sánchez-Escalante, A., D. Djenane, G. Torrescano, J.A. Beltrán y P. Roncalés (2001) The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 58, 421-429.
- Saslaw, L.D. y V.S. Waravdeekar (1957) Citados por Raharho y Sofos (1993).
- Severini, C., S. Romani, G. Dall'Aglio, P. Rovere, L. Conte y C.R. Lerici (1997) High pressure effects on lipid oxidation of extra virgin olive oil and seed oils. *Italian Journal of Food Science*, 3, 183-191.
- Shahidi, F. y R.B. Pegg (1994) Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat products. En "Lipids in food flavors". Eds. C.T. Ho y T.G. Hartman. Págs. 257-278. ACS symposium series 558.
- Shantha, N.C. y E.A. Decker (1994) Rapid, sensitive, iron based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77, 421-424.
- Shigehisa, T., T. Ohmori, A. Saito, S. Taji y R. Hayashi (1991). Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 207-216.
- Sinnhuber, R.O. y T.C. Yu (1958) Citados por Raharho y Sofos (1993) y Fernández y col. (1997).

- St. Angelo, A.J. (1996) Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 175-224.
- Tanaka, M., Z. Xueyi, Y. Nagashima y T. Taguchi (1991). Effect of high pressure on the lipid oxidation in sardine meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 957-963.
- Tarladgis, B.G., A.M. Pearson y L.R. Dugan (1964) Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. II.- Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15, 602-607.
- Tarladgis, B.G., B.M. Watts y M.T. Younathan (1960) A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 37, 44-48.
- Tims, M. J. y B.M. Watts (1958) Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technology*, 5 (12), 240-243.
- Tuboly, E., V.K. Lebovics, O. Gaál, L. Mészáros y J. Farkas (2003) Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 56, 241-244.
- Vivas, L. (2000) El enranciamiento y el papel de los antioxidantes. *Cárnica 2000*, 1, 67-72.
- Wada, S. (1992) Quality and lipid change of sardine meat by high pressure treatment. En "High pressure and biotechnology". Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. Págs. 235-238. John Libbey Eurotext/Les Editions INSERM, Montrouge, Francia.
- Wahle, K.W.J., P.P. Hoppe y G. McIntosh (1993) Effect of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 463-469.
- Wardencki, W., M. Michulec y J. Curylo (2004) A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 703-717.
- Wen, J., S.N. McCarthy, F.M.J. Higgins, P.A. Morrissey, D.J. Buckley y P.J.A. Sheehy (1997) Citados por Morrissey y col. (1998).
- Witte, V.C., G.F. Krause y M.E. Bailey (1970) A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *Journal of Food Science*, 35, 582-585.
- Yagi, K. (1976) Citado por Raharho y Sofos (1993) y Fernández J. y col. (1997).

- Yoshioka, K., Y. Kage y H. Omura (1992). Effect of high pressure on texture and ultrastructure of fish and chicken muscles and their gels. En "High pressure and biotechnology". Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. Págs. 325-327. John Libbey Eurotext/Les Editions INSERM, Montrouge, Francia.
- Yuste, J. (2000) Alta pressió isostàtica aplicada a carn recuperada mecànicament d'aviram. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).
- Yuste, J., M. Mor-Mur, M. Capellas, B. Guamis y R. Pla (1998) Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. *Food Microbiology*, 15, 407-414.
- Yuste, J., M. Mor-Mur, M. Capellas, B. Guamis y R. Pla (1999) Mechanically recovered poultry meat sausages manufactured with high hydrostatic pressure. *Poultry Science*, 78, 914-921.
- Yuste, J., M. Mor-Mur, M. Capellas y R. Pla (1999a) *Listeria innocua* and aerobic mesophiles during chill storage of inoculated mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 53, 251-257.
- Yuste, J., M. Mor-Mur, M. Capellas y R. Pla (1999b) Pressure vs. heat-induced bacterial stress in cooked poultry sausages: a preliminary study. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 233-237.
- Yuste, J., R. Pla, M. Capellas y M. Mor.Mur (2000) Bacterial sensitivity to high hydrostatic pressure in mechanically recovered poultry meat - Minor baroprotective role of fat content. *Fleischwirtschaft International*, 3, 51-54.
- Yuste, J., R. Pla, M. Capellas, E. Ponce y M. Mor-Mur (2000) High-pressure processing applied to cooked sausages: bacterial populations during chilled storage. *Journal of Food Protection*, 63, 1093-1099.
- Yuste, J., R. Pla y M. Mor-Mur (2000) *Salmonella enteritidis* and aerobic mesophiles in inoculated poultry sausages manufactured with high-pressure processing. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 374-377.
- Zumalacárregui, J.M., C. Domínguez y J. Mateo (2000) La oxidación de la grasa en la carne y los productos cárnicos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 4, 67-71.

7. ANEXO: RESULTS AND DISCUSSION

The experiments that were carried out were focused on the study of the effect of high-pressure on poultry products, and they were divided into two groups depending on the raw materials used:

- Poultry meat.- The first experiment was performed on thigh meat. The subsequent two experiments were completed on breast meat because its muscular tissue was easily isolated from the connective tissue and the lipids that constituted it were more susceptible to oxidation.
- Egg yolk.- In the last experiment the effects of high-pressure on this raw material were studied.

The results obtained in the four experiments can be divided into two different areas that must be discussed independently: colour and lipid oxidation.

4.1. COLOUR

The ability of high-pressure to preserve the colour of fruits and vegetables has been widely documented (Indrawati *et al.*, 2003). Nevertheless, the effects of this new technology on meat cause a wide range of colour variations that differentiate the pressurized meat samples from the raw ones (Cheftel and Culioli, 1997).

Of the different papers that have been published about this subject, the work of Carlez, Veciana-Nogués and Cheftel (1995) is especially interesting. In this study it was observed that the brightness of beef meat increased and the redness decreased giving the product a pink-grey appearance, characteristic of cooked pieces. A possible answer to this

phenomenon was given: globin denaturation and the release or displacement of the heme group were pointed out as the causes of the increase in brightness in the meat that was treated at 200-350 MPa; while myoglobin oxidation to metamyoglobin only happened at pressures over 400 MPa. In contrast, Goutefongea, Rampon, Nicolas and Dumont (1995) detected an increase in the redness of pressurized pork and beef meat samples, but agreed with Carlez *et al.* (1995) about the increase in brightness, which was attributed to the plasmatic protein coagulation induced by the decrease in protein solubility. In addition, it has been determined that cured meats maintain their redness after pressurization because the nitromyoglobin is protected by the nitrous oxide from the oxidation of the ferrous iron (Carlez *et al.*, 1995; Goutefongea *et al.*, 1995; Bruun-Jensen and Skibsted, 1996).

a) The effect of the temperature of the high-pressure treatment on the colour of thigh meat

Results from the first experiment show that thigh meat treated by heat increases in brightness, but not as much as when it is pressurized. Furthermore, the increase in brightness is greater when high-pressure high-temperature treatments are used: the temperature control sample (50°C) shows a significant increase in the *L* value compared to the control sample, even though it is still lower than the pressurized samples. A decrease in redness was observed in pressurized thigh meat samples that became more obvious as the temperature was increased, so the samples that were pressurized at a temperature of 50°C reached minimum values and could not be differentiated from the cooked samples. These results reaffirm those observed in a previous experiment on poultry meat (Beltran, Yuste, Pla and Mor-Mur, 2000), the trends observed by Carlez *et al.* (1995) in beef meat and, in terms of brightness with results published by Goutefongea *et al.* (1995). It should be noted that the variation in brightness is greater than that of the redness in absolute value although in percentage the opposite can occur.

The mechanisms by which high-pressure causes changes in the colour of the meat should be studied in greater depth. Partial dissociation of the ionic pairs caused by the pressure decreases the pH value, disrupts electrostatic interactions and, possibly originates globin denaturation or heme group displacement. The decrease in the pH value could lead to the oxidation of the heme group into its ferric state. On the other hand the effect of the pressure on the oxidizing enzymes of the myoglobin and the reducing enzymes of the metamyoglobin is unknown. Finally, it has to be taken into account that

certain molecules resulting from the oxidation of fats can catalyse the oxidation of the heme group (Cheftel and Culioli, 1997).

b) The effect of pressure on the colour of egg yolk. The influence of the pH value and the ionic strength

The data obtained from the fourth experiment is not in agreement with the trends observed in a previous work on egg yolk (Beltran *et al.*, 2000) where it was reported that changes caused by high-pressure treatment, in comparison to the control, were minimal in relation to brightness, redness and yellowness; while cooked egg yolk could be easily differentiated from the rest due to the low yellowness. The decreases in redness and yellowness are attributed to the destruction of carotenoids, therefore, the results of this work indicated that pressure does not affect these molecules and the heat treatment does.

In this experiment, the simple addition of sodium chloride without any other treatment affects the colour of the yolk and, what is more important, it affects the capability of the colour of the samples to be modified by further treatments. Adding sodium chloride increases the number of electrical charges in the matrix, which alters the weak electrostatic bonds of the proteins and can even cause protein denaturation. When the spatial configuration of the protein changes the refraction index of light is modified, causing a change in colour.

It was detected that the decrease in the pH value also affects the colour of the yolk: at pH 5 “L”, “a” and “b” decrease, however, an increased acidity (pH 3) causes an increase in the three parameters so that the changes revert and the colour of the yolk returns to that of the original sample (pH 6). If the samples are grouped by pH value, it is observed that the total difference of colour of pressurized egg yolk samples compared to non salted egg yolk is higher than the difference between cooked samples and non salted ones. However, if samples with the same pH value are compared, the cooked samples show a greater difference from the untreated samples than from the pressurized ones. So, this indicates that, in all the cases, heat treatments create greater differences in egg yolk than high-pressure treatments.

4.2. LIPID OXIDATION

4.2.1. POULTRY MEAT

The main objective of this thesis is to describe the general effects of high pressure on the lipidic fraction of chicken meat in order to acquire a greater understanding of this subject and to define future research lines. In the early stages of this work the existent bibliography about this subject (Tanaka *et al.*, 1991; Wada, 1992; Ohshima *et al.*, 1993; Carlez *et al.*, 1995; Cheah and Ledward, 1995, 1996, 1997; Cheftel and Culioli, 1997; Dissing *et al.*, 1997; Severini *et al.*, 1997; Angsupanich and Ledward, 1998) dealt with a different raw material, other than chicken meat and eggs (fish, pork and turkey meat, oils...). A clear prooxidant action of the high-pressure treatment was postulated. The initial proposal indicated that treatments over 300 MPa induced lipid oxidation in muscular systems (Cheftel and Culioli, 1997). There are many factors that, as it will be shown, influence the lipid stability of pressurized chicken meat, but generally speaking, it is not accurate to affirm that high-pressure treatments have a greater prooxidant capability than traditional heat treatments.

The amount of oxidation compounds in cooked foods depends on the precursors that exist in the raw materials and on the shape and the size of the samples. Small portions present a reduced amount of oxidation compounds because they need shorter heat treatments and so, they have minimal cooking losses (Pikul and Kummerow, 1990). On the other hand, the pressure treatment is homogeneously and almost instantaneously transmitted throughout the whole piece, so, there is no pressure gradient. This is the reason why the oxidation compounds do not vary depending on the size of the sample.

a) Effects of pressure intensity and oxygen availability throughout chilled storage

The prooxidant action of the pressure treatment was detected in the first experiment carried out, when raw and over-cooked (100°C/60 min) chicken thigh meat samples were treated by high pressure (500 MPa/50°C/30 min) and subsequently stored at 4°C in contact with air. This was shown on the first day in over-cooked samples and on the sixth day in raw samples. This effect is exclusively attributed to high pressure because in the temperature control samples (samples treated at the same temperature but under atmospheric pressure) and in the untreated samples the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was found to be similar and did not increase over storage time.

These first results matched those observed in fish (Tanaka *et al.*, 1991; Wada, 1992; Ohshima *et al.*, 1993; Angsupanich and Ledward, 1998), in pork meat (Cheah and Ledward, 1995, 1996, 1997), and even in turkey meat (Dissing *et al.*, 1997).

The effects of traditional heat treatments and high-pressure treatments were studied simultaneously in the following experiments because the cooked samples had displayed 10-fold higher TBARS than the raw samples. This fact indicated a strong oxidative ability of high temperatures. It had been established that the bonds that maintain the secondary, tertiary and quaternary structure of meat proteins were modified in a different way when treated by heat or pressure: traditional heat treatments affect mainly the hydrogen bonds, while pressure ones attack hydrophobic and electrostatic interactions (Angsupanich and Ledward, 1998).

The ideal meat products storage conditions were imitated (refrigeration at 4°C, darkness and vacuum) and lower TBARS values than in the first experiment were obtained in all cases. High-pressure treatment (500 MPa) did not induce lipid oxidation at any of the processing temperatures nor did the storage time of the samples (paper 1). This fact was expected due to the fact that the storage of the samples was performed under vacuum. However, cooked thigh meat (90°C/15 min) showed TBARS values 20-35 fold higher than the rest of the samples. Therefore, it is concluded that traditional heat treatment is much more aggressive than pressurization at 500 MPa on chicken meat preserved at vacuum chilled storage. The prooxidant ability of the high-pressure treatment that had been observed in the first part of the experiment and that had been described in some of the works quoted earlier is questioned.

After the obtention of these results, new working hypothesis were defined to determine differences among the oxidation initiation mechanisms of the two processes evaluated. The raw material was changed from thigh to breast meat because the muscular tissue of the latter is easily isolated from the rest of the meat. Although it is well known that TBARS values are higher in thigh meat than in breast meat because of total lipids are more abundant in the first one, the higher amount of phospholipids found in the lipidic fraction of breast meat helps it to have a double amount of malondialdehyde (Pikul and Kummerow, 1990).

Conclusions from the second experiment reinforce the idea that it is necessary to apply extreme pressurization conditions to induce lipid oxidation in chicken meat. In this

experiment, breast samples were chilled stored in the darkness after the treatments, but they were in contact with air to induce a greater oxidation than the one detected in the vacuum packed thigh samples from the first experiment. Lipids from pressurized breast (300 and 500 MPa/20°C/30 min) did not become oxidized after 9 days in contact with air, while an intense oxidation was registered in lipids from cooked meat (90°C/15 min).

These results corroborate those obtained by Orlien *et al.* (2000), who had indicated that 500 MPa is the critical pressure magnitude where chicken breast lipids start to oxidize significantly if compared with untreated samples. These authors proposed a model to predict the lipid oxidation progression depending on the pressure applied. They also specified that pressure magnitude is a more important factor than treatment time in TBARS generation. Results from the second experiment of the present work show that chicken lipids can resist oxidation induction under worse environmental conditions than those applied in the work of Orlien *et al.* in which the samples were vacuum packed. The study of Conchillo, Ansorena and Astiasarán (2003) illustrates that the oxidative stability of vacuum packed raw and cooked breast chicken meat is higher than that from samples in contact with air.

b) Oxidation markers: TBARS vs. hexanal

Igene and Pearson detected, in 1979, a positive correlation between TBARS and sensory parameters in beef and chicken meat. Subsequent studies have found good correlations between chemical data (TBARS), instrumental data (hexanal and total volatiles) and flavour attributes (St. Angelo, 1996; Ajuyah, Fenton, Hardin and Sim, 1993b). Hexanal, pentanal and 2,3-octanedione together with some other less important volatile compounds have been proposed as markers in cooked poultry products. The three markers had been previously identified as secondary oxidation products from linoleic acid (St. Angelo, 1996). The levels of hexanal, the major volatile compound isolated from white and red chicken muscle, increase during product storage up to a point, but after some time the values decrease (Ajuyah *et al.*, 1993b). Protein degradation has been linked to the reduction in desirable flavours, so these molecules contribute to meat flavour degradation. The flavour of cured meat products does not deteriorate because nitrites protect it against the formation of carbonylic compounds (Shahidi and Pegg, 1994).

This background compelled us to perform parallel analysis of TBARS and hexanal in chicken samples to observe if the oxidation compounds generated by high pressure

treatment were similar to those obtained after cooking, and if there was correlation between the two compounds and it was maintained throughout the storage. Results from the second experiment concluded that TBARS and hexanal are both valid parameters to determine lipid oxidation in breast chicken meat treated by pressure or heat and that a correlation exists between the two analyses.

c) Effects of the mechanical action applied previously and subsequently to the treatments

Several authors had pointed out that the lipid oxidation mechanism induced by high-pressure treatments was related to cell structures stability (Cheftel and Culioli, 1997; Kato and Hayashi, 1999; Orlien *et al.*, 2000). The cytosolic fraction of turkey muscle cells contains reducing compounds that have an antioxidant action whose effect could be modified by environmental changes (Kanner *et al.*, 1991).

The application of an intense mechanical action, before and after the treatments, to slurries made from minced breast meat and water (1:3, w/w): showed how important it is to maintain the cell structure integrity to preserve the lipid stability, and allowed to evaluate the oxidation susceptibility of tissues damaged in different moments of the process.

TBARS and hexanal were analysed in the slurries obtained. The results showed similar patterns in all cases, so the two parameters were considered valid to evaluate lipid oxidation on chicken meat, as it had been indicated by other authors (Ajuyah *et al.*, 1993b; Shahidi and Pegg, 1994; Nielsen *et al.*, 1997; Brunton *et al.*, 2000). Shahidi and Pegg (1994) indicated that, in the early stages of the storage process, hexanal is a better marker of the oxidative status than TBARS.

The application of an intense mechanical action before or after the treatments desestructures the meat cell system and theoretically, samples should show different susceptibility to oxidation. The mechanical action applied after the treatments did not show any effect on the lipids from pressurized and untreated samples but enhanced lipid oxidation of cooked slurries. However, when the mechanical action was applied previously to the treatments the lipid oxidation of samples processed at 500 MPa was similar to the one of the cooked samples and significantly higher than that of samples pressurized at 300 MPa and the untreated ones. The prooxidant ability of the mechanical action applied before than the treatments is much higher in samples treated at 500 MPa than in cooked

samples. It is established that the cell structure integrity is a key factor to prevent lipid oxidation induced by pressurization, and that the pressure magnitude applied correlates positively with the generation of secondary oxidation compounds.

When hexanal was quantified in the last experiment, it was observed again the same pattern of lipid oxidation differentiation in slurries obtained previously to the treatments: controls remained at basal levels, samples pressurized at 300 MPa were remained at an intermediate level not always significantly higher than that from cooked samples, and samples treated at 500 and 900 MPa displayed the significantly highest hexanal amounts. The treatment at 900 MPa is a novelty, and the fact that it did not show hexanal amounts significantly higher than samples treated at 500 MPa could indicate that the lineal increase of the oxidative response is only valid up to a pressure magnitude. It can be hypothetized that pressure could have a maximal prooxidant capability or that the pressurized substrate could have reached its maximal lipid degradation.

d) Prooxidants action

Sodium chloride is a well-known prooxidant agent that is widely used in the food industry due to its positive action over technological processes and processed products. Its addition to the meat in a 5% (w/w) increased significantly the TBARS values from samples pressurized at 500 MPa in respect of the controls, despite the fact that cooked samples were again the most oxidized. The prooxidant effect of sodium chloride is proportionally more important in pressurized samples than in cooked ones, and this fact could be related to the disturbance of the weak bounds produced by the increase in ionic strength caused by sodium chloride. These altered weak bounds could be easily attacked by pressure and release a higher amount of iron from the macromolecules. However, despite it has been documented that cooking causes the release of iron from the heme group (Halliwell and Gutteridge, 1984), in the study of Orlien *et al.* (2000) no iron release was detected after chicken breast pressurization. The prooxidant action of sodium chloride could be based on a larger exposition of the membrane lipids caused by the membrane disruption, or on the inactivation of antioxidant enzymes that the pressure treatment itself would not affect.

Sodium chloride also showed a more intense prooxidant action in pressurized slurries than in heat-treated ones, as it had happened in the case of minced breast meat. In fact, hexanal values from cooked slurries that contained a 5% of sodium chloride were no higher than those that did not contain salt. The greatest oxidation degree, quantified by

means of TBARS and hexanal, was detected in salted samples that had suffered the mechanical action previously to the treatments. Under these experimental conditions, TBARS and hexanal values were similar in samples pressurized at 500 MPa or cooked, intermediate for those treated at 300 MPa, and minimal for the control ones. These data confirm that, under adverse conditions, the pressure treatment potentiates lipid oxidation in dependence of the pressure intensity applied, and that in the case of pressurized samples, cell desestructuration and sodium chloride presence are factors that cause desestabilization of the lipidic fraction.

e) Antioxidants action

In the last experiment performed on chicken meat it was evaluated the antioxidative capability of different compound in the sample group whose lipids had been more susceptible to lipid oxidation in previous experiments (mechanical action previous to the treatments and sodium chloride addition) to control the oxidative process.

The dose of extract from *Rosmarinus officinalis* used in this experiment (400 ppm) was enough to inhibit significantly lipid oxidation of samples treated at pressures lower than 500 MPa and to enlarge the induction phase of the reaction, but it was not useful in cooked samples. The inability to act in cooked slurries could be due to a greater presence of free radicals in these samples or due to an extreme alteration of the muscle structure caused by heat. It would be interesting to test this antioxidant at higher doses, as there is works where it has been documented an antioxidant effect of this product on heat-treated meat (Murphy, Kerry, Buckley and Gray, 1998).

The acerola extract was included in the experiment design because it is a substance rich in ascorbic acid, which is an antioxidant widely used in the food industry. Latest tendencies indicate that the most of his effect is the inhibition of metamyoglobin formation, and that its action over meat lipid stability is little if any (Morrisey *et al.*, 1998; Sánchez-Escalante, Djenane, Torrescano, Beltrán and Roncalés, 2001). Results from the present work agree with this affirmation as significant differences respect samples without antioxidants were not observed.

Several authors (St. Angelo, 1996) have described that warmed over flavours (WOF) production is directly linked to metallic ions, so, by using of a powerful chelator it

could be evaluated the importance of these molecules in the lipid destabilization process.

EDTA is a well-known metal chelator that was extremely effective in the control of the oxidation of samples treated by pressure or heat. Therefore, it was confirmed the important prooxidant role that played free metals when a large cell desestructuration occurs.

The last part of the experiment with chicken meat confirmed involvement of the metals in lipid oxidation because the ability of phosphates and egg white to control this process was showed. Phosphates and some components of the egg albumen have some chelant ability, and its antioxidant effect is attributed to its ability to block the metal ions action. Sodium triphosphate inhibits carbonilic compounds production and this is partly due to its chelating ability and partly due to the neutralization of the prooxidant action of sodium chloride (Shahidi and Pegg, 1994). Phosphates are additives frequently used in the food industry because they are antioxidant compounds that increase the pH value and the ionic strength, and improve the cooking yields of meat products (Cheng and Ockerman, 2003). It has been detected that by using a cover made from an aqueous solution of egg albumen, it is possible to minimize lipid oxidation in raw and cooked chicken meat (Armitage, Hettiarachchy and Monsoor, 2002). The use of 5000 ppm of phosphates placed the slurry treated at 300 MPa at the same oxidation level than the untreated one, inhibited significantly lipid oxidation of samples pressurized at 500 MPa and did so with the cooked ones, but it was not enough to preserve lipid stability of samples treated at 900 MPa. Egg white was more efficient in pressurized samples than in cooked ones, but when it was applied at 10% (w/w) the oxidation degree of the different samples was equivalent. Results show an antioxidant action dose dependant in both cases, but it seems that egg white has a more robust action. Despite samples without added antioxidants that were pressurized at 900 MPa display a lipid alteration similar to the one induced by the 500 MPa treatment, The weaker action of phosphate over samples treated at 900 MPa allowed to conclude that samples that are treated at higher pressures suffered greater damage and are more difficult to control.

In some cases it was observed that the hexanal measured after 9 days of storage was lower than the one registered at day 6. This decrease could be due to the breakage of the aldehydes in shorter chains or to the reaction of the carbonyls with proteins in a process independent from oxygen. It could also have happened that the final phase of the

oxidation reaction would have started. The same tendencies had been observed by Shahidi and Pegg (1994), who indicated, after seeing that hexanal values decreased after 6 days of storage, that the aldehyde became oxidized and the resultant compounds become linked to different meat components.

4.2.2. EGG YOLK

a) Primary oxidation compounds

Non-conclusive results were obtained with the analyses of ultraviolet compounds and hydroperoxydes. As the analysed sample nature influences the analysis result (Dobarganes and Velasco, 2002) it is suspected that the applied methods are not useful to quantify these compounds in egg yolk. The analytical procedures should be adapted to this matrix, and it would be advisable to analyse some samples at an earlier stage of the storage in order to recapt essential information about the primary oxidation compounds.

b) Lipid profile

The lipid profile that was obtained from egg yolk fits, in general terms, with what was determined by other authors (Anton, 1998). Four major fatty acids were detected, and in decreasing percentage they are: C18:1, C18:2, C16 and C18. The minor fatty acids were: C20:4, C18:3, C22:6, C16:1 and C14. From the total amount of fatty acids, monounsaturated fatty acids were close to the 40%, saturated were little over the 30% and polyunsaturated were little under the 30%.

No important changes in the yolk fatty acids profile were detected at 1 and 9 days of chilled storage after being treated by pressure or heat. Despite tables 2 and 3 of the fourth experiment show some significant differences in the percentage of several fatty acids, these transformations do not have the relevance to impact on the consumer diet and in the lipid stability of the samples. The results robustness indicates that the lipidic fraction of egg is well protected against possible degenerative changes, but it is possible that the total fatty acids were generally affected and the change was not reflected into the analysis. Igene and Pearson (1979) described that traditional heat treatment does not affect much the lipid profile of triglycerides but it destroyed some phospholipids because of autooxidation, hydrolytic decomposition, lipid browning or copolymerisation with proteins. It

will be very interesting to quantify egg yolk phospholipids from samples treated by heat and pressure.

c) TBARS

TBARS values obtained in the first part of the fourth experiment indicate that pH is the most important factor from those that affect egg yolk lipid stability. Botsoglou, Yannakopoulos, Fletouris, Tserveni-Goussi and Fortomaris (1997) have detected an increase of TBARS from egg yolk at pH lower than 5 that could be attributed to phosvitin denaturation and to the consequent iron release. However, this protein had shown certain protective action against oxidation in a pH range varying between 2 and 7, so its action is controversial.

Egg yolk at pH 3 that was pressurized at 900 MPa was the only sample that the first day after the treatments showed significantly higher values than the other samples, but some increasing trends were observed in samples from the same pH group. These differences become greater as the storage progresses, and samples from this PH group are the only samples that show significant increases of their TBARS values throughout the storage. Cooked samples at pH 3 displays a lipidic stability that is comparable to the sample pressurized at 500 MPa at the same pH until the sixth day of chilled storage (4°C). It is not well defined if sodium chloride develops a prooxidant action in samples treated at pH 3, but it is for sure that this does not happen at higher pH. It has to be determined in the future if the flavour from samples treated by high-pressure at pH 3 is different from that from the rest of samples.

d) Antioxidants

In the last part of the fourth experiment, untreated and cooked samples did not increase significantly their TBARS throughout the storage, so the antioxidant effect could not be perceived. Antioxidants action was detected the sixth day after the pressure treatments. However, EDTA showed greater antioxidant ability than egg albumen in the case of pressure-treated samples, as the egg white did not protect samples at pH 3 that were pressurized at 900 MPa. It is important to indicate that the low TBARS values observed in samples at pH 4 could be lower than those from the other samples due to the pH influence more than due to the antioxidant action itself.