



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Uso de aceites ácidos en alimentación animal: efecto sobre la composición lipídica y calidad de la carne y del filete de pescado

Paula Albendea Pérez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

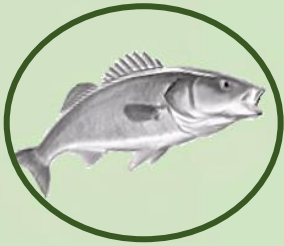
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



TESIS DOCTORAL
2023

Uso de aceites ácidos en
alimentación animal: efecto
sobre la composición lipídica y
calidad de la carne y del
filete de pescado



Paula Albendea Pérez



UNIVERSITAT DE
BARCELONA





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ, CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ I
GASTRONOMIA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Uso de aceites ácidos en
alimentación animal: efecto
sobre la composición lipídica y
calidad de la carne y del
filete de pescado

Use of acid oils in animal
feeding: effects on lipid
composition, lipid oxidation
and quality of meat and fish
fillet

Paula Albendea Pérez

2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ, CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ I
GASTRONOMIA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Uso de aceites ácidos en
alimentación animal: efecto
sobre la composición lipídica y
calidad de la carne y del
filete de pescado

Memoria presentada por **Paula Albendea Pérez** para optar al título
de Doctor por la Universitat de Barcelona

Dr. Francesc Guardiola Ibarz

Director y tutor

Dra. Alba Tres Oliver

Directora

Paula Albendea Pérez

Doctoranda

Paula Albendea Pérez

2023

-FUNDING SOURCES AND INSTITUTIONAL SUPPORT-
-FINANCIACIÓN Y APOYO INSTITUCIONAL-

-PhD grants-
-Ayudas predoctorales-



Ayuda del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU18/01010) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.



Ajut de personal investigador predoctoral en formació (APIF_18_19_10) de la Universitat de Barcelona.

-Funding and participants in the research project-
-Financiación y participantes en el proyecto de investigación-



Ayudas del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad. Modalidad Proyectos I+D+I. *Utilización de aceites ácidos en la alimentación de animales monogástricos. Caracterización, nutrición comparada y repercusiones sobre la calidad lipídica de la carne.* (Proyecto AGL2015-64431-C2-2-R). Proyecto financiado por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033/ y "FEDER Una manera de hacer Europa".



Grup de recerca en Lípids i compostos bioactius de la cadena alimentària (LIBIFOOD) SGR-2017-1269.



Servei de Nutrició i Benestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.



Grupo de investigación AviFeed Science, Departamento de Producción y Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera.



Colaboración en los estudios realizados con cerdos y pollos del proyecto de investigación *Utilización de aceites ácidos en la alimentación de animales monogástricos.*

**-Travel grants-
-Bolsas de viaje-**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació

Bolsas de viaje y ayudas de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona.

INSA



EXCELENCIA
MARÍA
DE MAEZTU

Bolsas de viaje y ayudas de l'Institut de recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona (INSA-UB), reconocido como Unidad de Excelencia María de Maeztu (subvención CEX2021-001234-M) financiada por MICIN/AEI/FEDER, UE.

**-Institutional support-
-Apoyo institucional-**



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI UDINE
hic sunt futura

Department of Agricultural, Environmental and Animal Sciences, University of Udine, Italy. Realización de estancia de tres meses durante la tesis doctoral.



Campus
de l'Alimentació
Universitat de Barcelona



FACULTAT DE FARMÀCIA I
CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**“Everything is theoretically impossible,
until it is done”**

– Robert A. Heinlein –

Generalmente siempre conocemos el punto de partida, pero la forma del camino y el lugar donde termina suelen ser inciertos. El doctorado es una de esas etapas pedregosas, llena de baches y algunos muros, pero cada obstáculo, cada reto, termina siendo una pequeña lección que debemos recibir con cariño y aprender al máximo de ella. Se dice que cada experiencia es tan complicada como la queramos hacer o ver, y es cierto que el entorno en el que vivimos y las personas con las que compartimos nuestro tiempo influyen en gran medida. En mi caso, el doctorado ha sido una de las experiencias más maravillosas de mi vida en términos de crecimiento profesional, pero sobre todo personal, y eso se lo debo a cada una de las personas con las que he compartido esta etapa tan especial de mi vida. Esta tesis está hecha con mucho esfuerzo, muchas horas de dedicación y con mucho cariño, no solo míos sino de todas esas personas que han puesto su granito de arena y, a todas ellas, les doy las gracias de todo corazón.

En especial me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Francesc y Alba. En primer lugar, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, por la confianza que habéis depositado en mí, por toda la libertad que me habéis dado y por estar ahí cuando os he necesitado. Gracias por todo lo que me habéis aportado. Soy consciente de que no podría haber dado con mejores directores de tesis porque sois unos grandísimos profesionales y mejores personas.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todo el grupo LiBiFOOD, al que considero como mi segunda familia. He tenido una suerte enorme de realizar la tesis en un grupo con tanta calidad humana. Gracias a todos por involucraros tanto en los muestreos de esta tesis. Sobre todo, a mi compañera de aventuras y amiga Elisa, gracias por todos los momentos de risas que hemos vivido juntas y haberme hecho más llevaderos los momentos difíciles del doctorado. Todo resulta menos difícil cuando tienes a una persona tan empática y alegre a tu lado. Gracias por enseñarme tanto, por los debates científicos, los bailes y los abrazos. A Alicia que, aunque estuviste poco tiempo trabajando con nosotros, eres de esas personitas que dejan huella. Mil gracias por darme tantos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. También a Anna por todos los buenos ratos que hemos tenido compartiendo campana y poyata. A Bea por todos los cables que me has echado, tu comprensión y todos los buenos momentos que hemos compartido. A Berta por tu compañía, tu apoyo en los últimos ratitos de experimental que he tenido y por el gran esfuerzo que has hecho ayudando en los muestreos. A Stefania por toda la

ayuda y el apoyo que me has dado durante toda la tesis. A Magda por aportar toda tu experiencia con esa gran ilusión y entusiasmo.

Me siento muy afortunada de haber podido desarrollar la tesis doctoral en un proyecto multidisciplinar y haber podido aprender de todas las personas que han formado parte de él. Por ello, me gustaría dar las gracias al grupo SNIBA de la UAB por todo el trabajo invertido en el proyecto. En especial quiero agradecer a Gerard por toda su dedicación y esfuerzo en los tres estudios con animales que forman parte de nuestras tesis. A Roser y a David por toda vuestra ayuda y por los conocimientos que me habéis aportado. A Ana por tu cercanía y por el gran trabajo que has hecho coordinando el proyecto. Igualmente quiero agradecer al grupo AviFeed Science de la Universidad Cardenal Herrera por su colaboración y por el tiempo compartido. Gracias a María, por tu alegría, tu energía y positividad, he disfrutado mucho trabajando contigo en el laboratorio y me siento muy afortunada de haber podido conocerte y de compartir momentos contigo. A Carlos y a Mariola, por vuestra empatía, vuestra cercanía y por todas las cosas positivas que me habéis aportado a pesar de haber coincidido tan poquito. Quiero agradecer también a todo el personal de bonÀrea Agrupa por su colaboración en los estudios de pollos y cerdos.

Me gustaría dar las gracias a todas las personas del Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía. He tenido compañeros de doctorado increíbles que han hecho que los días eternos de experimental sean amenos y que me han ayudado a salir de los bloqueos. En especial a Fer, por todos los buenos ratos, por escucharme, comprenderme y aportar su positividad. A Salva por toda la alegría que desprendes y por tu naturalidad. A Héctor por transmitir esas buenas vibraciones y ayudarme a cambiar la perspectiva en algunas ocasiones. Gracias a Joan Bosch, Joan Sempere y Juan Pedro porque sin vosotros no podría haber hecho muchas de las cosas de la tesis, gracias por todas las facilidades que me habéis dado. A Fernando y a Celia por echarme un cable con tantas gestiones, sobre todo con el envío de las muestras a Italia. Y, por supuesto, gracias a Santi, por salvarme más de un día de experimental y por nuestras charlas amenas a primera hora de la mañana. Gracias también a todos los estudiantes que me han ayudado y a todas las personas que han participado en los análisis de aceptación sensorial de esta tesis.

Regarding the stay of my PhD, I am grateful to Sabrina for giving me the opportunity of working in the Department of Agri-Food, Environmental and Animal Sciences, University of Udine. I would like to thank Luca and Chiara for all the knowledge they have shared with me, for all the dedication and the time invested in helping me and for all the good moments we have shared. Also, I like to thank Erica for her help and for the time we spend together. For me it has been a pleasure to work with all of you, I have learned a lot and I believe that I couldn't have chosen a better place to do the stay of my PhD. *Grazie di cuore per tutto.*

En el plano personal, primero quiero agradecer el apoyo incondicional que siempre me ha dado mi familia, sobre todo mis padres y mi hermano. Mil gracias por apoyarme en la decisión de hacer esta tesis, aunque suponía alejarme de vosotros, por estar en los malos momentos y por darme fuerzas para seguir hasta el final. Gracias por todos los valores que me habéis enseñado y por todo el esfuerzo que habéis hecho para ayudarme a ser quien soy hoy. En segundo lugar, gracias a mis amigos de toda la vida por regalarme tantos buenos momentos y ser mi soporte en los momentos duros. En especial gracias a Sergio, por escucharme siempre que lo he necesitado, por estar siempre dispuesto a ayudar y por animarme. A Elena, por tu empatía, tu alegría y tu comprensión, gracias por esas largas conversaciones telefónicas cuando más se necesitaban. A Bea, por mostrarme tu apoyo, por estar ahí en los momentos difíciles y querer compartir los momentos bonitos conmigo. Agradezco enormemente a José que me animase a aceptar la oportunidad de iniciar este proyecto, que creyese en mí y que fortaleciese la confianza que tenía en mis capacidades para poder hacer esta tesis. Me siento muy afortunada de haber compartido parte de mi vida con una persona como tú. Gracias también a Alex, por hacerme vivir un cuento de hadas y por darme todas las facilidades del mundo al principio de nuestra relación.

-ABSTRACT-

Acid oils (AO) are by-products obtained from the neutralization step of the chemical refining of crude vegetable oils, which have a high energy value and are approved as feed ingredients in the European framework. Thus, AO can be an economical alternative to the oils and fats commonly used in animal feeding, which could increase their economic value and the sustainability of the food chain. However, the great variability in their composition may lead to variable animal productivity and quality of the meat or fish flesh obtained from animals fed with these by-products, which generates mistrust. Moreover, the information about its impact on the productive parameters of animals is scarce, whereas its effect on the quality of meat or fish flesh is even less studied. Therefore, the objective of this doctoral thesis is to evaluate the effect of the use of different AO in diets of different monogastric animals on lipid composition, lipid oxidation, color, and sensory acceptance of fresh fish fillet and meat, and after refrigeration under commercial conditions.

This doctoral thesis comprises three different studies, each of them performed with a different monogastric animal species: seabass, pigs, and chickens. In seabass diets, olive pomace AO and a mixture of soybean AO and sunflower AO were used as partial replacements for fish oil instead of crude olive pomace or soybean oils. In the studies with pigs and chickens, olive pomace AO was used, compared to the use of crude palm oil and crude or refined oil from olive pomace.

According to the results related to the lipid composition of fresh fish fillet and meat, the fatty acid profile depended only on the botanical origin of the lipid source used, whereas tocopherol and tocotrienol levels were influenced not only by the botanical origin of the lipid source but also by other feed ingredients, especially by the amount of α -tocopheryl acetate added to the diets in each study. Therefore, there was no observable effect on lipid composition attributable to the use of AO. Overall, lipid oxidation parameters were mainly influenced by the fatty acid profile of fish fillets and meat. Development of lipid oxidation was observed after the refrigeration under commercial conditions in all cases, but oxidative stability and α -tocopherol content only decreased in pork. The only scenario in which the use of an AO in animal diets produced a negative effect on lipid oxidation was in refrigerated pork. This could be due to the lower quality of this concrete AO in comparison to the one observed in the other AO used in this thesis and to the one commonly found for AO in the Spanish market. Also, the levels of α -tocopherol in pig diets might have been lower than the ones needed to efficiently prevent

-ABSTRACT-

the development of lipid oxidation during refrigeration, which might have allowed us to observe the negative impact of this AO in pork after the refrigeration. However, the use of this AO in pig diets did not produce any significant effect on meat color or overall acceptance. Regarding the color, there were changes in some or all the color parameters during the refrigeration of fish fillet and meat, but a more pronounced change was found in pork. Finally, sensory acceptance was not affected by the lipid source used in the diet or by refrigeration under commercial conditions.

The main conclusion of this thesis is that the use of AO with a similar quality to that commonly found in the Spanish market in animal feeding can allow the commercial production of fish fillets and meat with a similar lipid composition, lipid oxidation, and quality to the one obtain with crude or refined oils that have the same botanical origin. Moreover, AO with a lower quality than that commonly found in the Spanish market can be used in lower proportions (blended with crude fats or oils) in animal feeding without affecting the lipid oxidation or the quality of fish fillets and meat.

-RESUMEN-

Los aceites ácidos (AO, *Acid oil*) son subproductos procedentes de la etapa de neutralización de la refinación química de los aceites o grasas vegetales crudos, que presentan un gran valor energético y que están aprobados en el marco legal europeo como ingredientes para piensos. Por tanto, los AO pueden ser una alternativa más económica a los aceites y grasas empleados habitualmente en alimentación animal. Además, su uso como ingredientes en piensos para animales podría aumentar su valor económico y la sostenibilidad de la cadena alimentaria. A pesar de estas ventajas, existe cierta desconfianza en su uso en piensos debido a que la gran variabilidad en su composición puede conllevar resultados variables en los parámetros productivos de los animales y en la calidad del pescado y de la carne procedente de estos. Actualmente, existe poca información relativa a su repercusión sobre los parámetros productivos de animales y menos aún sobre la calidad del pescado o de la carne. Por tanto, el objetivo de esta tesis doctoral es evaluar el efecto del uso de distintos AO en dietas de diferentes animales monogástricos sobre la composición lipídica, la oxidación lipídica, el color y la aceptación sensorial del filete de pescado y de la carne frescos, y tras un periodo de refrigeración en condiciones comerciales.

Esta tesis doctoral consta de tres estudios diferentes, cada uno realizado con una especie de animal monogástrico distinta: lubinas, cerdos y pollos. En el estudio con lubinas se evaluó la sustitución parcial del aceite de pescado por dos AO con orígenes botánicos diferentes, que eran un AO de orujo de oliva y una mezcla de AO de soja y de girasol, en vez de realizar dicha sustitución por aceites crudos de orujo de oliva y de soja. En los estudios con cerdos y pollos se evaluó el empleo del AO de orujo de oliva, usando como controles la manteca de palma cruda y aceite de orujo de oliva, crudo o refinado.

Los resultados obtenidos sobre la composición lipídica del filete de pescado y la carne frescos mostraron que el perfil de ácidos grasos dependía únicamente del origen botánico de la fuente lipídica empleada en la dieta, mientras que para el contenido de tocoferoles y tocotrienoles se observó un efecto del origen botánico de la fuente lipídica y de otros ingredientes del pienso, especialmente de la concentración adicionada de acetato de α -tocoferilo. Por tanto, no se observó ningún efecto en la composición lipídica atribuible al uso de AO. Los parámetros de oxidación lipídica estaban influidos sobre todo por el perfil de ácidos grasos observado en el filete de pescado y la carne. La refrigeración en condiciones comerciales produjo un

-RESUMEN-

incremento de la oxidación lipídica en todos los casos, aunque la estabilidad oxidativa y el contenido de α -tocoferol solo disminuyó en carne de cerdo. El único escenario en el que un AO produjo un efecto negativo de la oxidación lipídica fue en la carne refrigerada de cerdo. Este efecto negativo puede deberse a la menor calidad de este AO en comparación con la observada en los demás AO empleados en esta tesis, que era similar a la habitualmente encontrada en AO adquiridos en el mercado español. Además, la concentración de α -tocoferol en las dietas de cerdo podría haber sido insuficiente para prevenir el avance de la oxidación lipídica de una manera efectiva en la carne, lo que podría haber permitido observar el efecto negativo de este AO tras la refrigeración. Sin embargo, el uso de este AO no afectó al color de la carne de cerdo ni a la aceptación sensorial. En términos de color, en todos los casos se produjeron modificaciones en varias o todas las coordenadas de color estudiadas durante la refrigeración, observando un cambio más pronunciado en la carne de cerdo. Por último, la aceptación sensorial no se vio afectada ni por la fuente lipídica empleada en la dieta ni por la refrigeración en condiciones comerciales.

La conclusión principal de la presente tesis doctoral es que el uso de AO con calidades similares a las habitualmente encontradas en el mercado español en alimentación de animales monogástricos puede permitir la producción en condiciones comerciales de filete de pescado y carne con una composición lipídica, oxidación lipídica y calidad similar a la observada con el empleo de aceites (crudos o refinados) con un mismo origen botánico. Además, los AO con una calidad inferior a la habitualmente encontrada en el mercado español pueden ser empleados en menores proporciones, es decir, formando parte de mezclas con grasas o aceites crudos, en alimentación animal, sin que exista una repercusión en la oxidación lipídica o en la calidad del filete de pescado y carne.

-LIST OF ABBREVIATIONS -

-LISTA DE ABREVIATURAS-

	-Meaning-	-Significado-
a*	<i>Redness (measure based on CIE L*a*b* color space)</i>	Coordenada rojo/verde (medido según el espacio de color CIE L*a*b*)
AO	<i>Acid oil</i>	Aceite ácido
b*	<i>Yellowness (measure based on CIE L*a*b* color space)</i>	Coordenada amarillo/azul (medido según el espacio de color CIE L*a*b*)
B	<i>Blend of crude palm oil and olive pomace acid oil at 50/50 (w/w)</i>	Mezcla de manteca de palma y aceite ácido de orujo de oliva al 50/50 (p/p)
CHP	<i>Cumene hydroperoxide</i>	Hidroperóxido de cumeno
DAG	<i>Diacylglycerol</i>	Diacilglicerol
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i>	Ácido docosahexaenoico
EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i>	Ácido eicosapentaenoico
FA	<i>Fatty acid</i>	Ácido graso
FFA	<i>Free fatty acid</i>	Ácido graso libre
FO	<i>Fish oil</i>	Aceite de pescado
FOX	<i>Ferrous oxidation-Xylenol orange method</i>	Método del naranja de xilenol
GC-FID	<i>Gas chromatography-Flame ionization detector</i>	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
HPLC-FLD	<i>High performance liquid chromatography-Fluorescence detector</i>	Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fluorescencia
HPLC-RID	<i>High performance liquid chromatography-Refractive index detector</i>	Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de índice de refracción
HS-SPME-GC-MS	<i>Headspace-Solid phase microextraction-Gas chromatography- Mass spectrometry</i>	Microextracción en fase sólida del espacio en cabeza en combinación con cromatografía de gases-espectrometría de masas
I	<i>Insoluble impurities</i>	Impurezas insolubles
L*	<i>Lightness (measure based on CIE L*a*b* color space)</i>	Luminosidad (medida según el espacio de color CIE L*a*b*)
n-3 LC-PUFA	<i>n-3 Long chain-Polyunsaturated fatty acid</i>	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga de la serie n-3
LHP	<i>Lipid hydroperoxide</i>	Hidroperóxido lipídico
M	<i>Moisture and volatile matter</i>	Humedad y materia volátil
MAG	<i>Monoacylglycerol</i>	Monoacilglicerol
MDA	<i>Malondialdehyde</i>	Malondialdehído

-LIST OF ABBREVIATIONS -

-LISTA DE ABREVIATURAS-

	-Meaning-	-Significado-
MIU	<i>Moisture and volatile matter + Insoluble impurities + Unsaponifiable matter</i>	Humedad y materia volátil + Impurezas insolubles + Materia insaponificable
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acid</i>	Ácido graso monoinsaturado
NC	<i>Not calculated</i>	No calculado
ND	<i>Not detected</i>	No detectado
OPAO	<i>Olive pomace acid oil</i>	Aceite ácido de orujo de oliva
OPO	<i>Crude olive pomace oil</i>	Aceite crudo de orujo de oliva
PO	<i>Crude palm oil</i>	Manteca de palma
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>	Ácido graso poliinsaturado
ROPO	<i>Refined olive pomace oil</i>	Aceite refinado de orujo de oliva
SO	<i>Crude soybean oil</i>	Aceite crudo de soja
SAO	<i>Soybean-sunflower (55:45; w/w) acid oil</i>	Aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p)
SFA	<i>Saturated fatty acid</i>	Ácido graso saturado
T	<i>Tocopherol</i>	Tocoferol
T3	<i>Tocotrienol</i>	Tocotrienol
T + T3	<i>Total sum of tocopherols and tocotrienols</i>	Suma total de tocoferoles y tocotrienoles
TAG	<i>Triacylglycerol</i>	Triacilglicerol
TBA	<i>2-Thiobarbituric acid</i>	Ácido 2-tiobarbitúrico
UFA	<i>Unsaturated fatty acid</i>	Ácido graso insaturado
U	<i>Unsaponifiable matter</i>	Materia insaponificable
ΔE	<i>Dimensionless parameter that compares the color of two objects considering the three color parameters (L*, a* and b*)</i>	Parámetro adimensional que permite comparar el color de dos objetos considerando los tres parámetros del color (L*, a* y b*)

1 Introducción 27

2 Antecedentes 7

2.1 Subproductos de la refinación de grasas y aceites vegetales comestibles 9

2.1.1 Procesos de refinación de grasas y aceites vegetales 9

2.1.2 Principales subproductos de la refinación de grasas y aceites vegetales comestibles 13

2.1.3 Industria del aceite de oliva y sus subproductos principales 17

2.2 Fuentes lipídicas empleadas en la alimentación de animales monogástricos 23

2.2.1 Importancia de las fuentes lipídicas en la alimentación de animales monogástricos 23

2.2.2 Uso de subproductos de origen vegetal en alimentación de animales monogástricos 32

2.3 Efecto de las grasas y aceites empleados en la alimentación de animales monogástricos sobre la calidad de la carne y el pescado 38

2.3.1 Modificación del perfil de ácidos grasos de la carne y del pescado 38

2.3.2 Oxidación lipídica en la carne y en el pescado 42

2.3.3 Alteración de las propiedades físico-químicas y organolépticas de la carne y del pescado 53

3 Research gaps, hypotheses and aims 59

3.1 Evaluation of lipid composition of fish fillet and meat 63

3.2 Evaluation of lipid oxidation and oxidative stability of fish fillet and meat 63

3.3 Evaluation of color and sensory acceptance of fish fillet and meat 64

4 Diseño experimental y metodología 65

4.1 Diseño experimental del estudio con lubinas 68

4.2 Diseño experimental del estudio con cerdos 71

4.3 Diseño experimental del estudio con pollos 74

4.4 Metodología analítica para la caracterización de las grasas 77

4.5 Metodología analítica para la caracterización de los piensos 79

4.6 Metodología analítica aplicada en filete de pescado y en carne 80

4.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos en filete de pescado y en carne 84

5 Scientific Publications 85

5.1 Scientific publication I 87

Effect of feeding acid oils on European seabass fillet lipid composition, oxidative stability, color and sensory acceptance

-Efecto de la alimentación con aceites ácidos sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de los filetes de lubina-

5.2 Scientific publication II 111

Effect of feeding olive pomace acid oil on pork lipid composition, oxidative stability, color and sensory acceptance

-Efecto de la alimentación con aceite ácido de orujo de oliva sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de carne de cerdo-

5.3 Scientific publication III 143

Effect of feeding olive pomace acid oil on dark chicken meat lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance

-Efecto de la alimentación con aceite ácido de orujo de oliva sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de la carne de pollo-

6 Discusión general de resultados 167

6.1 Composición de los aceites ácidos y de las otras fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos 169

6.2 Composición lipídica del filete de pescado y de la carne 180

6.3 Oxidación lipídica del filete de pescado y de la carne 188

6.4 Color y aceptación sensorial del filete de pescado y de la carne 199

6.5 Implicaciones de los resultados obtenidos en esta tesis y propuestas para futuros estudios en la línea de investigación tratada 209

7 Conclusions 213

8 Referencias 217

9 Anexos 239

Anexo I 241

-Información suplementaria de la publicación científica: Efecto de la alimentación con aceites ácidos sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de los filetes de lubina-

Anexo II 245

-Información suplementaria de la publicación científica: Efecto de la alimentación con aceite ácido de orujo de oliva sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de carne de cerdo-

Anexo III 253

-Información suplementaria de la publicación científica: Efecto de la alimentación con aceite ácido de orujo de oliva sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de la carne de pollo-

Anexo IV 262

-Ejemplo de optimización del método del naranja de xilenol: Optimización del método del naranja de xilenol para la determinación de la estabilidad oxidativa en los filetes de lubina frescos y refrigerados-

Anexo V 267

-Ejemplo de formulario de conformidad empleado en los análisis de aceptación sensorial-

Lista de figuras, excluyendo las empleadas en las publicaciones y en los anexos

Figura 2.1 Esquema de las etapas de los procesos de refinación química y de refinación física de grasas y aceites vegetales para consumo humano. 10

Figura 2.2 Etapas del proceso de obtención del aceite de oliva virgen, distinguiendo entre los tres procesos de separación sólido-líquido que han sido más comúnmente aplicados (prensado hidráulico, centrifugación de tres fases y centrifugación de dos fases). 18

Figura 2.3. Esquema comparativo de los tres procesos de separación sólido-líquido que han sido más comúnmente aplicados (prensado hidráulico, centrifugación de tres fases y centrifugación de dos fases). 19

Figura 2.4 Producción mundial de aceites vegetales. 27

Figura 2.5 Utilización y suministro mundiales de pescado. 29

Figura 2.6 Etapa de iniciación de la autooxidación lipídica. 43

Figura 2.7 Propagación de la autooxidación lipídica. 44

Figura 2.8 Interacciones entre radicales en la fase de finalización de la autooxidación lipídica. 44

Figura 2.9 Estados de oxidación de la mioglobina en la carne cruda. 54

Figura 4.1 Diseño experimental del estudio con lubinas: fuentes lipídicas empleadas, tratamientos dietéticos elaborados a partir de las fuentes lipídicas y esquema temporal. 69

Figura 4.2 Sistemática seguida para generar cada una de las réplicas experimentales dentro de cada tratamiento dietético y para preparar y procesar las muestras de filete de lubina frescas y refrigeradas. 70

Figura 4.3 Diseño experimental del estudio con cerdos: fuentes lipídicas empleadas, tratamientos dietéticos, dietas basales utilizadas en la elaboración de piensos, piensos elaborados y esquema temporal. 72

Figura 4.4. Sistemática seguida para generar cada réplica experimental dentro de un mismo tratamiento dietético a partir de cerdos del mismo sexo y para preparar y procesar las muestras de lomo de cerdo frescas y refrigeradas. 73

Figura 4.5 Diseño experimental del estudio con pollos: fuentes lipídicas empleadas, tratamientos dietéticos, dietas basales utilizadas en la elaboración de piensos, piensos utilizados y esquema temporal. 75

Figura 4.6 Sistemática seguida para generar cada réplica experimental dentro de un mismo tratamiento dietético a partir de pollos hembra de un mismo corral y para preparar y procesar las muestras de carne de pollo frescas y refrigeradas. 76

Figura 6.1 Valor de MIU de las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos. 170

Figura 6.2 Perfil de ácidos grasos de las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos. 172

Figura 6.3 Composición en tocoferoles y tocotrienoles de las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos. 174

Figura 6.4 Composición en clases lipídicas de las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos. 176

Figura 6.5 Perfil de ácidos grasos del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio. 181

Figura 6.6 Composición en tocoferoles y tocotrienoles del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio. 184

Figura 6.7 Estabilidad oxidativa o valor final de hidroperóxidos lipídicos de los filetes de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco (I) y tras la refrigeración en condiciones comerciales (II). 189

Figura 6.8 Valores del índice del ácido 2-tiobarbitúrico del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco (I) y tras la refrigeración en condiciones comerciales (II). 191

Figura 6.9 Resumen de los compuestos volátiles identificados en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio. 194

Figura 6.10 Concentración de hexanal y 1-octen-3-ol del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco y tras la refrigeración en condiciones comerciales. 195

Figura 6.11. Parámetros del color medidos en el espacio CIE L*a*b* del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco y tras la refrigeración en condiciones comerciales. 200

Figura 6.12 Resultados de los test hedónicos realizados para evaluar la aceptación sensorial del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco y tras la refrigeración en condiciones comerciales. 206

Lista de tablas, excluyendo las empleadas en las publicaciones y en los anexos

Tabla 2.1 Características composicionales de los orujos de oliva/aperujo procedentes de los diferentes procesos de separación antes de ser sometidos al proceso de secado previo a la extracción del aceite crudo de orujo de oliva. 20

Tabla 2.2 Porcentajes máximos de incorporación de fuentes lipídicas en piensos para pollo y cerdo. 28

Tabla 2.3 Porcentajes máximos recomendados para la incorporación de algunos aceites ácidos y ácidos grasos destilados de origen vegetal en piensos para pollo y cerdo 35

Tabla 4.1 Resumen de la metodología analítica seguida para la caracterización de las diferentes fuentes lipídicas empleadas en esta tesis. 77

Tabla 4.2 Volumen de extracto metanólico de muestra empleado en la reacción colorimétrica con el naranja de xilenol y tiempo de incubación al que se realizó la medida de la estabilidad oxidativa en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo. 81

Tabla 4.3 Relación considerada entre los valores de ΔE obtenidos a partir de las coordenadas de color del espacio CIE $L^*a^*b^*$ y la posible perceptibilidad por el ojo humano de los cambios de color en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo. 83

Tabla 4.4 Especificaciones sobre la evaluación de la aceptación sensorial del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo: tipo y cantidad de muestra evaluada y tiempo de cocción aplicado. 84

Tabla 6.1 Parámetros de oxidación primaria (índice de peróxidos) y secundaria (índice de *p*-anisidina) de las diferentes fuentes lipídicas empleadas en esta tesis. 178

Tabla 6.2 Valor relativo del índice de TBA obtenido en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo tras la refrigeración en condiciones comerciales con respecto al obtenido en las correspondientes muestras frescas. 193

1 INTRODUCCIÓN



Los lípidos son macronutrientes relevantes en la alimentación desde el inicio de los tiempos, desempeñando un papel fundamental en la evolución del ser humano. Sin embargo, el tipo de lípidos y la manera de consumirlos ha ido cambiando con el paso del tiempo. En el paleolítico, las principales fuentes de lípidos consumidas por los homínidos eran las naturalmente presentes en alimentos de origen vegetal, como frutas, semillas, tubérculos o nueces (Roccisano et al., 2016). Esta dieta aseguraba el aporte de ácidos grasos (FA; *Fatty acid*) esenciales para el ser humano. Los FA esenciales son aquellos que deben ser aportados por la dieta puesto que no pueden ser sintetizados por el organismo y son indispensables para el correcto funcionamiento del mismo. Los FA esenciales para el ser humano son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; *Polyunsaturated fatty acid*) linoleico (C18:2 n-6) y linolénico (C18:3 n-3) (Chang et al., 2009). En la dieta de algunas especies de homínidos existía ya un mínimo de alimentos de origen animal que, además de proporcionar proteínas, complementaban el aporte lipídico de origen vegetal. Así, el consumo de alimentos animales de origen marino, como el pescado, introdujo en la dieta ciertos FA que facilitaron el desarrollo neurológico producido durante la evolución humana (Haag, 2003; Chang et al., 2009). Estos FA son el ácido eicosapentaenoico (EPA; *Eicosapentaenoic acid*, C20:5 n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA; *Docosahexaenoic acid*, C22:6 n-3), ambos PUFA de cadena larga de la serie n-3 (n-3 LC-PUFA; *n-3 Long chain-Polyunsaturated fatty acid*). El consumo de carne también ha desempeñado un papel relevante en la evolución del ser humano, ya que ha producido modificaciones en la morfología humana (peso, forma de las mandíbulas, cambios en el tracto intestinal, etc.) (Baltic y Boskovic, 2015).

Uno de los cambios que marcó una gran diferencia en el consumo de lípidos por parte del ser humano fue la aparición de sociedades sedentarias durante la Revolución Neolítica, que focalizaron su atención en la agricultura (Roccisano et al., 2016). La estabilidad que proporcionaba el estilo de vida sedentario permitió el descubrimiento de métodos de extracción de aceites y la identificación de aquellos aceites cuyo consumo era seguro. Ciertos hallazgos históricos, que datan de los años 6.000 – 4.000 A.C, han revelado que los aceites de oliva, de palma y de coco fueron de los primeros aceites vegetales en ser preparados para su consumo (Namdar et al., 2015; Roccisano et al., 2016). Estos aceites han sido los predominantes en el consumo humano a lo largo de la historia y presentan elevadas proporciones de ácidos grasos saturados (SFA; *Saturated fatty acid*) y/o ácidos grasos monoinsaturados

(MUFA *Monounsaturated fatty acid*). Por tanto, la introducción de estos aceites en la dieta humana supuso un incremento en el aporte de SFA y MUFA. Sin embargo, el aceite de soja no se empezó a utilizar hasta el año 1.000 D.C en la región de China y, posiblemente, Japón (Roccisano et al., 2016).

También durante la Revolución Neolítica, se desarrollaron de manera espontánea las primeras técnicas de cría de animales, que permitieron crear un suministro estable de alimentos de origen animal (Coffey et al., 2016). Con el crecimiento de la población y la urbanización de las sociedades se incorporaron los conceptos de productividad y eficacia en la obtención de alimentos. En el caso de la producción de carne, el interés se centró en el diseño de dietas nutricionalmente equilibradas, naciendo con ello una industria de elaboración de piensos en constante evolución. A mediados del siglo XIX, se había demostrado que una dieta nutricionalmente equilibrada debía incluir proteínas y almidones en una proporción adecuada para incrementar la calidad de la carne, la leche y los huevos (Coffey et al., 2016). Por otro lado, el empleo de grasas o aceites en la formulación de las dietas para animales ha sido una práctica habitual desde un inicio, entre otros motivos, por su elevado aporte energético. Por ejemplo, en los primeros piensos se incluían ya tortas de aceites como fuentes lipídicas (Coffey et al., 2016). Con la industrialización de los diferentes sectores, una gran variedad de subproductos o coproductos se abrieron paso en la alimentación animal, como fue el caso de las grasas animales procedentes de la industria cárnica. Sin embargo, tras la crisis generada por la encefalopatía espongiforme bovina (1996), asociada a la inclusión de harina de carne y huesos de mamíferos en piensos para rumiantes, se restringió el uso de subproductos y/o coproductos de origen animal en la elaboración de piensos dentro de la Unión Europea (EU, 2001). Como consecuencia, la fabricación de piensos empezó a ser altamente dependiente de la importación de materias primas vegetales para mantener el suministro de carne, leche y huevos en la Unión Europea. De hecho, en la actualidad más de la mitad de la producción de semillas oleaginosas ($\approx 57\%$) se destina a la elaboración de piensos para animales (Heinrich Böll Foundation et al., 2021).

La tendencia exponencial actual del crecimiento demográfico ha implicado un incremento en la demanda de alimentos de origen animal (Prache et al., 2022), a la que deben dar respuesta las industrias cárnica y acuícola. Por lo tanto, ambos sectores siguen focalizados en maximizar la eficacia de producción de alimentos. Asimismo, la preocupación por el

detrimento medioambiental hace que uno de los objetivos prioritarios de la producción de carne y de pescado sea mejorar su sostenibilidad (Saka et al., 2021). Una opción interesante que permitiría aumentar la sostenibilidad de la cadena alimentaria consiste en el empleo de piensos elaborados con subproductos procedentes de la refinación de aceites vegetales, como es el caso de los aceites ácidos (AO; *Acid oil*), que proceden de la refinación química y son el objeto de estudio de esta tesis doctoral. De la misma manera, el aumento del conocimiento acerca de las implicaciones del consumo de diferentes tipos de FA sobre la salud humana ha provocado una demanda de alimentos más saludables por parte de la sociedad (Teixeira y Rodrigues, 2021). Como respuesta a dicha demanda, se han realizado un gran número de estudios científicos focalizados en la modificación del perfil lipídico, sobre todo de carne procedente de animales monogástricos alimentados con piensos que contienen diferentes grasas o aceites. Sin embargo, existe muy poca información acerca del impacto de la suplementación de piensos con AO sobre la calidad de la carne o del pescado. Por tanto, para poder potenciar el uso de estos subproductos en las dietas de animales monogástricos, es indispensable evaluar el efecto sobre la calidad de la carne y el pescado producidos en condiciones comerciales, que es el objetivo principal de esta tesis.

2 ANTECEDENTES



2.1 Subproductos de la refinación de grasas y aceites vegetales comestibles

2.1.1 Procesos de refinación de grasas y aceites vegetales

La composición de las grasas y los aceites de origen vegetal varía en función del origen botánico, las condiciones ambientales y el método de extracción, pero el componente mayoritario siempre son los FA en forma de triacilgliceroles (TAG; *Triacylglycerol*). Un pequeño porcentaje de los FA puede encontrarse también en otras formas, como por ejemplo en diacilgliceroles (DAG; *Diacylglycerol*), monoacilgliceroles (MAG; *Monoacylglycerol*), fosfolípidos o ácidos grasos libres (FFA; *Free fatty acid*). Además de FA, las grasas y aceites vegetales crudos pueden contener materia insaponificable (U; *Unsaponifiable matter*) en proporciones variables desde niveles inferiores o iguales a 1 g hasta 6,5 g por cada 100 g (Codex Alimentarius, 1999). La fracción U incluye componentes apolares como tocoferoles (T; *Tocopherol*), tocotrienoles (T3; *Tocotrienol*), carotenoides, escualeno, alcoholes grasos y esteroides (Fontanel, 2013). Algunos de los compuestos naturalmente presentes en las grasas y aceites de origen vegetal poseen un efecto positivo sobre la calidad de la fuente lipídica en cuestión, como es el caso de los TAG, los T y T3, otros compuestos fenólicos o los fitoesteroides. Sin embargo, existen otras sustancias en la composición de este tipo de las grasas y aceites crudos, como los FFA, compuestos procedentes de la oxidación lipídica, iones metálicos o fosfolípidos, que producen un detrimento de su calidad y que deben ser eliminados mediante procesos de refinación.

Inicialmente, los primeros métodos de refinación de grasas y aceites crudos se centraban únicamente en disminuir el contenido de FFA (Čmolík y Pokorný, 2000), ya que un alto grado de acidez ha sido siempre relacionado con la alteración de sus propiedades. Los FFA presentes en las grasas y los aceites crudos se generan mayoritariamente tras la recolección de la materia prima mediante la hidrólisis de los TAG por la acción de lipasas (Vaisali et al., 2015). Sin embargo, hoy en día los objetivos de la refinación de grasas y aceites crudos contemplan eliminar todas las sustancias que puedan alterar la estabilidad del aceite final y optimizar las propiedades organolépticas del mismo, minimizando las pérdidas de aquellos compuestos que mejoran su calidad y evitando la formación de nuevos compuestos no deseados (Vaisali et al., 2015; Chew y Nyam, 2020). Actualmente la mayoría de los aceites vegetales consumidos son previamente refinados, siendo una excepción notable el aceite de oliva virgen (Čmolík y Pokorný, 2000). Los dos procesos

más empleados industrialmente para la refinación de grasas y aceites vegetales son la refinación química y la refinación física.

Considerando las etapas que constituyen cada tipo de refinación (Figura 2.1), la mayor diferencia reside en el proceso empleado para eliminar los FFA presentes en la grasa o el aceite crudo. Por un lado, en la refinación química, los FFA se eliminan durante la neutralización mediante la adición de una base en exceso, normalmente hidróxido de sodio, generando pastas jabonosas (denominadas en inglés *soapstocks*). Estas pastas jabonosas son separadas del aceite neutralizado tras un proceso de centrifugación y, dicho aceite se lava con agua para eliminar los posibles residuos de jabón (Greyt, 2013; Chew y Nyam, 2020). Por otro lado, en la refinación física la eliminación de los FFA se lleva a cabo simultáneamente con la eliminación de sustancias aromáticas en la etapa de desodorización. La desodorización se basa en una destilación al vapor realizada a temperaturas elevadas y alto vacío, que permite la separación de las sustancias no deseadas del aceite en función de su presión de vapor y volatilidad.

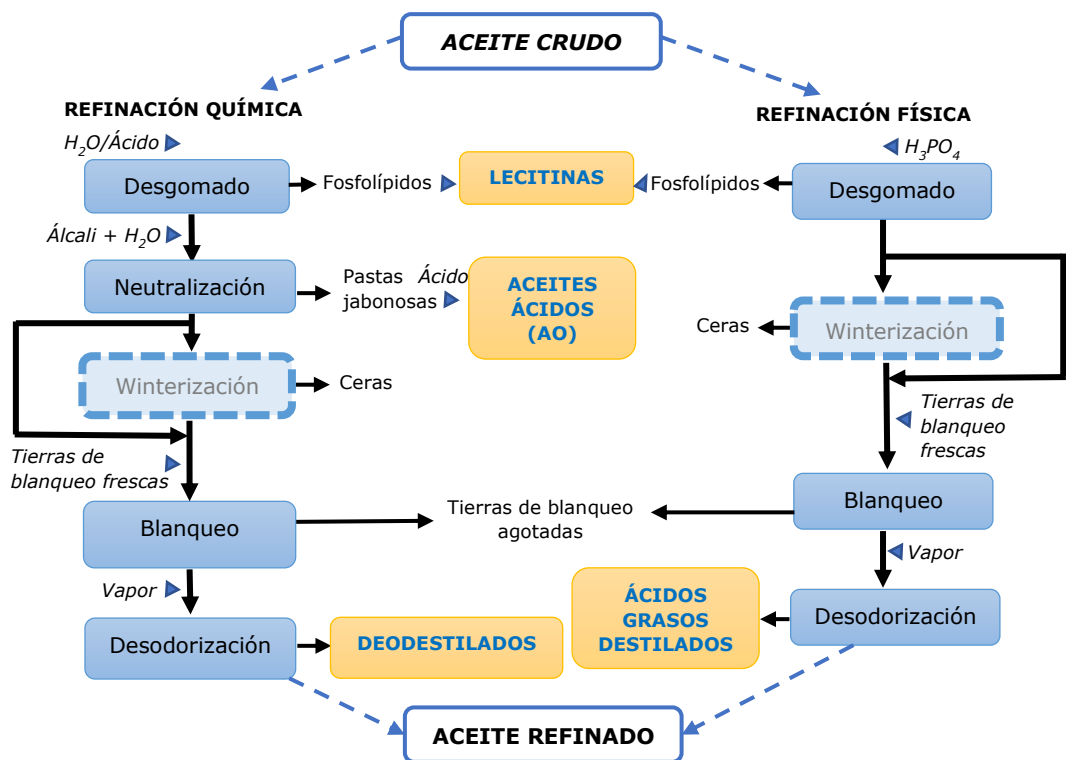


Figura 2.1 Esquema de las etapas de los procesos de refinación química y de refinación física de grasas y aceites vegetales para consumo humano.

Los correspondientes subproductos principales se encuentran enmarcados en amarillo. Este esquema está adaptado de FEDIOL (2020); Zio et al. (2020).

De esta manera, ambos procesos de refinación suelen comenzar con una fase de desgomado, cuyo objetivo principal es minimizar el contenido de fosfolípidos presentes en la grasa o el aceite. La necesidad de eliminar los fosfolípidos se debe fundamentalmente a dos razones (Chew y Nyam, 2020). Por una parte, las propiedades emulsionantes de los fosfolípidos pueden causar dificultades en las siguientes etapas del proceso de refinación. Por otra parte, los fosfolípidos son compuestos que poseen una gran tendencia a la autooxidación y, a temperaturas elevadas (como las aplicadas en el proceso de desodorización), los aldehídos producidos por la autooxidación pueden reaccionar con los grupos amino de los fosfolípidos, formando compuestos coloreados (melanofosfátidos) (Chew y Nyam, 2020). Existen diversos métodos para realizar el desgomado, pero los más comunes son la adición de agua o de un ácido, normalmente ácido fosfórico. Con el uso de agua se consigue eliminar aquellos fosfolípidos fácilmente hidratables en forma de gomas, mientras que utilizando un ácido se logra eliminar aquellos que no son fácilmente hidratables en forma de sales de calcio o magnesio de ácido fosfatídico. En ambos casos, los productos que contienen los fosfolípidos se separan de la grasa o el aceite desgomado por centrifugación (Greyt, 2013). Durante el proceso de desgomado también se eliminan trazas de metales, sustancias mucilaginosas (Greyt, 2013; Chew y Nyam, 2020) y, posiblemente, partículas de semillas, impurezas, carbohidratos y proteínas residuales (FEDIOL, 2020).

Otra etapa de la refinación química es la ya comentada neutralización, en la que se eliminan, además de FFA, algunos fosfolípidos, pigmentos, ceras, trazas de metales, productos de oxidación y carbohidratos (Chew y Nyam, 2020; FEDIOL, 2020). En la industria del aceite de oliva, la eliminación de fosfolípidos se suele integrar directamente en la etapa de neutralización, adicionando ácido fosfórico o cítrico de manera previa al uso de la base (Antonopoulos et al., 2006). El aceite neutralizado de la refinación química se puede someter a un proceso de winterización, que correspondería a la segunda etapa en el proceso de refinación física (Figura 2.1). Esta etapa es opcional y se lleva a cabo con la finalidad de eliminar ceras presentes en la grasa o aceite crudo para reducir la turbidez del aceite refinado y mejorar su apariencia (Chew y Nyam, 2020). La siguiente fase en los dos procesos de refinación es el blanqueo, cuyo objetivo es disminuir la cantidad de pigmentos no deseados, incluyendo clorofilas y carotenoides, presentes inicialmente en la grasa o el aceite crudo. Esto se consigue mediante el uso de materiales adsorbentes como las tierras de blanqueo, que son las más comunes, el

carbón activo o sus mezclas. El contacto del aceite o grasa con el adsorbente se realiza en condiciones de vacío parcial o total, consiguiendo eliminar también productos de oxidación, iones metálicos, pastas jabonosas residuales y fosfolípidos residuales (Chew y Nyam, 2020; FEDIOL, 2020). Una vez adsorbidas estas sustancias en las tierras de blanqueo o en el material adsorbente empleado, se separan de la grasa o el aceite mediante filtración.

La última fase de los dos procesos de refinación es la desodorización, que como ya se ha comentado, consiste en una destilación realizada a altas temperaturas y en condiciones de vacío. Sin embargo, las condiciones de temperatura, presión, cantidad de vapor empleado y tiempo se deben fijar en función de la calidad de la grasa o el aceite blanqueado para lograr una calidad adecuada en el aceite refinado (Čmolík y Pokorný, 2000). Es decir, en la refinación química se puede realizar una desodorización más suave que en el caso de la refinación física, ya que en la primera una gran parte de los FFA ha sido previamente eliminada en el proceso de neutralización. Algunas de las desventajas del proceso de desodorización son la posible aparición de productos de oxidación lipídica, la polimerización de TAG, la formación de FA *trans* o la pérdida de compuestos bioactivos pertenecientes a la fracción U, DAG o MAG (Verhé et al., 2006; Naz et al., 2014). Una medida para evitar las reacciones de oxidación y polimerización es la eliminación del oxígeno del recipiente, que se realiza siempre de manera previa al aumento de temperatura (Chew y Nyam, 2020). La pérdida de compuestos deseables se puede deber a su degradación por las elevadas temperaturas o porque se destilen junto a las sustancias no deseadas, concentrándose en los subproductos destilados (Naz et al., 2014). Durante el proceso de desodorización se produce también la destrucción térmica de algunos pigmentos que hayan podido quedar remanentes en la grasa o el aceite tras la etapa de blanqueo (Greyt, 2013).

Tal y como se ha comentado en el párrafo anterior, las condiciones aplicadas en el proceso de desodorización suelen ser más agresivas en la refinación física que en la química, llegando a alcanzar temperaturas de 220 – 270°C en condiciones de alto vacío (0,5 – 8,0 mbar) (Čmolík y Pokorný, 2000; FEDIOL, 2020; Zio et al., 2020). Teniendo en cuenta las desventajas de la desodorización ya comentadas, la refinación física es aconsejable básicamente cuando la grasa o el aceite crudo posee una alta estabilidad oxidativa, restringiendo su aplicación principalmente a fuentes lipídicas con alto contenido en SFA. Por su parte, la refinación química requiere más etapas

(Figura 2.1), genera una mayor cantidad de subproductos e implica una mayor pérdida de aceite, sobre todo cuando la grasa o el aceite crudo posee un elevado contenido de FFA y/o de fosfolípidos. A pesar de estas desventajas, existe una preferencia por la refinación química frente a la física, lo que se debe a la mayor versatilidad de la primera, ya que se puede aplicar a cualquier tipo de fuente lipídica vegetal.

2.1.2 Principales subproductos de la refinación de grasas y aceites vegetales comestibles

Los principales subproductos procedentes del proceso de refinación química son las lecitinas, los AO y los deodestilados, mientras que los procedentes de la refinación física son las lecitinas y los FA destilados (Figura 2.1).

Las lecitinas se generan a partir del secado de los fosfolípidos eliminados en la etapa de desgomado. Por tanto, los principales componentes de estos subproductos son fosfolípidos ($\approx 70\%$), concretamente la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol (Greyt, 2013; Wendel, 2014; List, 2015). Las lecitinas presentan una fracción de agua y aceite en las que contienen sustancias minoritarias, como FA, TAG, esteroides, carbohidratos y glicolípidos. La cantidad de lecitinas producidas durante la refinación de grasas y aceites depende de la proporción de fosfolípidos que posea el aceite crudo inicial. Por ejemplo, los aceites crudos de soja (SO, *crude soybean oil*), colza y girasol presentan una fracción de fosfolípidos entre 1,0 – 2,5%, mientras que la manteca cruda de palma (PO, *crude palm oil*) presenta cantidades muy bajas o incluso no detectables de fosfolípidos (Chew y Nyam, 2020). De manera previa a la utilización de las lecitinas se suele realizar un tratamiento para lograr que su composición sea la más adecuada para la aplicación en cuestión. Este tratamiento puede incluir una purificación, realizada para eliminar los carbohidratos, proteínas e impurezas procedentes del aceite crudo (Pickard et al., 2020), etapas de hidratación, de aislamiento de fosfolípidos mediante centrifugación, secado, fluidificación, etc. (List, 2015).

Las lecitinas presentan un gran rango de aplicaciones en diferentes sectores que se deben, fundamentalmente, al carácter anfipático de los fosfolípidos. Esto hace que sean un subproducto de la refinación de grasas y aceites altamente revalorizado (Greyt, 2013; Chew y Nyam, 2020). En la industria alimentaria las lecitinas son ampliamente empleadas como

emulsionantes en productos con un elevado contenido en grasas y aceites, como por ejemplo en margarinas, productos horneados, chocolate, coberturas de confitería o mantequilla de cacahuete (Wendel, 2014). En la industria farmacéutica las lecitinas son también comúnmente utilizadas, tanto como principios activos como con función de excipientes. Un ejemplo es su uso como fuente de fosfatidilcolina, que es necesaria en los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo del colesterol y en la síntesis del neurotransmisor acetilcolina cerebral (Wendel, 2014). Otras de sus posibles aplicaciones son en la industria cosmética, en la fabricación de pinturas, como aditivos en combustibles, en la formulación de fertilizantes o insecticidas y en la fabricación de plásticos y elastómeros (Wendel, 2014; Pickard et al., 2020). Por último, las lecitinas poseen una gran relevancia en el sector de la alimentación animal, que se describirá en profundidad en el apartado 2.2.2.

Los AO son subproductos procedentes de la acidificación de las pastas jabonosas obtenidas tras la neutralización de la grasa o el aceite crudo (Figura 2.1). Normalmente esta acidificación se realiza con ácido sulfúrico y los AO formados se separan del agua por gravedad o por centrifugación (Greyt, 2013). La cantidad de pastas jabonosas y, por lo tanto, de AO que se genera depende en gran medida de las características de la grasa o el aceite crudo, concretamente de su contenido en FFA, fosfolípidos e impurezas (Pickard et al., 2020). De manera general, las pastas jabonosas producidas en la refinación química suponen un 6% de la cantidad de la grasa o aceite crudos de partida (Piloto-Rodríguez et al., 2014). El principal componente de las pastas jabonosas y de los AO son los FA, encontrando una gran parte de ellos en forma de FFA. Así, los FFA suelen representar un 10% del peso húmedo de las primeras en forma de jabones (Dumont y Narine, 2007) y un 32 – 65% de la composición lipídica de los AO (Varona et al., 2021a). Los AO pueden contener como compuestos minoritarios otras sustancias eliminadas también en la neutralización (fosfolípidos, pigmentos, etc.). Una parte de la pérdida de aceite neutro que se produce durante la etapa de neutralización se debe a su oclusión en las pastas jabonosas, pudiendo llegar a suponer hasta un 50% del peso de estas (Bhosle y Subramanian, 2005). Esto implica que una proporción de compuestos que son deseables para la calidad del aceite refinado final pueden acabar en los AO, como los TAG o algunas sustancias bioactivas pertenecientes a la fracción U (escualeno, fitoesteroles, T, T3, etc.). Por tanto, la composición de los AO es altamente variable ya que depende de la composición y de la calidad de la grasa y aceite crudo inicial, de la eficacia

del proceso de desgomado previo a la neutralización y de la cantidad de grasa o aceite neutro retenido en las pastas jabonosas. Otro factor que puede incrementar la variabilidad de la composición de los AO es que, en ocasiones, son obtenidos a partir de mezclas de pastas jabonosas procedentes de diferentes grasas o aceites crudos procesados en la misma refinería y que son vertidos a un mismo tanque de recogida. Además, el desconocimiento de la proporción de estas mezclas de subproductos hace que su composición sea aproximada o desconocida. Esta variabilidad de composición y la falta de conocimiento sobre la misma puede limitar las aplicaciones de estos subproductos.

Los AO han sido considerados como subproductos con un bajo valor económico y su eliminación como residuos es problemática desde el punto de vista medioambiental (García-Zapateiro et al., 2013; Piloto-Rodríguez et al., 2014). Las posibles aplicaciones de los AO son bastante más reducidas que en el caso de las lecitinas y se deben sobre todo a la gran proporción de FA que poseen. Algunos de los usos industriales de los AO son en la limpieza, bruñido y pulido de metales, en la lubricación, desmoldeo y teñido de textiles, en flotación de minerales, en resinas alquídicas y en productos de fundición (Woerfel, 1981). Los AO se han empleado en el crecimiento de microorganismos, en la producción de lipasa y como fuente de carbono para la obtención de levadura productora de carotenoides (Patra y Duary, 2020). Estos subproductos han sido utilizados también en la fabricación de jabones, biosurfactantes, biolubricantes y biodiésel (García-Zapateiro et al., 2010; Partovi et al., 2013; Piloto-Rodríguez et al., 2014). Sin embargo, en términos de sostenibilidad, la aplicación más interesante de los AO es en el sector de la alimentación animal, tal y como se verá en el apartado 2.2.2.

Los deodestilados son el último subproducto principal que se obtiene en la refinación química, concretamente en la etapa de desodorización (Figura 2.1). Los deodestilados contienen productos de oxidación secundaria volátiles, hidrocarburos y otros tipos de contaminantes. Sin embargo, también poseen compuestos bioactivos que presentan una presión de vapor elevada, como es el caso de los T, T3 y esteroides (Verhé, 2004; Matthäus, 2016). Al igual que las lecitinas y los AO, la composición de los deodestilados depende de las características de la grasa o el aceite crudo, de la eficacia de las etapas anteriores del proceso de refinación química y de las condiciones en las que se lleve a cabo la desodorización. En general, en los deodestilados es posible encontrar T en proporciones del 9,2 – 15,0% y fitoesteroides en porcentajes del

9,0 – 17,6% (Verhé et al., 2006). Los deodestilados también pueden contener en pequeñas cantidades DAG, MAG y FFA.

El interés actual de los deodestilados se restringe al contenido en esteroides y T, que deben ser aislados y purificados de manera previa a su utilización. El esteroide más abundante en fuentes de origen vegetal es, con diferencia, el β -sitosterol, seguido del campesterol, el estigmasterol y el $\Delta 5$ -avenasterol (Abidi, 2001). Todos estos esteroides se emplean como materias primas en la industria farmacéutica para distintas aplicaciones como la síntesis de corticoesteroides, hormonas o como agentes inhibidores de la absorción de colesterol (Verhé, 2004; Pawar y Marathe, 2015). Además, el uso de los fitoesteroides ha incrementado en las últimas décadas debido a la capacidad de reducir los niveles de colesterol, llegando a incorporarse en la elaboración de algunos productos alimenticios, como las margarinas (Kovari et al., 2000). Sin embargo, las aplicaciones que pueden aumentar el valor de los deodestilados se basan en la importancia de los T y T3, ya que son compuestos con actividad vitamínica (vitamina E) y propiedades antioxidantes (Verhé, 2004). Así, gran parte de las aplicaciones de los deodestilados dependen de su composición en T y T3, que está ligada a la del aceite crudo. Por ejemplo, estos compuestos se emplean como agentes antioxidantes y/o por su actividad vitamínica en diferentes sectores, como en el de la cosmética o de la alimentación (Shahidi y de Camargo, 2016; Fiume et al., 2018). Aunque los T y T3 se pueden sintetizar a partir de petroquímicos, existe una preferencia por las fuentes naturales, como los presentes en deodestilados, debido a su mayor actividad biológica. Generalmente los T y T3 están considerados como sustancias seguras, por lo que se suelen emplear ampliamente en la industria alimentaria, tanto adicionados al alimento como formando parte de los envases. Además, estos compuestos bioactivos son empleados incluso en grasas y aceites (sobre todo de origen marino) para mejorar su estabilidad oxidativa.

En la refinación física, los principales subproductos obtenidos son los FA destilados (Figura 2.1). Los FA destilados son producidos en la etapa de desodorización, por lo que presentan las mismas sustancias que los deodestilados obtenidos en la refinación química, pero en proporciones diferentes. El principal componente de los FA destilados son los FFA, que suponen un 76,2 – 83,6%, mientras que los T (1,4 – 4,3%) y fitoesteroides (1,8 – 6,9%) se encuentran en proporciones mucho menores que en los deodestilados (Verhé et al., 2006). La composición de estos subproductos es

muy variable, ya que depende del origen y calidad de la grasa o aceite inicial, de la eficacia de las etapas de desgomado y blanqueo, del equipo de procesado y de las condiciones en las que se realice la etapa de desodorización. Además, al igual que en el caso de los AO, es posible encontrar mezclas de FA destilados procedentes de la refinación física de diferentes grasas o aceites crudos.

Al igual que en el caso de los deodestilados procedentes de la refinación química, la fracción U de los FA destilados es considerada una fuente potencial de fitoquímicos de gran valor (Piloto-Rodríguez et al., 2014). Sin embargo, el contenido en sustancias bioactivas de interés comercial, como los esteroides o los T y T3, es inferior en los FA destilados. Esto hace que la mayoría de las aplicaciones de estos subproductos se basen en su empleo como fuentes lipídicas, dado su elevado contenido en FFA. Así, pueden ser utilizados para la producción de biodiesel, igual que los AO, o en la fabricación de distintos productos de limpieza, como jabones empleados en lavandería, en limpieza en seco o líquidos limpiadores para coches (Dumont y Narine, 2007; Piloto-Rodríguez et al., 2014). Estos subproductos también son utilizados en la producción de velas, artículos de aseo y cosméticos, en la elaboración de alimentos como agentes emulsionantes, en el procesado del caucho y en las industrias de sabores y fragancias (Tay et al., 2009). Por último, los FA destilados también son subproductos con gran interés en el campo de la alimentación animal (apartado 2.2.2).

2.1.3 Industria del aceite de oliva y sus subproductos principales

La industria del aceite de oliva y sus subproductos requieren una atención especial, puesto que el aceite de oliva es una de las fuentes lipídicas comúnmente consumidas en la dieta humana, sobre todo en la zona mediterránea. De hecho, la Unión Europea es el principal productor de aceite de oliva a nivel mundial, cubriendo un 67% de los tres millones de toneladas producidos mundialmente, según el balance provisional de la temporada 2021 – 2022 (IOC, 2022). Dentro de la Unión Europea, en la última campaña, la mayor producción de aceite de oliva se ha realizado en España (66%), seguido de Italia (14%), Grecia (10%), y Portugal (9%) (IOC, 2022). No obstante, durante la producción del aceite de oliva se generan subproductos en cantidades hasta cuatro veces superiores al aceite de oliva obtenido (Khdair y Abu-Rumman, 2020). Estos subproductos pueden suponer un problema medioambiental en las regiones del mediterráneo, puesto que algunos de ellos están considerados como fitotóxicos debido a su elevado contenido en polifenoles (Roig et al., 2006; Malapert et al., 2017). Al mismo tiempo, los

polifenoles y otros compuestos bioactivos presentes en estos subproductos hacen que sean interesantes para diferentes sectores. Los subproductos principales de la industria del aceite de oliva son las hojas de aceituna, el orujo de oliva y las aguas residuales de almazara, conocidas como alpechín en castellano y *oil mill waste water* en inglés. Los subproductos obtenidos y su composición van a depender del proceso de producción del aceite de oliva.

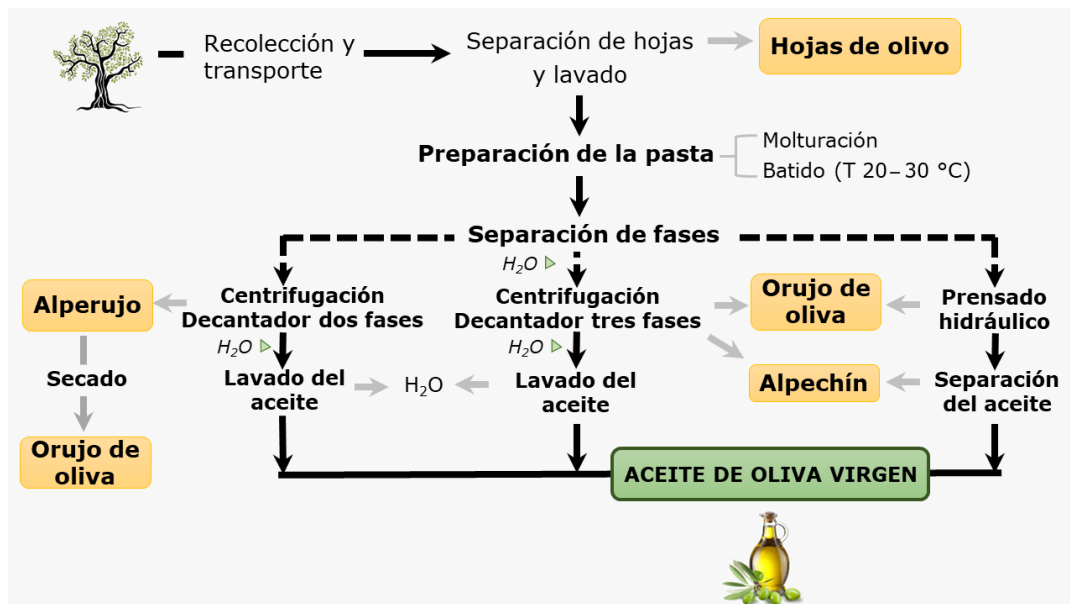


Figura 2.2 Etapas del proceso de obtención del aceite de oliva virgen, distinguiendo entre los tres procesos de separación de fases que han sido más comúnmente aplicados (prensado hidráulico, centrifugación de tres fases y centrifugación de dos fases).

Los subproductos obtenidos están enmarcados en amarillo.

Este esquema está adaptado de Alburquerque et al. (2004); Petrakis (2006).

Las diferentes etapas del proceso de obtención del aceite de oliva están esquematizadas en la Figura 2.2. Una vez recolectadas las aceitunas, se separan las hojas y se realiza un proceso de lavado. Las aceitunas lavadas se someten a una etapa de molturación para conseguir una pasta de hueso, pulpa y piel, que se bate a una temperatura de 20 – 30°C. La finalidad de estas dos etapas es liberar la máxima cantidad de aceite posible presente en el interior de las células de las aceitunas e incrementar el tamaño de las gotas de aceite para facilitar el proceso de separación (Petrakis, 2006). El siguiente paso consiste en la separación física de las fases que componen la mezcla batida, que se puede realizar mediante diferentes procesos. Uno de estos procesos de separación es el tradicional prensado hidráulico, que se basa en la aplicación de altas presiones para facilitar la expulsión de la fase líquida de la fase sólida. De esta manera, por un lado, se obtiene como subproducto esta

fase sólida, conocida como orujo de oliva, mientras que la fase líquida se somete a un proceso de centrifugación vertical para separar el aceite de oliva del alpechín. Los otros dos procesos más importantes se basan en métodos de centrifugación, es decir, que logran la separación de fases por diferencia de densidades (Greyt, 2013). El primero de los procesos de centrifugación en ser implementado fue el de tres fases. Para conseguir la separación con el decantador de tres fases es necesario que las pastas sean fluidas, lo que requiere la adición de agua tibia en cantidades equivalentes al 40 – 60% del peso de la aceituna inicial (Petrakis, 2006). Tras la centrifugación se obtiene por un lado el orujo de oliva, por otro lado, el alpechín y, por otro, un mosto aceitoso. Este mosto aceitoso se lava con agua para separar el aceite del alpechín residual que aún permanece en esta fase. En el caso de la centrifugación de dos fases, la pasta se somete a la separación sin necesidad de añadir agua, obteniendo por un lado el alperujo (orujo de oliva húmedo) y un mosto aceitoso que, tras un proceso de lavado, da lugar al aceite de oliva. En la Figura 2.3 se muestra una comparativa de algunas de las características de los tres procesos de separación.

	Centrifugación de dos fases	Centrifugación de tres fases	Prensado hidráulico
Proceso en continuo	✓	✓	✗
Consumo energético	↑↑	↑↑	↓
Consumo de agua	↓	↑↑	↓
Alperujo/orujo de oliva generado	800 kg	550 kg	350 kg
Alpechín generado	No se genera	1,0 – 1,6 m ³	0,45 – 0,90 m ³

Figura 2.3. Esquema comparativo de los tres procesos de separación de fases que han sido más comúnmente aplicados (prensado hidráulico, centrifugación de tres fases y centrifugación de dos fases).

La cantidad de subproductos (alperujo/orujo de oliva y alpechín) está expresada por tonelada de aceitunas procesadas.

La información para realizar este esquema ha sido obtenida de Alburquerque et al. (2004); Petrakis (2006).

Actualmente el método de separación preferible en la industria es la centrifugación de dos fases. Esto se debe a que presenta la ventaja sobre el de prensado hidráulico de permitir una producción en continuo y a que las cantidades de agua empleada y de residuo generado son inferiores en comparación con la centrifugación en tres fases (Figura 2.3). Sin embargo, el alperujo es más complicado de tratar que el orujo debido a la elevada humedad que presenta (Petraakis, 2006). De hecho, la composición del orujo de oliva puede ser bastante variable en función del proceso de separación aplicado (Tabla 2.1). Además, la cantidad generada tanto de orujo de oliva como de alpechín también depende del método de separación de fases (Figura 2.3). Al igual que en el caso del orujo, la composición del alpechín varía en función del método de separación, aunque en todos los casos el principal componente del alpechín es el agua (80 – 92%). Los componentes minoritarios del alperujo son la materia orgánica (lípidos, hidratos de carbono, pectina, fenoles, taninos, etc.), en proporciones de entre un 3% y un 15%, y minerales, en porcentajes entre un 0,5% y un 2,0% (Khdair y Abu-Rumman, 2020).

Tabla 2.1 Características composicionales de los orujos de oliva/alperujo procedentes de los diferentes procesos de separación antes de ser sometidos al proceso de secado previo a la extracción del aceite crudo de orujo de oliva.

Parámetro (%)	Proceso de separación de fases		
	<i>Centrifugación de dos fases (alperujo u orujo húmedo)</i>	<i>Centrifugación de tres fases (orujo)</i>	<i>Prensado (orujo)</i>
Humedad	56,8 ± 2,19	50,2 ± 1,94	27,2 ± 1,05
Aceites y grasas	4,65 ± 1,74	3,89 ± 1,45	8,72 ± 3,25
Proteínas	2,87 ± 0,01	3,43 ± 0,02	4,77 ± 0,02
Azúcares	0,83 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,38 ± 0,02
Cenizas	1,42 ± 0,09	1,70 ± 0,11	2,36 ± 0,14
Compuestos fenólicos	2,43 ± 0,15	0,33 ± 0,04	1,14 ± 0,06

Información obtenida de Vlyssides et al. (2004).

En cuanto a las posibles aplicaciones de los subproductos de la industria del aceite de oliva, las hojas constituyen el subproducto de menor valor. De hecho, lo más común tradicionalmente era que se quemasen o se moliesen con otros residuos del proceso. No obstante, las hojas son fuentes de compuestos fenólicos con un posible efecto beneficioso sobre la salud humana, lo que ha despertado el interés por su empleo en el campo de la alimentación y la salud (Selim et al., 2022). Por ejemplo, la oleuropeína, cuyo contenido puede llegar a superar el 15% (p/p) sobre materia seca de las hojas

de olivo (Skaltsounis et al., 2015), es un polifenol que se emplea como suplemento nutricional y para el que se ha descrito actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiaterogénica, anticancerígena, antimicrobiana y antiviral (Haris Omar, 2010). Además de polifenoles, las hojas de aceituna presentan otros tipos de compuestos bioactivos, como son algunos terpenos, algunos esteroides o el escualeno, y cuyo interés está potenciando su revalorización.

Por su parte, el alpechín ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de tierras debido a su alto contenido en materia orgánica y en nutrientes beneficiosos para el crecimiento de plantas, concretamente en nitrógeno, fósforo, potasio, hierro y magnesio (Khdair y Abu-Rumman, 2020). Sin embargo, la composición del alpechín conlleva un riesgo fitotóxico y puede llegar a producir la contaminación del suelo y del agua. Para evitar un efecto negativo en la tierra del uso del alpechín se recomienda realizar algún tratamiento previo para reducir la materia orgánica y/o el contenido de polifenoles (Khdair y Abu-Rumman, 2020). Otro uso del alpechín es la producción de biocombustibles, como el biogás, el etanol, el metano o el hidrógeno (Skaltsounis et al., 2015). Al igual que en el caso de las hojas de aceituna, el alpechín es una fuente de compuestos bioactivos, lo que puede llevar a un futuro desarrollo de aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.

En cuanto al orujo de oliva, es el subproducto con más valor económico de la industria del aceite de oliva. Este subproducto es una pasta sólida constituida por huesos, pulpa y piel de aceituna que contiene un porcentaje relativamente alto de aceite remanente (Tabla 2.1). Por ello, lo más habitual es que el orujo de oliva sea sometido a un proceso de secado para lograr reducir la humedad hasta un 8% aproximadamente (Sánchez Moral y Ruiz Méndez, 2006). Seguidamente, se obtiene el aceite de orujo de oliva crudo (OPO, *Crude olive pomace oil*), normalmente mediante una extracción de este orujo seco con hexano. El OPO presenta una composición de FA similar a todos los aceites procedentes de aceitunas, por lo que es rico en MUFA y, además, es una fuente de sustancias bioactivas (polifenoles, T, esteroides, escualeno, etc.) (Mateos et al., 2020). Al igual que la mayoría de los aceites, el OPO requiere un proceso de refinación, que puede ser física o química. En este caso, el aceite refinado de orujo de oliva (ROPO, *Refined olive pomace oil*) se suele mezclar con aceites de oliva vírgenes comestibles (sin incluir el lampante) para obtener el aceite comestible denominado como aceite de orujo de oliva (Clodoveo et al., 2015). Por tanto, durante el proceso de refinación del OPO se obtienen los subproductos comentados en el apartado 2.1.2, siendo

el aceite ácido de orujo de oliva (OPAO, *Olive pomace acid oil*) uno de los obtenidos en la refinación química, y que es objeto de estudio en esta tesis.

Otra posible aplicación del orujo de oliva es en la elaboración de envases de alimentos debido a su elevado contenido en polifenoles, que presentan un efecto antioxidante capaz de disminuir la oxidación y prolongar la vida útil del alimento (Difonzo et al., 2021). Por este mismo motivo, el orujo de oliva también se adiciona a algunos alimentos, constituyendo además una fuente de fibra dietética y produciendo una disminución del índice glucémico (Difonzo et al., 2021). También es de gran interés en el campo de la alimentación animal puesto que es una fuente tanto de FA insaturados como de polifenoles (Difonzo et al., 2021).

2.2 Fuentes lipídicas empleadas en la alimentación de animales monogástricos

2.2.1 *Importancia de las fuentes lipídicas en la alimentación de animales monogástricos*

La importancia de los lípidos en la formulación de piensos reside en su versatilidad, ya que presentan un conjunto de funciones importantes tanto nutricionales como no nutricionales. En el plano nutricional, los lípidos son los macronutrientes capaces de aportar la mayor fuente de energía, siendo 1 g de grasa 2,5 veces más calórico que 1 g de azúcar (Doppenberg y van der Aar, 2017). De esta manera, la suplementación con grasas o aceites incrementa la concentración energética de las dietas, por lo que el consumo de pienso se verá disminuido para alcanzar los requerimientos energéticos de los animales. Es decir, el uso de fuentes lipídicas en alimentación animal se puede traducir en una mejor eficiencia del pienso y un crecimiento más rápido, suponiendo que la dieta cumpla todos los demás requerimientos nutricionales (Feed Energy Company, 2014). Además, la inclusión de grasas o aceites en piensos proporciona los FA esenciales para garantizar el correcto desarrollo del animal y un buen estado de salud. Otra ventaja de las grasas y aceites a nivel nutricional es que aportan a las dietas vitaminas liposolubles y compuestos bioactivos que pueden tener un efecto positivo sobre la estabilidad del pienso, el animal y sobre la calidad de la carne o el pescado final. De igual manera, un adecuado contenido lipídico en los piensos ayuda a la absorción de vitaminas y sustancias liposolubles, como T, T3, carotenos o clorofilas, mediante la formación de micelas en el intestino.

La incorporación de fuentes lipídicas en dietas animales posee ventajas también desde el punto de vista de la industria de la elaboración de piensos. Por ejemplo, el uso de grasas o aceites en la formulación de dietas permite una mayor versatilidad a la hora de seleccionar otros ingredientes de las mismas (Feed Energy Company, 2014). Los lípidos pueden servir como agentes lubricantes para productos granulados, lo que reduce el desgaste de la maquinaria, prolonga su vida útil y aumenta el rendimiento (Mateos et al., 1996). Otro efecto positivo de la inclusión de fuentes lipídicas en piensos sobre su eficiencia es que la digestión de estos macronutrientes conlleva una menor disipación de calor que los carbohidratos y proteínas. Esto hace que, en ambientes hipotérmicos, el consumo voluntario de piensos por parte del animal sea superior si este pienso está suplementado con una fuente lipídica (Dolz, 1996). Asimismo, las fuentes lipídicas pueden mejorar el sabor y la

palatabilidad del pienso, haciéndolo más atractivo para el animal. También sirven para reducir el polvo en las fábricas de piensos y en las granjas de producción animal. El polvo en el aire puede llegar a irritar el tejido pulmonar de los animales y puede transportar microorganismos, llegando a inflamar y dañar el sistema respiratorio de los animales (Feed Energy Company, 2014). Sin embargo, a pesar del efecto positivo que puede llegar a tener el uso de fuentes lipídicas en alimentación animal, no es posible incorporarlas en cualquier porcentaje. Esto se debe a que elevadas proporciones de grasa pueden hacer que el pienso final sea más difícil de manejar e incrementa el riesgo de que se produzca un enranciamiento en caso de almacenajes prolongados o de exposición a altas temperaturas (Feed Energy Company, 2014). Este enranciamiento del pienso conlleva aromas desagradables para el animal que pueden ocasionar una disminución del consumo del pienso y, por tanto, un efecto negativo en los parámetros productivos.

Además del porcentaje de inclusión de grasa o aceite en las dietas animales, el tipo de fuente lipídica seleccionada también puede ser determinante en el efecto sobre los parámetros productivos, ya que no todas las fuentes lipídicas poseen el mismo valor energético. En el caso de la alimentación de animales monogástricos existen dos factores que determinan el valor energético de una grasa o un aceite. El primero de ellos es la energía bruta de la fuente lipídica en cuestión, que se estima a partir de la fracción de componentes diluyentes de la energía (Mateos et al., 1996). Esta fracción es la suma de la humedad junto con materia volátil (*M, Moisture plus volatile matter*), impurezas insolubles en éter de petróleo (*I, Insoluble impurities*) y U, conocido como parámetro MIU. El segundo factor que afecta al valor energético es la digestibilidad de la grasa y/o aceite por parte del animal. La digestibilidad de las grasas o aceites depende de su composición, de la naturaleza biológica de la especie y de la edad del animal (Wiseman y Salvador, 1991; Wiseman et al., 1998).

Dentro de la composición de la fuente lipídica, la digestibilidad está condicionada por el grado de insaturación de los FA; la proporción de FFA con respecto a los TAG; la longitud de la cadena de los FA y la posición de los FA en las moléculas de TAG. En primer lugar, los FA insaturados (UFA, *Unsaturated fatty acid*), ya sean MUFA o PUFA, presentan una mayor facilidad para ser incorporados en micelas en el intestino, que son indispensables para su absorción (Kerr et al., 2015; Doppenberg y van der Aar, 2017). Esto implica que una relación UFA/SFA superior en la fuente lipídica proporciona una

digestibilidad mayor y, consecuentemente, una mayor energía metabolizable. El impacto de esta relación UFA/SFA sobre la digestibilidad es exponencial y depende tanto de la edad como de la especie animal. Por ejemplo, la proporción UFA/SFA posee un mayor efecto en el caso de animales jóvenes debido a su menor desarrollo intestinal, siendo esta dependencia con la edad más evidente en el caso de las aves que de los cerdos (Wiseman et al., 1998).

En segundo lugar, la digestibilidad de las grasas o aceites tiende a disminuir de manera lineal con la proporción de FFA presentes en su composición. Este efecto negativo de los FFA sobre la absorción está condicionado por la relación UFA/SFA, la edad y la especie del animal, siendo más pronunciado a mayores proporciones de SFA y en animales jóvenes (Wiseman y Salvador, 1991; Wiseman et al., 1998). No obstante, la proporción de FFA presentes en el pienso final puede ser superior a la aportada por la fuente lipídica, ya que los FFA pueden generarse a partir de la hidrólisis de TAG del pienso durante su almacenamiento.

En tercer lugar, la longitud de la cadena hidrocarbonada de los FA presenta un efecto negativo sobre la absorción lipídica (Doppenberg y van der Aar, 2017). Por último, la digestibilidad de las grasas o aceites se ve influida por la posición que ocupen los FA que componen un TAG. Esto se debe a que los TAG son hidrolizados mayoritariamente por la lipasa pancreática en el duodeno. La actividad de esta enzima es regioespecífica, de tal manera que se liberan primero los FA que ocupan las posiciones de los extremos del TAG (sn-1 y sn-3), generando dos FFA y un MAG conformado por el FA de la posición intermedia (sn-2) (Gunstone, 2008). Una gran proporción (75 – 85%) de los MAG liberados son absorbidos por la barrera intestinal sin sufrir ninguna modificación previa (Ratnayake y Galli, 2009), siendo esta absorción más sencilla que en el caso de los FFA. Consecuentemente, la digestibilidad de los lípidos aumenta cuando los FA de cadena larga se encuentran situados en la posición intermedia del TAG en vez de en los extremos del mismo, especialmente en el caso de los SFA.

Otro factor que influye en la digestibilidad de FA son las posibles interacciones con otros ingredientes empleados en la formulación de la dieta o incluso con otros componentes de la fuente lipídica. Un ejemplo que afecta negativamente a la digestibilidad de los FA es la formación de jabones debido a la reacción entre los FA, sobre todo los SFA de cadena larga, y los minerales, especialmente el calcio y el magnesio (Brink et al., 1995; Mu, 2004).

La formulación de las dietas, incluida la suplementación con grasas o aceites, debe estar diseñada para proporcionar los requerimientos nutricionales en cada caso. Existen diversas normas o recomendaciones que pueden servir como base de la formulación de dietas para animales. Las primeras normas para la elaboración de piensos fueron publicadas en 1944 por el NRC (*National Research Council*) de los EE. UU. y han servido de referencia tanto para la investigación en el campo de la alimentación animal como para el desarrollo de recomendaciones nutricionales actualizadas (Coffey et al., 2016). En el ámbito nacional, la institución encargada del progreso de la alimentación animal y de la publicación de normas para el diseño de dietas para animales es la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). Las recomendaciones nutricionales suelen ser difíciles de establecer, puesto que dependen de la especie, de la raza y de las condiciones de crecimiento de los animales. En este sentido, el contenido de FA esenciales, sobre todo de ácido linoleico, en piensos de pollo y cerdo, no solo procede de la adición de fuentes lipídicas, sino que proviene también de los cereales habitualmente empleados como ingredientes principales en la formulación de estos (Kan, 2015). Además, únicamente se establecen recomendaciones para el ácido linoleico en pollo, mientras que en cerdo no existen recomendaciones para ningún FA (FEDNA, 2013, 2018). El contenido recomendado de ácido linoleico en pollo varía en función de la clase concreta de pollo (industrial, de crecimiento rápido o también conocido como *broiler*; campero o de crecimiento medio; y label o de crecimiento lento) y de la edad del animal. Concretamente, en el caso del pollo de tipo *broiler*, se establece un mínimo de 0,8% de ácido linoleico en la etapa de iniciación (0 – 14 d) y de 0,6% en la primera etapa de crecimiento (15 – 23 d), mientras que el rango definido para la segunda etapa de crecimiento o de cebo (24 – 36 d) es de 0,6 – 2,6% y para la etapa de acabado (> 37 d) es de 0,5 – 2,3% (FEDNA, 2018). El motivo por el que no existen recomendaciones para el ácido linolénico en pollo o para ningún FA esencial en cerdo se debe a que, según FEDNA, no existe una evidencia de que una suplementación específica con dichos FA implique una mejora en los parámetros productivos en cada caso (FEDNA, 2013, 2018).

En cuanto al tipo de grasa o aceite empleada en la suplementación de dietas para pollo y cerdo, actualmente existe una preferencia por las fuentes lipídicas de origen vegetal. Esto es debido a que las grasas o los aceites de origen vegetal generalmente presentan proporciones superiores de UFA que

las de origen animal (Rosenvold y Andersen, 2003; Alonso et al., 2012). Por un lado, las grasas animales que han tenido una mayor relevancia en alimentación animal son la manteca de cerdo, el sebo procedente de animales rumiantes y la grasa de aves (principalmente de pollo) (FEDNA, 2015a). En el caso de la manteca de cerdo, no se suele comercializar pura debido a la imposibilidad de la mayoría de los mataderos de procesar por separado los subproductos procedentes de cerdos y de rumiantes. Así, es frecuente encontrar grasas mezcladas cuyo valor técnico y comercial se define por su proporción de FFA o grado de acidez (FEDNA, 2015a). Por otro lado, las fuentes lipídicas de origen vegetal empleadas con más frecuencia en piensos para pollo y cerdo son grasas o aceites crudos. Según los datos publicados por el Servicio de Investigación Económica del Departamento de Agricultura de EE. UU. y la Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, Food and Agriculture Organization) (Economic Research Service. U.S. Department of Agriculture, 2021; FAO, 2021), los aceites y grasas vegetales que han sido más producidas a nivel mundial en los últimos años son, con diferencia, los procedentes de la palma y de la soja (Figura 2.4). Por esta razón, han sido también las fuentes lipídicas de origen vegetal más empleadas en alimentación animal.

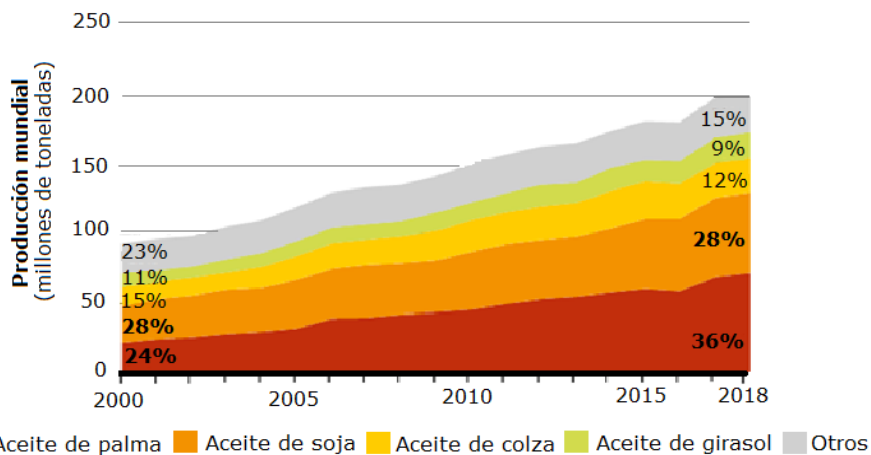


Figura 2.4 Producción mundial de aceites vegetales.
Gráfica adaptada de FAO (2021).

Como ya se ha comentado anteriormente, los animales jóvenes requieren piensos con una mayor proporción de UFA, por lo que una de las fuentes lipídicas más ampliamente empleada en piensos iniciales o *prestarters* es el SO. Además, es un aceite rico en los FA esenciales, sobre todo en ácido linoleico, por lo que su uso en dietas animales ayuda a cubrir los requerimientos nutricionales de estos FA. Sin embargo, en piensos de crecimiento o acabado no es recomendable el uso de fuentes lipídicas tan insaturadas porque pueden tener un efecto negativo en la calidad del canal y/o de la carne final (apartados 2.3.2 y 2.3.3). Según el estudio realizado por Lauridsen et al. (2007), el empleo de PO, el aceite crudo de coco o de colza son buenas alternativas a las grasas animales en alimentación de cerdo cuando se usan en un 5%, mientras que las mezclas de grasas con diferente origen botánico deberían evitarse. Las recomendaciones de FEDNA sobre el porcentaje máximo de fuente lipídica que se debe emplear en las dietas de pollo y cerdo varía en función del origen de esta (Tabla 2.2). Independientemente de la fuente lipídica empleada, el límite máximo de suplementación por motivos técnicos es del 5% en el caso de dietas *prestarters* de cerdo y del 6% en el resto de las dietas.

Tabla 2.2 Porcentajes máximos de incorporación de fuentes lipídicas en piensos para pollo y cerdo.

	Piensos para pollo		Piensos para cerdo		
	Inicio (0 – 18 d)	Cebo (18 – 45d)	<i>Prestarter</i> (< 28 d)	Inicio (28 – 70d)	Cebo (> 70d)
Fuentes lipídicas de origen animal					
Manteca	4	6	4	5	6
Sebo	2	5	1	2	4
Grasa de pollo	5	6	3	4	5
Fuentes lipídicas de origen vegetal					
Soja/Girasol	6	4	5	6	2
Palma	3	4	2	3	4

La información presentada en esta tabla ha sido obtenida de FEDNA (2015a, 2015b).

Aunque los dos únicos FA realmente esenciales para los animales son el ácido linoleico y linolénico, existen especies que no poseen una capacidad óptima de biosintetizar determinados FA que facilitan su correcto desarrollo y crecimiento, por lo que es necesario incluirlos en la formulación de las dietas. En el caso de los peces de origen marino, el requerimiento de EPA y DHA es superior a la de otras especies, ya que la capacidad de obtener EPA y DHA a partir del ácido linolénico es bastante inferior a otras especies

(Takeuchi, 1997; Tocher y Glencross, 2015). Por este motivo, el tipo de fuente lipídica que ha sido más empleada en acuicultura es el aceite de pescado (FO, *Fish oil*), siendo adicionado en cantidades de entre el 3% y el 25% (Subcommittee on aquaculture of FAO, 2012). Tal y como muestra la Figura 2.5, la importancia de la acuicultura con el paso de los años ha ido aumentando y se espera que continúe con la misma tendencia creciente, pudiendo llegar a cubrir un 62% de la producción del pescado consumido por el ser humano en 2030 (World Bank, 2013). Sin embargo, la producción de FO se mantiene prácticamente constante, esperando un ligero incremento hasta 2030 (0,8% anual) (OECD/FAO, 2021). Además, parte de dicha producción procede de la propia acuicultura (Figura 2.5). Esto ha generado una preocupación por la sostenibilidad de este sector, que ha llevado a la búsqueda de otras fuentes lipídicas para sustituir a FO en la formulación de piensos para peces.

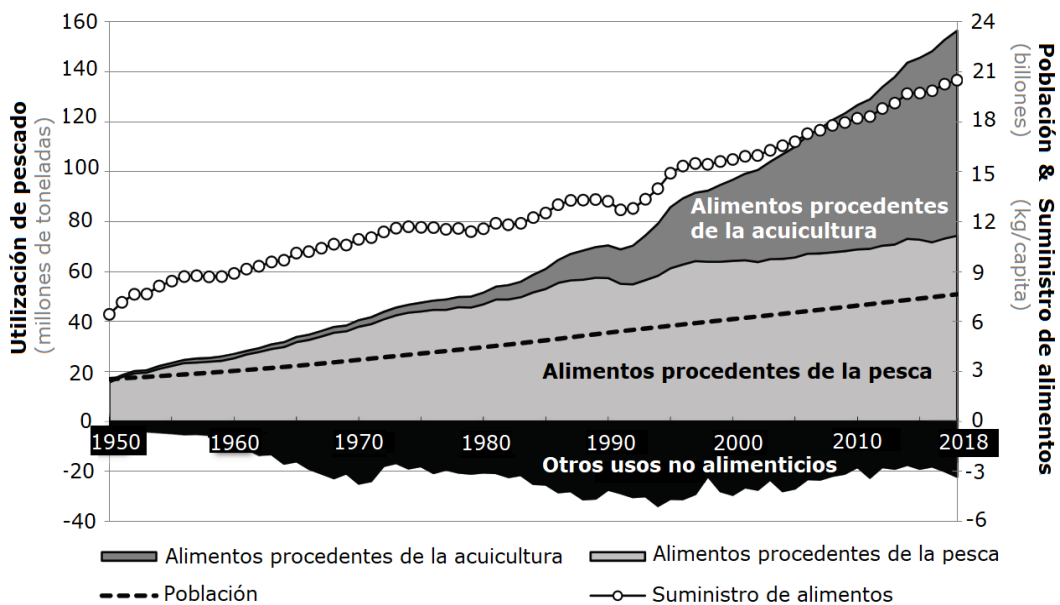


Figura 2.5 Utilización y suministro mundiales de pescado.
Gráfica adaptada de FAO (2020).

El reemplazo de FO en las dietas comerciales se suele realizar de manera parcial para garantizar que existe una cantidad de EPA + DHA adecuada para suplir los requerimientos nutricionales de cada especie. Actualmente no existen tablas de recomendaciones nutricionales específicas para la elaboración de piensos para peces publicadas por FEDNA y los valores encontrados en la bibliografía sobre los requerimientos de EPA + DHA son muy variables (0,5 – 2,5% sobre materia seca) incluso dentro de la misma

especie (Turchini et al., 2009). En el caso de la lubina (*Dicentrarchus labrax*), que es una especie de gran relevancia en el área del Mediterráneo y cuya disponibilidad en el mercado se debe sobre todo a la acuicultura (Chistiakov et al., 2007; Vandeputte et al., 2019), los requerimientos de EPA + DHA propuestos varían desde un 0,7% (Skalli y Robin, 2004) hasta un 3% (Izquierdo et al., 2003). A pesar de este amplio rango de valores, la proporción de EPA + DHA más ampliamente considerada como necesaria en la dieta para asegurar un correcto desarrollo de la lubina es del 1% sobre materia seca (Kaushik, 2002; Lim, 2003; Turchini et al., 2009).

Uno de los principales ingredientes en nutrición acuícola suele ser la harina de pescado (17 – 65%) (Cho y Kim, 2011). Las harinas de pescado aportan a la dieta un elevado porcentaje de proteína, aminoácidos esenciales y EPA + DHA, ya que presentan entre un 10% y un 15% de lípidos residuales (Rombenso et al., 2021). Esto implica que el cumplimiento de las necesidades básicas de estos FA en la formulación de dietas para peces no recae enteramente en el uso de FO. De hecho, las proporciones de EPA y DHA aportadas por estas harinas son suficientes para cubrir los requerimientos nutricionales en algunas especies, como determinados tipos de carpas o de salmones (Turchini et al., 2009; Rombenso et al., 2021). Otra ventaja del uso de las harinas de pescado es que aportan la cantidad de colesterol necesaria a la dieta para la cría de crustáceos (Rombenso et al., 2021). En cuanto a la calidad de los FO para la elaboración de dietas en acuicultura, es recomendable controlar los valores de humedad (< 1%), FFA (< 3%) y el estado de oxidación lipídica mediante el índice de peróxidos (< 5 meq/kg), el análisis del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, *2-Thiobarbituric acid*) y el índice de *p*-anisidina. Concretamente, las características sugeridas por FEDNA para estos aceites son una humedad inferior al 1 g/100g de grasa, un contenido de FFA menor al 3%, un índice de peróxidos por debajo de 5 meq/kg, un valor de TBA inferior a 25 neq de malondialdehído (MDA, *Malondialdehyde*)/g y un índice de *p*-anisidina menor a 15 (FEDNA, 2015a).

Para realizar una selección adecuada de las fuentes lipídicas alternativas al FO, es necesario considerar que la digestibilidad de las grasas y de los aceites es dependiente de la temperatura a la que se realice la cría de los peces. En este sentido, conforme disminuye la temperatura aumenta el impacto negativo de una alta proporción de SFA sobre la digestibilidad de la fuente lipídica (Cho y Kaushik, 1990; Bureau et al., 2002). Este hecho hace que las grasas procedentes de animales terrestres sean poco atractivas en la

formulación de dietas en el sector acuícola. Por el contrario, los aceites crudos de linaza, SO y colza poseen coeficientes de digestibilidad aparentes elevados incluso a temperaturas de 5°C (92% en el caso de los dos primeros y 85% en el caso del aceite de colza) (Cho y Kaushik, 1990; Bureau et al., 2002). De hecho, la digestibilidad de todos estos aceites vegetales a cualquier temperatura es superior a la de las grasas procedentes de animales terrestres e incluso a la del FO (Bureau et al., 2002). Por tanto, el reemplazo de FO en piensos para peces por los aceites de linaza, SO o colza podría suponer una repercusión positiva sobre la energía digestible de los mismos. Entre estas fuentes lipídicas, el empleo de SO ha recibido una gran atención debido, en parte, a su alta disponibilidad en el mercado. Otra ventaja del uso de SO como fuente lipídica en nutrición acuícola es la elevada proporción de T que puede aportar a la dieta, cuya actividad antioxidante puede contribuir positivamente a la estabilidad oxidativa tanto del pienso durante su almacenamiento como del pescado final (apartado 2.3.2). Por su parte, el aceite crudo de linaza se caracteriza por una elevada proporción de ácido linolénico (43,8 – 70,0%) (Codex Alimentarius, 1999). Consecuentemente, su uso en la formulación de dietas supone un mayor aporte de este FA esencial, que sirve de sustrato para la biosíntesis de EPA y DHA.

Más allá de la importancia de un aporte adecuado de cada FA por parte de la dieta, hay que tener en cuenta que se pueden producir interacciones entre los distintos tipos de FA y modificaciones en el metabolismo lipídico de los animales (Turchini et al., 2019). Por ejemplo, existen diversos estudios en peces que han sugerido la existencia de un “efecto ahorrador de n-3 LC-PUFA”, conocido en inglés como *n-3 sparing effect*. Este efecto consiste en una optimización de la utilización del EPA y el DHA por parte de peces alimentados con dietas ricas en SFA y/o MUFA, reduciendo con ello los requerimientos dietéticos de EPA y DHA (Rombenso et al., 2015; Bowzer et al., 2016; Emery et al., 2016). Este efecto ahorrador de FA n-3 se puede deber a que la inclusión de ciertos FA en las dietas pueden promover la obtención de energía mediante el catabolismo de lípidos, mientras que otros FA pueden inhibirla, afectando al depósito y utilización de EPA y DHA en peces (Turchini et al., 2019). Además, el uso de piensos con unas proporciones elevadas de FA que presenten mayor preferencia que los n-3 LC-PUFA a ser catabolizados, así como de FA precursores de n-3 LC-PUFA, pueden favorecer la retención de EPA y DHA en los tejidos de los peces. De esta manera, determinadas combinaciones de FA en las dietas pueden incrementar la biodisponibilidad del EPA y el DHA en los peces y, por tanto, conseguir parámetros productivos

similares o superiores a la suplementación únicamente con FO. Consecuentemente, en algunas ocasiones se opta por el empleo de una mezcla de diferentes fuentes lipídicas vegetales en vez de una única (por ejemplo, de mezclas de aceites crudos de linaza, colza y PO) para intentar obtener una proporción de SFA, MUFA y PUFA que optimice la biodisponibilidad de EPA y DHA (Torstensen et al., 2005; Orrego, 2018).

2.2.2 *Uso de subproductos de origen vegetal en alimentación de animales monogástricos*

Actualmente existe un gran interés por el uso de subproductos en la formulación de dietas animales debido a la mejora que supone desde el punto de vista de la sostenibilidad tanto medioambiental como económica. Como ya se ha comentado en el apartado 2.1.2, las lecitinas, los AO y los FA destilados son los subproductos procedentes de la refinación de aceites crudos que poseen un interés en el campo de la alimentación animal. Estos tres subproductos se encuentran incluidos en el catálogo de materias primas para piensos de la UE (EU, 2017). En este reglamento se incluyen los parámetros de declaración obligatoria para los AO y los FA destilados, siendo uno de ellos el porcentaje de grasa bruta. Además, al igual que en el caso del empleo de grasas y aceites vegetales, es necesario especificar el origen botánico del que proceden estos dos subproductos y el valor de la M cuando sea superior al 1%. Por el contrario, en el caso de la utilización de lecitinas en piensos no se establece ninguna declaración obligatoria en el catálogo de materias primas para piensos de la UE (EU, 2017).

En el marco nacional, las recomendaciones publicadas por FEDNA sobre la calidad de la lecitina de soja, de AO y FA destilados de diversos orígenes botánicos para su uso en piensos incluyen un valor de I inferior al 0,15 g/100 g y un índice de peróxidos menor de 10 meq/kg (FEDNA, 2002). Estos valores sugeridos de I y de índice de peróxidos son equivalentes a los propuestos para cualquier tipo de aceite o grasa incluida en la guía de FEDNA. Sin embargo, cabe esperar que la proporción de I sea superior en las lecitinas, los AO y los FA destilados, ya que, al ser subproductos de la refinación, pueden concentrar compuestos propios de dicha fracción que hayan sido eliminados de la grasa o del aceite desgomado. De hecho, en el estudio realizado por Varona et al. (2021a) con 92 muestras de AO y FA destilados adquiridos en el mercado español, únicamente se encontró una muestra de las 92 que cumpliera el valor de I propuesto por FEDNA. Adicionalmente, para los AO y los FA destilados se recomienda que la suma de la fracción de humedad más materia

volátil, la fracción de impurezas insolubles y la fracción de materia insaponificable (MIU, *Moisture and volatile matter + Insoluble impurities + Unsaponifiable matter*) debe ser inferior al 5,0 g/100 g (FEDNA, 2002). El MIU suele ser superior en los AO (mediana de 7,35 g/100g) que en los FA destilados (mediana de 5,11 g/100 g), debido generalmente a una mayor fracción de U en los AO (mediana de 4,20 g/100 g) en comparación con los FA destilados (mediana de 1,34 g/100 g) (Varona et al., 2021a). Teniendo en cuenta estos valores, es altamente probable superar en ambos subproductos (AO y FA destilados) el límite propuesto por FEDNA para el MIU.

Las lecitinas han sido clasificadas como sustancias generalmente reconocidas como seguras por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*), por lo que pueden ser utilizadas en la formulación de piensos para cualquier especie animal sin un mínimo o máximo establecido (Rychen et al., 2018). A nivel nacional, las sugerencias realizadas por FEDNA relativas al empleo de las lecitinas se limitan a aquellas lecitinas comerciales procedentes de la soja. Esto se debe a que es la que posee una mayor disponibilidad en el mercado y una mayor funcionalidad (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008; Wang, 2011; van Nieuwenhuyzen, 2015). En la formulación de cualquier dieta animal se recomienda incluir estas lecitinas entre un 0,5% y un 3,0 - 4,0% para optimizar el rendimiento del proceso de granulación (FEDNA, 2015b). El gran interés de las lecitinas en alimentación animal reside en que el carácter anfipático de los fosfolípidos que las componen facilita la formación de las micelas implicadas en la absorción de lípidos y, con ello, se logra una mayor digestibilidad de los FA, de vitaminas liposolubles y una mejora en la ganancia de peso por parte del animal (Mateos et al., 2012; List, 2015). Por este motivo, el uso de estos subproductos se centra más en su función como aditivos, concretamente como emulsionantes, que como fuentes energéticas. A nivel nutricional las lecitinas poseen la ventaja de ser ricas en PUFA (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008; Nguyen et al., 2014), por lo que su inclusión en las dietas ayuda a cubrir los requerimientos de los FA esenciales. Además, la lecitina es una fuente de colina, que es indispensable para la biosíntesis de fosfolípidos que forman parte de las membranas celulares y participa en el desarrollo del sistema neuronal (Gu y Li, 2003; van Nieuwenhuyzen, 2015; Borsatti et al., 2018).

Diversos autores han demostrado que la lecitina de soja posee una energía metabolizable óptima para ser empleada como fuente energética en dietas para pollo (Peña et al., 2014; Borsatti et al., 2018; Viñado et al., 2019). Concretamente, los resultados obtenidos por Viñado et al. (2020) han revelado que es posible adicionar la lecitina de soja hasta en un 1% en dietas de crecimiento y hasta en un 2% en dietas de acabado de pollo tipo *broiler*. Según el estudio de Huang et al. (2007), el mayor rendimiento de crecimiento en *broiler* se obtiene suplementando la dieta con un 2% de una mezcla de SO y lecitina de soja en proporciones 25/75, respectivamente.

En el caso del cerdo joven, el impacto del uso de lecitinas en las dietas sobre la digestibilidad y los parámetros productivos es dudoso. Ciertos estudios sugieren que la adición de lecitinas posee un efecto positivo sobre la digestibilidad de los FA de la dieta cuando se emplea una grasa o aceite rico en SFA (como el sebo), pero no se observa ningún efecto en la digestibilidad cuando la fuente lipídica utilizada es SO (Soares y Lopez-Bote, 2002; Gu y Li, 2003). Los resultados de otros autores indican que es más probable encontrar un efecto positivo de las lecitinas sobre la digestibilidad de los FA y la eficiencia energética en cerdo joven o con una función intestinal comprometida que en cerdo más maduro (Lauridsen, 2020).

Tanto las lecitinas desgrasadas en polvo como las lecitinas líquidas son ampliamente empleadas en la formulación de dietas dentro del sector acuícola para cumplir con los requerimientos necesarios de fosfolípidos (del 2 – 4% para larvas y peces jóvenes) (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008). Existe la hipótesis de que los fosfolípidos son necesarios para aumentar la eficiencia del transporte de los FA desde el intestino al resto del organismo del pez, posiblemente mediante una mayor síntesis de lipoproteínas (Tocher et al., 2008). Asimismo, una amplitud de trabajos científicos han revelado una mejoría de los parámetros productivos de diferentes especies de peces cuando se suplementan las dietas con lecitina de soja (Jafari et al., 2018; Pagheh et al., 2019; El-Naggar et al., 2021). No obstante, es posible que el empleo de la lecitina de soja en dietas para peces posea algunas desventajas, como la disminución de absorción de astaxantina en salmón atlántico (*Salmo salar* L.) encontrada por Olsen et al. (2005) cuando se utiliza una dieta con un 4% de FO (concretamente de aceite de arenque) y un 10% de lecitina de soja.

En cuanto al uso de AO y FA destilados, las recomendaciones de FEDNA para dietas de pollo y cerdo de diferentes edades solo incluyen subproductos de ciertos orígenes botánicos (Tabla 2.3). En estas recomendaciones no se concreta ninguna característica composicional ni de calidad de estos subproductos, a pesar de la gran variabilidad que pueden mostrar en su composición, incluso aquellos con un mismo origen botánico (apartado 2.1.2). Una de las controversias del empleo de AO y FA destilados en alimentación animal que podría limitar su uso es el gran aporte de FFA por parte de estas fuentes lipídicas a la dieta. Como ya se ha comentado en el apartado 2.2.1, una elevada proporción de FFA podría causar una disminución de la digestibilidad de lípidos y de la energía metabolizable aparente de la grasa. Consecuentemente, el uso de estos subproductos en alimentación animal podría llegar a perjudicar los parámetros productivos de los animales (Artman, 1964; Waldroup y Tollett, 1972; Zumbado et al., 1999).

Tabla 2.3 Porcentajes máximos recomendados para la incorporación de algunos aceites ácidos y ácidos grasos destilados de origen vegetal en piensos para pollo y cerdo

	Pensos para pollo		Pensos para cerdo		
	Inicio (0 – 18 d)	Cebo (18 – 45d)	<i>Prestarter</i> (< 28 d)	Inicio (28 – 70d)	Cebo (> 70d)
AO de soja/girasol	2	4 ¹	1	2	2 ²
AO de coco	1	2	0	0	2
FA destilados de palma	1	2	0	0	2
AO <35% de ácido linoleico	0	2	0	1	3

La información proporcionada en esta tabla ha sido obtenida de FEDNA (2015b).

¹Límite tecnológico.

²Controlar la proporción de ácido linoleico de la dieta.

Abreviaturas: AO, aceite ácido; FA, ácido graso.

A pesar de este posible impacto negativo de los AO y los FA destilados, los resultados obtenidos por diversos autores sugieren que este tipo de subproductos pueden ser fuentes lipídicas aptas para ser usadas en alimentación animal. Por ejemplo, algunos estudios avalan que el AO de soja presenta una energía metabolizable aparente adecuada para ser empleado como fuente lipídica en dietas de *broilers* (Peña et al., 2014; Borsatti et al., 2018). En el estudio realizado por Bornstein y Lipstein (1961) se obtuvieron resultados similares en parámetros productivos de pollo con el empleo de AO de soja, de lecitina cruda de soja, de sebo o de SO, tanto en dietas suplementadas con un 3% como con un 10% de fuente lipídica. En ese mismo estudio, las pastas jabonosas de soja sin tratar empleadas en la elaboración de piensos para pollo resultaron no ser aptas en ningún porcentaje como

fuentes energéticas (Bornstein y Lipstein, 1961). Sin embargo, en otro estudio el uso de un 4% de pastas jabonosas de soja sin acidificar no produjo ninguna alteración en el crecimiento de *broilers* (Menge y Beal, 1973).

En cuanto a la selección de AO con diferentes procedencias botánicas, en el trabajo de Pordio et al. (2001) sobre el empleo de AO de maíz, girasol, colza o soja en proporciones adecuadas para asegurar un 1% de PUFA en las dietas de *broilers*, la mejor ganancia de peso se logró con el AO de soja. El estudio realizado por Rodríguez-Sánchez et al. (2021) mostró que es posible reemplazar SO por el AO de soja y PO por el FA destilado de palma en piensos de crecimiento y acabado para *broilers* suplementados con un total del 6% de grasa, siempre que la proporción de FFA no supere el 35% de la fracción lipídica en dichas dietas. Los resultados obtenidos por Jiménez-Moya et al. (2021) sobre SO, AO de soja, PO y FA destilado de palma con digestiones *in vitro* y modelos de bioaccesibilidad sugieren que la proporción de SFA de las fuentes lipídicas es un factor de mayor peso en la bioaccesibilidad de los FA que el contenido de FFA de las mismas. En el caso del estudio de Sklan (1978), se asoció la menor digestibilidad encontrada en dietas para pollo formuladas con un 9,6% de AO de soja con una menor formación de micelas en el tracto intestinal. Esta disminución de la formación de micelas podría verse compensada con la inclusión de lecitina cruda de soja en la dieta, tal y como sugiere el efecto sinérgico entre dicho subproducto y un AO rico en MUFA encontrado por Viñado et al. (2019) en dietas de iniciación y de crecimiento-acabado para *broilers*. Otros autores han propuesto la mezcla del aceite ácido de soja (85%), la lecitina cruda de soja (5%), y el glicerol (10%) como una alternativa viable a las fuentes lipídicas tradicionales en dietas para *broilers*, debido a un menor coste de estos subproductos y a una mayor energía metabolizable asociada a la mezcla (Peña et al., 2014; Borsatti et al., 2018).

La utilización de AO y FA destilados en dietas para cerdo ha sido menos estudiada que en piensos de pollo. Según Lauridsen et al. (2007) y Lauridsen (2020) el FA destilado de palma posee una digestibilidad aparente similar al PO cuando se añaden en un 5% en dietas de cerdos lechón y de engorde. Por otro lado, Vilarrasa et al. (2015a, 2015b) observaron que el uso de dietas con un 4% de AO de palma daba lugar a coeficientes aparentes de absorción similares en cerdos lechón y de engorde que el empleo de dietas con un 4% de PO. Los estudios realizados por Mendoza Benavides (2012) sobre el empleo de AO de soja y diferentes grasas animales ácidas en alimentación de cerdos de crianza demostraron que la suplementación con grasas siempre ejerce un

efecto positivo sobre la digestibilidad total aparente y la energía bruta, independientemente del contenido en FFA de las mismas. De hecho, este autor concluyó que con la utilización de las fuentes lipídicas ácidas se obtienen efectos similares o incluso mejores sobre el rendimiento de crecimiento de los cerdos que cuando se emplean fuentes lipídicas ricas en TAG.

La viabilidad del uso de distintos AO y FA destilados como fuentes lipídicas en dietas para peces también ha sido estudiada por diferentes científicos. Por ejemplo, Ng (2004) obtuvo una mejora en el crecimiento de especímenes de bagre africano cuando se sustituyó un 25% de FO por FA destilado de palma en dietas con un total de grasa añadida del 6%. Por otro lado, en el trabajo llevado a cabo por Bahurmiz y Ng (2007) el empleo de un 8% de PO o de FA destilados de palma en vez de un 8% de FO en dietas para tilapia no afectó al peso final, a la conversión del pienso ni al rendimiento de producción. Además, Ng et al. (2010) observaron un incremento de la digestibilidad aparente de los SFA en trucha arcoíris conforme se incrementaba la sustitución de FO por FA destilados de palma (reemplazo del 50% y del 75%) en piensos con un 20% de grasa añadida. Este hecho lo atribuyeron, en parte, a que el proceso de absorción de FFA no requiere una lipólisis previa, como ocurre en el caso de los TAG. Por el contrario, los resultados de Trullàs et al. (2015) revelaron que la digestibilidad aparente de todos los tipos de FA en la trucha arcoíris disminuye cuando se emplea una dieta con un 21% de AO de palma en vez de una con el mismo porcentaje de FO. Este mismo estudio mostró que es posible sustituir por completo el 21% de FO de la dieta por el AO de colza sin que la digestibilidad lipídica se vea alterada, por lo que los autores concluyen que el grado de saturación y la longitud de la cadena de los FA son factores con un mayor impacto sobre la digestibilidad de los FA que la proporción de FFA de la fuente lipídica. En cuanto al uso del AO de soja, los resultados de Elguera et al. (2019) revelaron que es posible emplearlo en vez de SO en dietas para trucha arcoíris suplementadas con un 5% de grasa sin que exista una repercusión significativa en los parámetros productivos de dicha especie. Otro estudio realizado con AO de soja es el de Genc et al. (2005), en el que el reemplazo total de FO en piensos con un 8,5% de grasa por este AO no afectó a los parámetros de crecimiento de alevines híbridos de tilapia.

2.3 Efecto de las grasas y aceites empleados en la alimentación de animales monogástricos sobre la calidad de la carne y el pescado

2.3.1 *Modificación del perfil de ácidos grasos de la carne y del pescado*

Los alimentos de origen animal, como la carne, el pescado o los huevos, presentan una gran relevancia a nivel nutricional en la dieta humana. Debido a este motivo y al crecimiento demográfico, la producción y el consumo de este tipo de alimentos ha aumentado con el paso de los años (FAO, 2021). Concretamente, en el año 2018 los alimentos de origen animal aportaban un 39% de la proteína total consumida por el ser humano a nivel mundial, mientras que en Europa y América del Norte cubrían un 59% de la proteína de la dieta (FAO, 2021). En cuanto al aporte lipídico, los alimentos de origen animal suelen presentar una proporción de SFA variable, pero en todos los casos es considerablemente alta. Por ejemplo, en el pescado, la carne blanca de pollo o la carne poco grasa de cerdo los SFA suelen representar entre un 22% y un 33% de los FA totales de estos alimentos, mientras que la carne de ternera o la leche poseen proporciones superiores (FAO, 2010).

Actualmente existe una gran amplitud de evidencias científicas que respaldan la correlación positiva entre la ingesta de mezclas de SFA y la concentración de lipoproteínas de baja densidad en sangre (FAO, 2010; EFSA, 2019). Consecuentemente, el consumo de SFA ha sido vinculado por multitud de estudios con un incremento del riesgo de padecer ciertas enfermedades, como las enfermedades cardiovasculares o la diabetes de tipo 2 (Wood y Enser, 2017). Por este motivo, la FAO recomienda limitar la ingesta de SFA al 10% de la energía de la dieta (FAO, 2010), mientras que la EFSA sugiere que el consumo de SFA debería reducirse al mínimo posible (EFSA, 2019). Es importante tener en cuenta que el efecto de los distintos SFA (p. ej. del ácido mirístico y del ácido esteárico) sobre estas lipoproteínas no es el mismo, sino que es más evidente en el caso de los SFA que contienen entre doce y dieciséis átomos de carbono (FAO, 2010; Wood y Enser, 2017). Sin embargo, ciertas organizaciones sugieren la sustitución de SFA, sin importar el SFA en concreto del que se trate, por *cis*-MUFA o por PUFA en la dieta para reducir el impacto negativo que pueden llegar a tener los SFA sobre la salud humana (FAO, 2010). Estas evidencias y recomendaciones sobre los SFA pueden poner en duda el valor nutricional de los alimentos de origen animal.

Un hecho ampliamente conocido es que la composición lipídica de los alimentos de origen animal, sobre todo procedentes de animales monogástricos, está condicionada por la dieta empleada. Esto puede permitir el incremento del valor nutricional de estos alimentos y la adaptación del consumo de FA a las recomendaciones sugeridas sin necesidad de restringir los alimentos de origen animal en la dieta humana. Por tanto, existe una gran diversidad de estudios científicos centrados en la disminución de la proporción de SFA en carne de diferentes especies para lograr con ello un incremento de su valor nutricional. Por ejemplo, el empleo de dietas con un 6% o un 10% de aceite de oliva, de girasol o de linaza causó una disminución de la proporción de SFA en muslos y en pechuga de pollo con respecto al uso de sebo como fuente lipídica en las mismas proporciones (Crespo y Esteve-García, 2001). Los resultados obtenidos en el estudio de Morel et al. (2006) mostraron una reducción del contenido en SFA tanto en el lomo como en el tejido adiposo subcutáneo de cerdo cuando el pienso empleado contenía un 6% de una mezcla de aceites vegetales (soja en un 4% y linaza en un 2%) en vez de una dieta con un 6% de sebo. De la misma manera, según la revisión bibliográfica realizada por Turchini et al. (2009), es habitual encontrar una disminución de la proporción de SFA en tejidos de peces de diferentes especies como resultado de la sustitución total o parcial del FO de la dieta por diferentes fuentes lipídicas vegetales, como el aceite de maíz, de soja o de girasol. No obstante, el reemplazo total de FO por PO provoca un incremento en el porcentaje de SFA tanto en la dieta como en el pescado.

Más allá de la reducción de SFA, algunos de los trabajos científicos se han enfocado a la mejora de la relación entre el contenido de PUFA n-6 y PUFA n-3. Al no existir recomendaciones concretas por parte de la EFSA o de la FAO sobre dicha relación (FAO, 2010; EFSA, 2019), el valor que se pretende alcanzar suele ser variable (Enser et al., 2000; Raes et al., 2004; Wood et al., 2008; Wood y Enser, 2017). Diversos estudios han demostrado que incrementar los niveles de PUFA n-6, concretamente de ácido linoleico, es sencillo en pollo o cerdo cuando se emplean dietas con alto contenido en este tipo de FA, como son aquellas suplementadas con aceites de colza, girasol o SO (Wood et al., 2004a; Bou et al., 2009). Además, la producción de carne con un elevado porcentaje de ácido linoleico se ve favorecida debido al aporte de este FA por parte de los cereales empleados habitualmente en la formulación de dietas para animales (Kan, 2015). Sin embargo, el aumento del contenido de PUFA n-3 en carne está dificultado por la competición metabólica existente con los PUFA n-6, tanto a nivel enzimático como a la

hora de depositarse en forma de fosfolípidos en las membranas celulares (Lee et al., 1989; Wood y Enser, 2017). Algunos ejemplos de fuentes lipídicas empleadas en alimentación animal para lograr un aumento de PUFA n-3 en carne son los aceites de linaza o FO. En el estudio de López-Ferrer et al. (1999) se obtuvo un contenido total de PUFA n-3 similar en pollo con el uso de un 8,1% de FO o de aceite de linaza en las dietas, mientras que el empleo de aceite de colza en la misma proporción no fue tan efectivo. A pesar del similar contenido en PUFA n-3, el diferente perfil lipídico del FO y del aceite de linaza se observó en la composición en FA de la carne de pollo, obteniendo un contenido superior en EPA y DHA con el empleo de FO en la dieta y un porcentaje más elevado de ácido linolénico con el uso de aceite de linaza. Por su parte, Lisiak et al. (2013) revelaron que las dietas de cerdo que eran más efectivas para enriquecer la carne en ácido linolénico y en PUFA n-3 eran aquellas elaboradas con linaza en un 2,3% (adicionada junto con un 1% de colza y un 0,2% de grasa animal) y 2,5% (adicionada junto con un 1% de FO). En este mismo estudio, el mayor porcentaje de EPA y DHA en carne de cerdo se logró con las dos dietas que contenían FO en 1% (suplementado junto con un 2,5% de linaza) y en un 2% (añadido con un 1% de colza y un 0,5% de grasa animal).

Uno de los efectos que ocasiona el reemplazo parcial o total de FO por fuentes lipídicas de origen vegetal en la formulación de piensos en acuicultura es la disminución del contenido de EPA y DHA presente en el pescado final. Esta disminución podría conllevar una reducción del valor nutricional del pescado si la proporción de EPA y DHA presente en este fuese insuficiente para cubrir las recomendaciones diarias establecidas para el ser humano (250 mg de EPA + DHA) (FAO, 2010; EFSA, 2019). Para evitar una disminución drástica de la proporción de estos dos FA en pescado, diversos autores han estudiado el impacto de introducir una etapa final con un pienso suplementado con un 100% de FO, denominada como *wash out diet* o *finisher diet*, tras el uso de piensos con grasas y aceites de origen vegetal. Por ejemplo, Izquierdo et al. (2005) realizaron un estudio con especímenes de dorada alimentados con dietas suplementadas con un total de 17,6% de grasa, siendo dicha grasa exclusivamente FO durante todo el período, o sustituyéndolo parcialmente (al 60% y al 80%) por SO o por aceite de linaza durante 7 meses, período tras el cual se inició una etapa de *wash out* en la que toda la grasa añadida fue FO. Tras 60 días en este período de *wash out*, el contenido de DHA en el pescado era similar en todos los casos, sin embargo, tras 90 días, la proporción de EPA seguía siendo inferior en el pescado procedente de las

dietas con fuentes lipídicas vegetales. En el caso del trabajo realizado por Mourente y Bell (2006) con lubinas, se emplearon tres dietas diferentes con un total de grasa añadida del 16%, siendo esta grasa un 100% de FO o un 40% de FO más un 60% de mezclas de colza, linaza y palma en proporciones en peso de 10/35/15 o de 24/24/12. Estas tres dietas fueron administradas durante 64 semanas y, después, se realizó una etapa de *wash out* durante otras 20 semanas más. En este caso, Mourente y Bell (2006) no consiguieron restablecer los valores de EPA ni de DHA, siendo un 70% inferiores en el pescado procedente de las dietas con fuentes lipídicas de origen vegetal.

En el caso del uso de AO y FA destilados, el perfil de FA de estos subproductos está relacionado con el origen botánico de la grasa o el aceite crudo, por lo que suele ser similar a la composición en FA de esta grasa o aceite crudo (Varona et al., 2021a). Por este motivo, cabe esperar que el empleo de un AO o un FA destilado para reemplazar a la correspondiente grasa o aceite crudo en piensos para animales monogástricos no produzca ninguna alteración significativa en el perfil de FA de la carne o el pescado final. Esta hipótesis es respaldada por los resultados obtenidos por Vilarrasa et al. (2015b) sobre la composición en FA del tejido adiposo abdominal de *broilers* alimentados con dietas suplementadas con un 6% de PO, AO de palma, SO o AO de soja. En este estudio, tanto el sumatorio de cada tipo de FA como los FA principales eran similares en las muestras de tejido adiposo abdominal procedentes de dietas con PO o con AO de palma, presentando ambos tipos de muestras proporciones de SFA y MUFA superiores a las encontradas en las muestras procedentes de dietas con SO o con AO de soja. Al mismo tiempo, con el uso de dietas con SO o con AO de soja también se obtuvo el mismo contenido de cada tipo de FA, mostrando un porcentaje de PUFA en tejido adiposo abdominal superior al procedente de las dietas con PO o con AO de palma. Por otro lado, en cerdo, González y Tejeda (2007) emplearon dietas con un 5,5% de AO de oliva para lograr obtener lomo de cerdo enriquecido en ácido oleico, como el asociado al lomo procedente de animales criados en sistema extensivo. De hecho, la elevada proporción de ácido oleico ha sido reconocida como una de las características principales asociadas a la alta calidad de los productos cárnicos procedentes del cerdo ibérico criado en sistema extensivo y alimentado a base de bellota y pasto (Cava et al., 1999; Ruiz et al., 2002), por lo que el uso de AO de oliva podría ser una estrategia efectiva para conseguir una calidad similar. En peces, el trabajo realizado por Bahurmiz y Ng (2007) sustituyendo el 8% de FO por PO o FA destilado de palma en dietas para tilapia mostró una composición de FA

similar en el pescado procedente de estas dos dietas, caracterizado por un mayor porcentaje de SFA y MUFA y una menor proporción de PUFA que el pescado procedente de animales alimentados exclusivamente con FO.

2.3.2 Oxidación lipídica en la carne y en el pescado

Las reacciones de oxidación lipídica son procesos complejos e irreversibles que constituyen una de las causas no microbiológicas más importantes de degradación de la carne y el pescado (Ladikos y Lougovois, 1990; Min y Ahn, 2005; Secci y Parisi, 2016). La reacción directa entre un lípido insaturado y el oxígeno molecular en su estado fundamental ($^3\text{O}_2$) es termodinámicamente desfavorable debido a la incompatibilidad entre sus estados electrónicos de spin, estando el lípido normalmente en estado singlete y el oxígeno molecular en triplete (Erickson, 2008). Existen varias formas de salvar esta restricción debida al estado electrónico, que dan lugar a los diferentes mecanismos de oxidación:

- La vía del oxígeno triplete o mecanismo de autooxidación lipídica. El primer paso de esta vía es la formación de un radical alquilo ($\text{R}\bullet$) mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno de un lípido (Figura 2.6). Para que se genere este radical, se requieren agentes que faciliten su formación, como por ejemplo energía en forma de calor o radiaciones (p. ej. ultravioleta y/o visible) o bien metales libres que catalicen la reacción. La reacción entre este radical y el oxígeno triplete, no se encuentra termodinámicamente impedida (Figura 2.7).
- La vía del oxígeno singlete o mecanismo de fotooxidación, en la que la radiación produce la excitación del oxígeno molecular de su estado fundamental (triplete) a singlete, que puede interactuar directamente con los lípidos insaturados.
- El mecanismo enzimático, en el que la oxidación de FA se produce de manera directa o indirecta por la actividad de determinados sistemas enzimáticos.

El mecanismo más común de los tres es la autooxidación lipídica, en el que se pueden distinguir tres etapas diferentes: iniciación, propagación y finalización. La fase de iniciación consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno perteneciente a un lípido (habitualmente un UFA), dando lugar a un radical alquilo ($\text{R}\bullet$), tal y como muestra la Figura 2.6. Como se ha comentado anteriormente, la pérdida de este átomo de hidrógeno se ve

favorecida en presencia de una fuente de energía (como el calor o la radiación ultravioleta y visible) o de catalizadores (como los metales libres) (Choe y Min, 2006). La energía requerida para la sustracción de un hidrógeno de los UFA depende su posición con relación al doble o a los dobles enlaces del FA, siendo menor la energía requerida para sustraer un hidrógeno de una posición bisalílica (contigua a dos dobles enlaces, p. ej. del carbono 11 del ácido linoleico), que de una posición alílica (contigua a un único doble enlace, p. ej. de los carbonos 8 y 14 del ácido linoleico) y, esta a su vez menor que la de un carbono no adyacente a ningún doble enlace (Min y Ahn, 2005). No obstante, en el caso de la carne y el pescado la formación de radicales libres también puede verse favorecida por ciertas especies reactivas del oxígeno procedentes del metabolismo celular, como el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), su derivado protonado o el radical hidroperoxilo (HOO^{\bullet}) (Min y Ahn, 2005; Erickson, 2008).

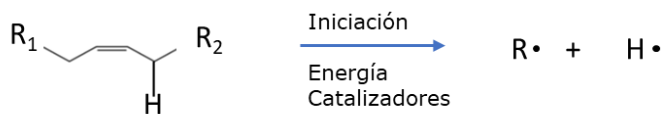


Figura 2.6 Etapa de iniciación de la autooxidación lipídica.

La fase de propagación, esquematizada en la Figura 2.7, se puede subdividir en dos etapas diferentes (Talbot, 2016). En la primera de ellas, el radical alquilo (R^{\bullet}) reacciona con el oxígeno molecular (3O_2) para formar el radical peroxilo (ROO^{\bullet}). Los radicales peroxilo son altamente reactivos y tienden a captar un hidrógeno de otro lípido insaturado (RH), generando un hidroperóxido lipídico (LHP, *Lipid hydroperoxide*) (representado en la Figura 2.7 como ROOH) y otro radical alquilo (R^{\bullet}) (Min y Ahn, 2005). Por un lado, el nuevo radical alquilo puede interactuar con el oxígeno, repitiéndose la primera reacción de la propagación. Además, la relativa baja estabilidad de los LHP, conocidos como productos de oxidación primaria, conlleva el comienzo de la segunda etapa de la propagación (Talbot, 2016). En esta etapa, también conocida como de multiplicación de la cadena radicalaria, los LHP se descomponen mediante diversas reacciones en radicales hidroxilo (OH^{\bullet}), peroxilo (ROO^{\bullet}) y alcoxilo (RO^{\bullet}). Estos radicales presentan una elevada reactividad, por lo que tienden a sustraer un hidrógeno de otro lípido insaturado y a participar en las reacciones en cadena de la fase de propagación. La forma más probable de descomposición de los LHP es mediante rotura homolítica del enlace entre dos átomos de oxígeno, cuyo producto son los radicales alcoxilo e hidroxilo. Esto es debido a que la ruptura

de dicho enlace requiere una energía menor que la necesaria para romper el enlace oxígeno-hidrógeno (Choe y Min, 2006).

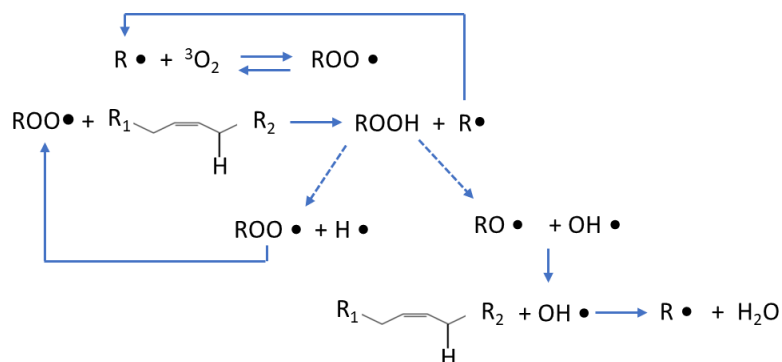


Figura 2.7 Propagación de la autooxidación lipídica.

La fase de finalización se produce cuando dos radicales interactúan, dando lugar a compuestos no radicalarios (Amaral et al., 2018). Las diferentes combinaciones de radicales que pueden suceder en la finalización se recogen en la Figura 2.8.

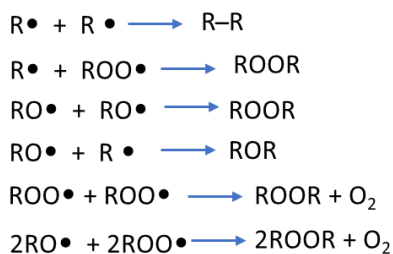


Figura 2.8 Interacciones entre radicales en la fase de finalización de la autooxidación lipídica.

Estas reacciones de dimerización contribuyen a la eliminación de radicales libres de la cadena radicalaria. Otra de las reacciones que contribuye a la eliminación de radicales libres es la formación de compuestos de oxidación secundaria a partir de la descomposición de los hidroperóxidos (ROOH). Estos compuestos, al proceder de una ruptura, presentan menor peso molecular y son mayoritariamente aldehídos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos. La formación de estos compuestos se produce principalmente a partir del radical alcoxilo (RO•) generado en la descomposición de los LHP. Este radical sufre una escisión β -homolítica de un enlace carbono-carbono, produciendo compuestos carbonílicos y radicales alquilo saturados o insaturados. Estos radicales saturados e insaturados, tras un posible reordenamiento electrónico y la adición de un radical hidroxilo o la

transferencia de un hidrógeno, también dan lugar a compuestos de oxidación secundaria de bajo peso molecular (Choe y Min, 2006). Gran parte de estos compuestos son volátiles, por lo que pueden ser responsables de aromas desagradables asociados al enranciamiento (apartado 2.3.3). Dentro de los productos de oxidación secundarios, uno de los aldehídos más importantes en carne y pescado es el 1,3-propanedial o MDA. La presencia del MDA es evaluada habitualmente con el índice del TBA, siendo uno de los marcadores más ampliamente empleados para estudiar la oxidación lipídica en carne y pescado. Este índice ha sido relacionado tanto con la formación de compuestos volátiles como con la percepción del aroma a rancio y con la disminución del grado de aceptación de la carne y el pescado por parte de los consumidores (Poste et al., 1986; Gray et al., 1996; Bou et al., 2001; Masniyom et al., 2002; Cakli et al., 2007; Kostaki et al., 2009).

Otra consecuencia que puede desencadenar la oxidación lipídica es una disminución del valor nutricional de los alimentos, ya que durante este proceso se degradan UFA y sustancias bioactivas con carácter antioxidante (T, T3, carotenoides, etc.). Además, los aldehídos generados durante la oxidación lipídica pueden interaccionar con las proteínas presentes en el alimento, lo que también afectaría al valor nutricional (Guyon et al., 2016). Aunque actualmente existe una controversia sobre la relación existente entre los procesos de oxidación de lípidos y de proteínas en carne y pescado, algunos autores han sugerido que los radicales que se generan en las etapas de iniciación y de propagación del primer proceso podrían acelerar el segundo (Lund et al., 2011; Soladoye et al., 2015; Hematyar et al., 2019).

El desarrollo de reacciones de oxidación lipídica en carne y pescado está influido por numerosos factores, tanto intrínsecos a la composición de estos alimentos como extrínsecos. Un condicionante importante que afecta de manera directa a la composición de los tejidos animales es el estado de estrés oxidativo *in vivo* que puede existir en el animal antes del sacrificio. Este estrés oxidativo del animal puede ser debido al estado fisiológico, a las condiciones de crianza o incluso al método de sacrificio empleado (Estévez, 2015; Kerr et al., 2015; Secci y Parisi, 2016). Tras el sacrificio, los cambios bioquímicos que ocurren durante la conversión de los músculos en carne o filete de pescado, facilitan el contacto entre los lípidos y las sustancias prooxidantes (Bekhit et al., 2013; Estévez, 2017).

Uno de los prooxidantes cuya concentración puede ser determinante en la estabilidad oxidativa de tejidos animales son los metales. El metal de transición más abundante en los sistemas biológicos es el hierro (Amaral et al., 2018). El 90% de este metal se encuentra constituyendo sitios activos de enzimas o el grupo hemo de proteínas, sobre todo de la mioglobina y hemoglobina. Existen grandes evidencias de que este metal presenta un papel importante como iniciador y catalizador de la oxidación de los lípidos, ya sea en forma libre tras la destrucción del grupo hemo o formando parte de la ferrimioglobina (radical proteico) (Amaral et al., 2018). La cantidad de hemoproteínas presentes en la carne o el pescado y, por tanto, la estabilidad oxidativa, depende de la especie animal, del tipo de músculo y de la posición anatómica del mismo (Amaral et al., 2018). De hecho, la mioglobina es considerada como un factor prooxidante por sí misma. Esto es debido a que en su estado oxidado (metamioglobina) puede interaccionar con el H_2O_2 o con los LHP generando ferrimioglobina, sustancia capaz de iniciar la oxidación lipídica (Min et al., 2010; Amaral et al., 2018).

Otras sustancias que presentan actividad prooxidante son ciertas enzimas, que pueden iniciar la degradación de FA mediante el mecanismo de oxidación enzimática, anteriormente mencionado. Las enzimas prooxidantes más importantes son las lipoxigenasas, que poseen la capacidad de sustraer estereoselectivamente un átomo de hidrógeno perteneciente a un grupo metileno de una estructura de 1,4-pentadiénica de un PUFA (Erickson, 2008). Como resultado, se forman estereoespecíficamente hidroperóxidos con dobles enlaces conjugados que, tras su descomposición en radicales libres, pueden intervenir en la propagación de las reacciones de oxidación lipídica o descomponerse en productos de oxidación secundaria.

Otro factor condicionante en la oxidación lipídica es la composición de FA del músculo, ya que no todos los FA presentan la misma susceptibilidad a las reacciones de oxidación lipídica. En los tejidos animales los FA se pueden encontrar en forma de TAG, en forma de fosfolípidos o de FFA. De manera general, los fosfolípidos poseen una mayor tendencia a oxidarse que los TAG (Sampels, 2013). Esto se debe a que los fosfolípidos se componen mayoritariamente por PUFA y la susceptibilidad a la oxidación aumenta con el número de insaturaciones (Erickson, 2008). Esto implica que los procesos de oxidación lipídica son más críticos en alimentos ricos en EPA y DHA, como el pescado, que en aquellos más ricos en SFA, como lo es generalmente la carne. Además, la modificación del perfil de FA de la carne y del pescado

mediante el uso de determinadas grasas en alimentación animal (apartado 2.3.1) puede afectar en gran medida a la estabilidad oxidativa de estos alimentos. Un hecho ampliamente constatado en la bibliografía sobre la modificación del perfil de FA en carne para lograr un incremento de PUFA, sobre todo de n-3 LC-PUFA, es la posible reducción de la vida útil de esta carne debido a la mayor tendencia a la oxidación de estos FA (Erickson, 2008; Kouba y Mourot, 2011; Lee et al., 2019).

A pesar de que la oxidación lipídica es un proceso inevitable, existen factores que pueden frenar su avance, como la presencia de sustancias antioxidantes en la carne y el pescado. Gran parte de estas sustancias antioxidantes pueden clasificarse en tres grupos principales que son vitaminas, péptidos y enzimas. Dentro de las vitaminas, una de las más importantes es la vitamina E, que es de carácter liposoluble y se incorpora preferentemente a las membranas lipídicas celulares y a lipoproteínas. Se conoce como vitamina E al conjunto de los cuatro T (α -T, β -T, γ -T y δ -T) y los cuatro T3 (α -T3, β -T3, γ -T3 y δ -T3), siendo la forma más abundante en la naturaleza el α -T (Brigelius-Flohé y Traber, 1999). El mecanismo de acción antioxidante más importante de los T y T3 se ha relacionado con el hecho de que los radicales libres presentan una mayor facilidad para sustraer hidrógeno de la estructura de los T y T3 que de los UFA (Choe y Min, 2006). El contenido total de T + T3 en carne y pescado depende de multitud de factores. Por ejemplo, al estar localizados preferentemente en las estructuras fosfolipídicas, la concentración de estos compuestos es altamente variable en función del tipo de músculo que se estudie, presentando generalmente los músculos oxidativos un contenido superior en T + T3 (Erickson, 2008). Otro factor que afecta directamente tanto a la concentración total de T + T3 como a la composición en T y T3 es la cantidad en la que estén presentes en la dieta empleada. En este sentido, es importante tener en cuenta que la fuente lipídica utilizada en la elaboración del pienso influye en la composición de T y T3 de la propia dieta y, por ello, puede afectar a la cantidad de los distintos T y T3 encontrada en la carne y en el pescado. Debido a la importancia que presentan estos compuestos en el correcto desarrollo y funcionamiento de los organismos es habitual suplementar los piensos para animales con vitamina E, generalmente en forma de acetato de α -tocoferilo. Este es uno de los motivos que hace que el α -T sea la forma más abundante en las dietas para animales y, en consecuencia, en carne y pescado.

Otros compuestos liposolubles que también poseen un papel antioxidante relevante son los carotenoides, algunos de los cuales presentan también actividad provitamínica A. La actividad antioxidante de los carotenoides se debe sobre todo a que son capaces de transformar el oxígeno singlete en triplete, evitando con ello la fotooxidación. Por otro lado, aunque en menor medida, estos compuestos pueden ralentizar la fase de propagación de la oxidación lipídica, ya que son capaces de ceder un hidrógeno a un radical poco estable (p. ej. $R\cdot$, $RO\cdot$, $ROO\cdot$ o $\cdot OH$), dando lugar a un radical estabilizado por resonancia y poco reactivo (Choe y Min, 2006; Erickson, 2008; Yeum et al., 2010). Por último, el ácido ascórbico (vitamina C) es una vitamina hidrosoluble que actúa como secuestrante del oxígeno y de diferentes radicales libres (Amaral et al., 2018). Más allá de la acción individual de cada una de estas vitaminas, en ocasiones existen sinergismos entre ellas que producen un efecto antioxidante más efectivo. Este es el caso de la combinación del α -T con el ácido ascórbico, cuyo sinergismo se basa en la capacidad que posee el ascórbico de regenerar el α -T (Amaral et al., 2018).

En cuanto al comportamiento antioxidante de los péptidos, existen evidencias de que actúan como secuestradores de radicales, reductores de hidroperóxidos y quelantes de metales (Erickson, 2008). Estas propiedades antioxidantes son altamente dependientes de la composición que presenten en aminoácidos. El último grupo de sustancias antioxidantes son las enzimas, siendo las más importantes la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. La primera de ellas es capaz de eliminar el radical anión superóxido ($O_2\cdot^-$), que es prooxidante, produciendo oxígeno e hidroperóxido de hidrógeno, pudiendo ser este último eliminado por la acción de las otras dos enzimas (Frankel, 1987). Estas enzimas forman parte de los mecanismos para evitar el estrés oxidativo *in vivo* de los organismos, pero su actividad antioxidante disminuye tras el sacrificio de los animales.

Además de los tres grandes grupos de sustancias antioxidantes ya comentados, existen otros compuestos que también pueden ayudar a la prevención de la oxidación lipídica. Los más importantes son los compuestos fenólicos, cuya capacidad para actuar como quelantes de metales y secuestradores de radicales libres altamente reactivos ha sido ampliamente estudiada (Lund, 2021).

Tal y como se ha comentado en el apartado 2.3.1, las fuentes lipídicas empleadas en la dieta de animales monogástricos influyen en la composición lipídica de la carne y el pescado que, a su vez, influye en la tendencia a sufrir reacciones de oxidación lipídica. El efecto del uso de diferentes tipos de grasas y aceites en alimentación animal sobre el desarrollo de reacciones de oxidación lipídica en carne y pescado ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, la información acerca del empleo de subproductos lipídicos en dietas para animales sobre parámetros oxidativos en los alimentos obtenidos de estos es muy limitada. En el caso del uso de lecitinas como fuentes lipídicas en piensos, los pocos estudios existentes muestran un efecto positivo en la estabilidad oxidativa de la carne. Un ejemplo es el estudio realizado por Nagargoje et al. (2016), que mostró un efecto positivo de la sustitución de un 50% de una grasa comercial por lecitina de soja sobre la estabilidad oxidativa tras 15 días de conservación de la carne de pollo en refrigeración. De la misma manera, los resultados obtenidos por Mu y Kitts (2018) revelaron un menor incremento de los valores de TBA entre los 3 y los 5 días de refrigeración tanto de pechuga como de muslo de pollo cocinado cuando la grasa animal fue sustituida por lecitina de soja en proporciones del 25%, 50% y 100% en dietas con un 2,5% de fuente lipídica añadida. Además del reducido número de estudios encontrados en la bibliografía sobre el efecto del uso de lecitinas en alimentación animal en la oxidación lipídica de la carne y del pescado, existe una falta de información acerca de las condiciones de conservación empleadas en cada caso, lo que dificulta la interpretación de los resultados obtenidos en dichos estudios. Por su parte, la repercusión del empleo de AO y FA destilados en alimentación animal sobre la oxidación lipídica de la carne y el pescado está menos estudiada aún que en el caso de las lecitinas. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que los FFA presentan una estabilidad oxidativa inferior a los TAG (Erickson, 2008), lo que puede implicar que el empleo de AO y FA destilados en piensos podría afectar a la estabilidad oxidativa de estos, pudiendo llegar a provocar, por ejemplo, una reducción de sustancias antioxidantes.

Además de la composición de la carne y el pescado, existen otros factores que pueden ser determinantes en el avance de las reacciones de oxidación lipídica. Estos factores están relacionados con las condiciones de conservación del alimento, por lo que son independientes de la dieta del animal, del sistema de crianza o del método de sacrificio. Así, la exposición al oxígeno, a elevadas temperaturas y a la luz son condiciones desfavorables en términos de estabilidad oxidativa (Amaral et al., 2018). Por tanto, una

estrategia eficiente para retardar el avance de la oxidación lipídica es emplear sistemas de envasado que reduzcan o eliminen la exposición de los alimentos al oxígeno. De esta manera, el envasado de carne y pescado con diferentes tecnologías protectoras ha demostrado ser efectivo en la prevención de la oxidación lipídica y en la prolongación de la vida útil de estos alimentos (DeWitt y Oliveira, 2016; Peng et al., 2019). El primer tipo de envasado protector que se aplicó comercialmente fue el envasado al vacío, en el que el alimento se envasa en un material de baja permeabilidad al oxígeno y se sella tras la evacuación del aire. Por lo tanto, el alimento envasado a vacío queda expuesto a una mínima cantidad de oxígeno residual, que se consume rápidamente debido a reacciones enzimáticas o bioquímicas que se producen en la carne, creando un medio anaeróbico responsable del efecto protector de este tipo de envasado (Gill y Gill, 2005).

Otro tipo de envasado protector son las atmósferas modificadas, en las que se emplea un gas o mezcla de gases para desplazar el aire que existe alrededor del alimento antes del sellado. Las mezclas de gases utilizadas en el envasado de alimentos a nivel comercial contienen oxígeno, dióxido de carbono y, en algunos casos, nitrógeno (Gallmann, 2003; Gill y Gill, 2005; Cooksey, 2014). La presencia de oxígeno facilita el mantenimiento de la tonalidad roja brillante característica de la carne fresca (apartado 2.3.3) y puede ayudar a controlar el crecimiento microbiológico de bacterias anaerobias (Floros y Matsos, 2005; Iglesias et al., 2006). De la misma manera, la función del dióxido de carbono es la prevención del crecimiento de microorganismos (Iglesias et al., 2006). El dióxido de carbono es altamente soluble tanto en el agua como en los lípidos, mientras que los tejidos y las bacterias pueden consumir el oxígeno presente inicialmente en el envase (Gill y Gill, 2005). Consecuentemente, la composición de la atmósfera modificada puede cambiar con el paso del tiempo. Por su parte, el nitrógeno se emplea como gas inerte como alternativa al dióxido de carbono para disminuir la concentración presente de oxígeno y para evitar el colapso del paquete, pero no presenta propiedades conservantes frente a los microorganismos (Iglesias et al., 2006; DeWitt y Oliveira, 2016).

A pesar de la acción positiva que pueden tener estos gases sobre la vida útil de los alimentos también presentan algunas desventajas. En el caso del uso de atmósferas modificadas con alto contenido en oxígeno, la oxidación lipídica de FA en carne y pescado puede verse favorecida en comparación con el empleo de un envasado al vacío (Ruiz-Capillas y Moral, 2001; Veberg et al.,

2006; Xiao et al., 2011; Peng et al., 2019). Sin embargo, el uso del envasado al vacío ha mostrado una menor eficacia en la prevención del crecimiento de microorganismos en comparación con el uso de determinadas atmósferas modificadas en la conservación de ciertas especies de pescado (Gallmann, 2003; Bouletis et al., 2017). Otra desventaja del envasado al vacío es que existe un mayor riesgo de que se perfora el material de envasado y se pierda el vacío, sobre todo cuando el alimento tiene partes afiladas o punzantes (Gill y Gill, 2005; Iglesias et al., 2006). El empleo del dióxido de carbono en atmósferas modificadas presenta el inconveniente de que su elevada solubilidad en el alimento puede producir cambios físico-químicos, resultando, por ejemplo, en un exudado (Gallmann, 2003; Iglesias et al., 2006). La desventaja del nitrógeno es que, si se emplea como único gas en la atmósfera modificada, favorece la proliferación de microorganismos anaerobios (Iglesias et al., 2006). Debido a las diferentes propiedades de cada gas, la atmósfera modificada seleccionada en cada caso dependerá de la composición del alimento que se desee preservar.

El envasado de alimentos ha ido evolucionando con el paso del tiempo también en términos de diseño de nuevos materiales de envasado. El motor de esta evolución ha sido la búsqueda de un equilibrio entre la garantía de conservar las propiedades del alimento que lo hacen competitivo, incrementar la comodidad de cara al consumidor y la sostenibilidad económica y medioambiental (Marsh y Bugusu, 2007). En términos de una mejora medioambiental, cabe destacar el interés de la comunidad científica en la búsqueda de envases elaborados con materiales biodegradables o con plásticos monocomponentes para facilitar su reciclado. Los envases biodegradables pueden estar elaborados con compuestos formadores de películas (las proteínas, los polisacáridos o los lípidos), plastificantes (como la glicerina, el propilenglicol, el sorbitol, la sacarosa o el polietilenglicol) y aditivos (antioxidantes, antimicrobianos nutracéuticos o emulsionantes) (Han, 2014). Algunos de estos materiales de base orgánica previenen la pérdida de humedad, reducen la oxidación de lípidos, mejoran el sabor, retienen el color y estabilizan las características microbianas de los alimentos (Cutter, 2006). Consecuentemente, el empleo de dichos materiales en envases para alimentos puede tener un impacto positivo en la conservación de estos, constituyendo los denominados envases activos. El término de envase activo es aplicable cuando el material del envasado presenta funciones adicionales a la de constituir una barrera protectora e inerte que separa el alimento del entorno exterior (EU, 2009). Entre las sustancias más estudiadas para la

fabricación de envases biodegradables y activos para la conservación de carne y pescado se encuentra el quitosano debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Moradi et al., 2010; Ahmed et al., 2017; Olatunde y Benjakul, 2018).

Un parámetro importante para lograr una correcta conservación de los alimentos es la temperatura de almacenaje. En general, la conservación de carne y pescado a baja temperatura ayuda a prevenir todos los cambios bioquímicos, microbiológicos, físicos y fisiológicos que pueden provocar la degradación de estos alimentos (Gill y Gill, 2005; James y James, 2014). Concretamente, la oxidación lipídica incrementa de manera exponencial con la temperatura, ya que la temperatura puede promover la etapa de iniciación y afecta a la cinética de las diferentes etapas (Amaral et al., 2018; Farhoosh, 2021). Además, la efectividad de los diferentes tipos de sistemas de envasado protectores es altamente dependiente de la temperatura de conservación. Por ejemplo, el uso de bajas temperaturas reduce el riesgo de que se produzcan modificaciones en la composición de atmósferas modificadas con CO₂ (Gallmann, 2003). A pesar de que las bajas temperaturas favorecen la conservación de los alimentos, hay que tener en cuenta que, en los productos congelados, la variación de temperaturas puede ser contraproducente en términos de estabilidad oxidativa. Con la congelación se pueden formar cristales de hielo de diferente tamaño, que pueden provocar la ruptura de células y la liberación de sustancias pro-oxidantes, incrementando este riesgo con el aumento del tamaño de los cristales (Thanonkaew et al., 2006; Leygonie et al., 2012). Por este motivo, diversos autores han mostrado una preferencia por el uso de temperaturas bajas que permitan la conservación del alimento, pero sin que llegue a congelarse (Gill y Gill, 2005; Xiong, 2017). Al igual que en el caso del envasado de alimentos, también se han producido avances en el desarrollo de nuevas tecnologías de enfriado o congelado, como el superenfriamiento (*superchilling*) o el congelado a alta presión (*high pressure freezing*) (Kaale et al., 2011; Zhan et al., 2018). Estas nuevas tecnologías producen cristales de hielo de pequeño tamaño, logrando una menor alteración de la estructura celular del alimento.

Por último, la degradación de FA también se ve facilitada por la radiación ultravioleta de la luz natural mediante el mecanismo conocido como fotooxidación lipídica, mencionado al inicio de este apartado. En este proceso, la radiación produce la excitación de determinadas sustancias conocidas como fotosensibilizantes, como la mioglobina o la hemoglobina (Tsubone

et al., 2021). Además, la exposición de los alimentos a las energías radiantes puede causar otro tipo de cambios no deseados en el alimento, como la oxidación de proteínas (Schaich, 1980). Para evitar la degradación del alimento debido a estas reacciones es recomendable la conservación de los alimentos en oscuridad y el uso de materiales de envasado capaces de absorber la radiación ultravioleta.

2.3.3 *Alteración de las propiedades físico-químicas y organolépticas de la carne y del pescado*

El valor sensorial de la carne y del pescado se define por las propiedades organolépticas de estos alimentos. Estas propiedades son la firmeza, la jugosidad, la terneza, el color y el sabor y están condicionadas por los lípidos presentes en este tipo de alimentos. La primera propiedad de los alimentos que permite al consumidor realizar una valoración sobre la calidad es el color. El color de la carne y del pescado se debe a la presencia de pigmentos en estos alimentos, que puede estar influida por la composición de la dieta del animal (Doppenberg y van der Aar, 2017; Lebret y Čandek-Potokar, 2022). Por un lado, la fuente lipídica empleada en el pienso puede aportar determinados pigmentos de carácter liposoluble (sobre todo carotenoides y clorofilas) en función de diversos factores, entre ellos de su origen botánico. En el caso del uso de subproductos de la refinación, cabe esperar que el aporte de pigmentos sea diferente al del aceite o grasa cruda. Por ejemplo, en el caso de los AO es posible que se produzca una concentración de estos pigmentos, puesto que una parte de ellos es eliminada durante la etapa de neutralización (apartado 2.1.1). Por otro lado, los cereales incluidos en la formulación de dietas también presentan diferentes pigmentos que pueden ser absorbidos por el animal (Voutilainen et al., 2006; Grashorn, 2016). Además, el uso de aditivos pigmentantes en la elaboración de piensos para animales suele ser una práctica bastante común, sobre todo en el caso de piensos para pollo (Grashorn, 2016) y en algunas especies de peces, como los salmones (Lim et al., 2018; Pereira da Costa y Campos Miranda-Filho, 2019). La absorción y deposición de estos pigmentos depende de múltiples factores entre los que se encuentran la especie animal o el músculo estudiado.

Un pigmento que requiere especial atención en el caso de la carne es la mioglobina, puesto que es responsable del color rojo característico de esta (Suman y Nair, 2017). La mioglobina se puede encontrar en tres estados de oxidación diferentes, que son la oximioglobina, deoximioglobina y la metamioglobina. Así, los fundamentos detrás del color de la carne y su

estabilidad están directamente relacionados con la bioquímica de la mioglobina (Figura 2.9). Estos estados de la mioglobina se encuentran localizados en diferentes capas de la carne, siendo la oximioglobina la especie mayoritaria en la superficie, mientras que la deoximioglobina prima en la capa más interna (Mancini y Hunt, 2005). Existen múltiples factores que pueden promover la formación de los diferentes estados de la mioglobina. Por ejemplo, un consumo de oxígeno de la atmósfera debido a reacciones bioquímicas del alimento, como la oxidación lipídica, favorece la formación de deoximioglobina y metamioglobina y, consecuentemente, una pérdida del color rojo brillante característico de la carne fresca. Esto implica que la estabilidad del color de los tejidos animales depende de su actividad respiratoria, presentando un color menos estable cuanto mayor sea dicha actividad (Gill y Gill, 2005). A pesar de que la decoloración de la carne se suele referir al área superficial cubierta por metamioglobina, las formas subsuperficiales también intervienen en la apariencia de la carne (Mancini y Hunt, 2005).

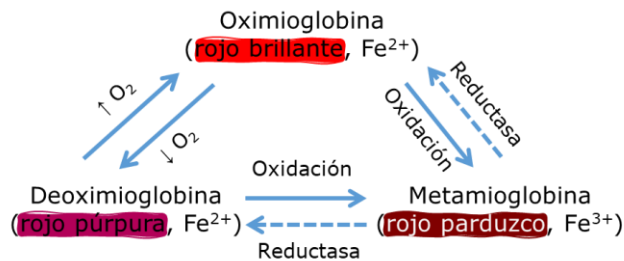


Figura 2.9 Estados de oxidación de la mioglobina en la carne cruda.

Adaptado de Cooksey (2013).

Existen multitud de estudios que han indicado la existencia de una relación entre los procesos de oxidación lipídica y la decoloración de la carne, de tal manera que los productos generados en cada uno de estos procesos puede acelerar el otro (Faustman et al., 2010). Consecuentemente, el uso de dietas ricas en PUFA en animales monogástricos, puede resultar en productos alimenticios con una menor estabilidad oxidativa (apartados 2.3.1 y 2.3.2) y más susceptibles a sufrir una decoloración (Faustman et al., 2010). Por tanto, las condiciones de conservación de la carne pueden ser determinantes a la hora de prevenir modificaciones en el color (Gill y Gill, 2005). Además, el uso de determinadas atmósferas modificadas permite lograr una mayor estabilidad del color en carne (DeWitt y Oliveira, 2016). En este sentido, las atmósferas modificadas con alto contenido en oxígeno, promueven el mantenimiento y la formación de oximioglobina, que puede penetrar hacia las

capas internas de la carne (Mancini y Hunt, 2005) y contribuir al color rojo brillante que los consumidores suelen asociar a la carne fresca.

La terneza y la jugosidad están consideradas como las propiedades más importantes de la carne fresca (Lebret y Čandek-Potokar, 2022). Los cambios en estos atributos han sido relacionados más con el contenido total de lípidos en los tejidos animales que con la composición en FA de estos (Wood et al., 2004b; Lee et al., 2019). Generalmente, un mayor contenido en agua y/o de lípidos en este tipo de alimentos en el momento de su consumo conlleva un aumento de la jugosidad (Baéza et al., 2022). Algunos autores han sugerido que la dieta y el sistema de alimentación empleados durante la cría de animales pueden influir en el porcentaje depositado de lípidos en los tejidos de estos. Por ejemplo, según los resultados de Lebret (2008) el porcentaje lipídico depositado en cerdo depende de la composición nutricional de la dieta usada, concretamente de la relación entre el contenido proteico y la energía. Sin embargo, existen diversos estudios que sugieren que dietas con un elevado contenido en PUFA pueden resultar en una reducción del depósito abdominal de lípidos en pollo o en el contenido de grasa intramuscular en cerdo (Cameron et al., 2000; Crespo y Esteve-García, 2001; Alfaia et al., 2019). Por tanto, en algunos casos, dietas ricas en PUFA podrían llegar a afectar a la jugosidad y a la terneza de la carne. En acuicultura, cabría esperar que la sustitución de FO por fuentes lipídicas vegetales en piensos resultase en la modificación de las diferentes propiedades organolépticas. Sin embargo, la información existente en la bibliografía sobre el efecto del uso de aceites y grasas vegetales en piensos para diferentes especies de peces sobre propiedades físico-químicas y organolépticas del pescado es contradictoria (Turchini et al., 2009; Nasopoulou y Zabetakis, 2012; Oliva-Teles et al., 2015).

La firmeza de la carne y el pescado está directamente relacionada con el perfil lipídico de estos alimentos. El motivo es el diferente punto de fusión que poseen los FA en función de la longitud de la cadena y del grado de insaturaciones (Doppenberg y van der Aar, 2017). De esta manera, el uso de fuentes lipídicas ricas en PUFA en los piensos de animales monogástricos puede dar lugar a carne más blanda (Feed Energy Company, 2014; Mir et al., 2017; Lee et al., 2019). Concretamente, el PUFA propuesto como el más adecuado para predecir la firmeza en carne es el ácido linoleico, ya que se ha observado una gran correlación negativa entre ambos en diferentes tejidos de cerdo (Wood et al., 2008).

El sabor y el aroma del filete de pescado y de la carne son parámetros complejos de describir, siendo las características organolépticas más aceptables dependientes de un gran número de factores, como la especie animal de la que proceden. En el caso de la carne, el olor y el sabor surgen principalmente cuando son tratados térmicamente. Así, cuando se cocinan, los lípidos y los componentes hidrosolubles forman varios compuestos volátiles, principalmente mediante la degradación de lípidos y reacciones de Maillard o mediante reacciones entre sus productos (Font i Furnols y Guerrero, 2014). Los compuestos volátiles presentes en la carne y el pescado son, por tanto, determinantes de la aceptación sensorial por parte del consumidor. Consecuentemente, otro efecto negativo que puede derivar del incremento de la proporción de PUFA en carne es el desarrollo de olores y sabores poco agradables para el consumidor, debidos a la formación de compuestos volátiles durante el proceso de oxidación lipídica (apartado 2.3.2). Por este motivo, tal y como se ha descrito en la revisión bibliográfica realizada por Bou et al. (2009), se han estudiado diversas estrategias, como el uso de antioxidantes en las dietas, para evitar que un aumento de PUFA n-3 en carne de aves de corral conlleve un detrimento de su calidad sensorial. Sin embargo, estas estrategias no siempre son efectivas. Por ejemplo, en el estudio realizado por Bou et al. (2004), no se observó un efecto significativo del contenido de acetato α -tocoferilo en dietas con diferentes dosis de FO en la aceptación sensorial de carne de pollo. En cuanto al efecto que puede tener el empleo de diferentes aceites vegetales en dietas animales sobre las características sensoriales de la carne, los resultados de Bou et al. (2001) mostraron un mayor olor y sabor a rancio en carne de pollo procedente de animales alimentados con un 6% de aceite de linaza que en aquella procedente del uso de un 6% de aceite de girasol o sebo tras 13 meses de congelación. Sin embargo, en ese mismo estudio, no se observaron diferencias significativas ni en el aroma ni en el sabor a rancio de la carne de pollo cuando se adicionó un aceite de girasol oxidado (tras permanecer 12h a 160°C) en vez del aceite de girasol crudo.

En el caso de la carne de cerdo, según la revisión bibliográfica realizada por Font i Furnols y Guerrero (2014), el sabor es la característica organoléptica más importante de cara a la satisfacción del consumidor. Un aspecto que puede influir en la aceptación sensorial de este tipo de carne es el sexo del animal, ya que la carne procedente de cerdos macho sin castrar puede mostrar olores y sabores más fuertes. Esto es un defecto sensorial, conocido en inglés como *boar taint*, que está relacionado principalmente con

la presencia de androstenona (α -androst-16-en-3-one,) y escatol (3-metilindol), que puede llegar a ser detectado por los consumidores incluso en carne fresca y cruda y, por tanto, puede conllevar una disminución de la aceptación sensorial (Font i Furnols y Guerrero, 2014).

En el caso del pescado, también se podrían producir cambios en el aroma según diversos factores, como la modificación del perfil de FA de este, ya que la oxidación de diferentes tipos de FA puede dar lugar a la formación de compuestos volátiles distintos (Turchini et al., 2009). No obstante, algunos científicos no han obtenido diferencias en el análisis sensorial del pescado cuando se emplean fuentes lipídicas vegetales en las dietas (Montero et al., 2005; Sioriki et al., 2015). En otros casos, las diferencias sensoriales encontradas entre filetes procedentes de peces alimentados con dietas suplementadas solo con FO o con aceites o grasas vegetales desaparecen tras una etapa de lavado o *washing out* (apartado 2.3.1) (Regost et al., 2003; Torstensen et al., 2004).

3 RESEARCH GAPS, HYPOTHESES AND AIMS



According to all the aforementioned, the enhancement of the use of AO (*Acid oil*) in animal feeding can lead to an increase in the value of these by-products and to an improvement in the food chain sustainability. However, the impact that the use of these by-products as lipid sources in animal diets can have on the final quality of food products obtained from these animals is unknown. Therefore, the literature background (see section 2) has shown that the following knowledge gaps still exist:

- Although the possibility of modifying the FA (*Fatty acid*) profile of fish fillet and meat by changing the lipid source used in diets for monogastric animals has been widely demonstrated, the number of studies performed with by-products from the refining of vegetable oils is minimal (section 2.3.1). The FA profile of these by-products is related to their botanical origin and, therefore, is often similar to the FA composition of their corresponding crude oils. However, the high content of FFA (*Free fatty acid*) commonly found in these by-products could potentially impact the overall lipid digestibility or the digestibility of specific FA, which might alter the FA profile of the tissues of these animals. For this reason, to enhance the use of AO in animal feeding, it is necessary to perform studies with AO that are representative of those found in the market and to characterize them adequately, since it is common to find mixtures of AO with different botanical origins.
- As mentioned in section 2.3.3, lipid oxidation depends largely on the FA composition of the fish fillet and meat, as the trend to suffer lipid oxidation increases with the number of unsaturated bonds in FA. Consequently, the fat or oil added to animal diets can affect the oxidative stability of fish fillet and meat, which is a fact that has been widely reported with the use of different crude vegetable oils in diets of different species (section 2.3.3). However, the information regarding the use of by-products is scarce, especially in the case of AO. Since the FA profile of AO is determined by their botanical origin, it would be expected that the use of AO in animal diets would affect the oxidative parameters of fish fillets and meat similarly to crude oils with the same botanical origin. Nevertheless, AO can show some differences in their composition in comparison to their corresponding crude oil, since these by-products tend to accumulate non-energetic substances (section 2.1.2). Whereas some of these substances have antioxidant activity, such as tocopherols (T) and tocotrienols (T3), other ones might impair oxidative stability. This, together with the great

compositional variability of AO, make it essential to evaluate the impact of their use in animal feeding on the oxidation parameters of the fish fillet and meat in order to enhance such use.

- Color and sensory acceptance are two of the quality parameters of fish fillet and meat that are perceptible by consumers, which is the reason why there has been great interest in their study (section 2.3.3). However, the effect of the use of different oils or fats in animal feeding on color and sensory acceptance of fish and meat has been less addressed than their impact on lipid composition or lipid oxidation. In terms of color, AO tend to accumulate and concentrate pigments, which is why they usually show a different color than crude or refined oils. This differentiation in pigment content could cause color variation in fish fillet and meat. On the other hand, color changes commonly occur simultaneously with the development of lipid oxidation (section 2.3.3), so variations in the color of fish fillet and meat can be expected when lipid oxidation occurs. Moreover, secondary oxidation compounds can alter the odor and flavor of fish fillet and meat, which may lead to a lower sensory acceptance. Therefore, a loss of consumers' acceptance can be expected with the development of lipid oxidation reactions. Overall, there is a lack of studies that allow inferring the effect of the use of AO in animal feeding on the color and sensory acceptance of fish fillet and meat. To increase the confidence in AO as lipid sources in animal feeding it is necessary to cover this research gap.
- Nowadays, the information available regarding the use of by-products coming from edible oil refining in general, and AO in particular, is focused on giving answers to meat and fish producers, since the studies performed aimed to assess their impact on animal performance. However, the last step in the food supply chain, which is the one that determines its configuration, has not been considered. This last step is the consumer, whose satisfaction has always been one of the main targets of the food industry and food research. For this reason, it is necessary to focus the studies of AO in animal feeding on a commercial scenario, which implies that usual commercial conditions should be applied during each step of fish fillet and meat production chains.

Consequently, to increase confidence in AO from farmers to consumers, it is necessary to carry out studies that fill all these research gaps, which is what this doctoral thesis pursues to do. Therefore, the **general objective** of this thesis is to evaluate the effect of using certain AO as lipid sources in diets for monogastric animals on the lipid composition, oxidative stability, and quality, in terms of color and sensory acceptance, of fish fillet and meat produced reproducing commercial conditions. Specifically, this thesis targets three different monogastric animals: European seabass (*Dicentrarchus labrax*), pigs [(Landrace x Large White) x Duroc], and chickens (Ross 308). To perform the studies following the usual commercial conditions, this thesis aims to evaluate fish fillet and meat, not only in fresh form but also after refrigerated storage under the commercial conditions usually applied in each case.

Based on the existing scientific literature, different hypotheses and the corresponding specific objectives have been established to address this general purpose.

3.1 Evaluation of lipid composition of fish fillet and meat

The **first hypothesis** is that the FA profile and the T (*Tocopherol*) and T3 (*Tocotrienol*) content of fish fillet and meat will reflect the composition of the diet used and, therefore, the lipid source added to that diet. Consequently, the FA and T and T3 composition of fish fillet and meat will be influenced mainly by the botanical origin of the added lipid source, so the effects will be similar when using an AO or its corresponding crude or refined oil.

In relation to this hypothesis, the **first specific objective** of this thesis is to evaluate if the use of AO instead of their corresponding crude or refined oils in animal diets affects the FA profile and T and T3 content in fresh fish fillet and meat.

3.2 Evaluation of lipid oxidation and oxidative stability of fish fillet and meat

The **second hypothesis** is that, due to their similar FA composition, the use of AO in diets will have similar effects on lipid oxidation of fish fillet and meat as the use of crude oils with the same botanical origin, as long as other compositional parameters do not highly differ from the latter.

On the other hand, during the refrigeration period under commercial conditions, a development of lipid oxidation is expected, and the magnitude

of this development will depend on the lipid composition of fish fillet and meat. Due to the antioxidant activity of T and T3, a decrease in the concentration of these compounds can occur, especially if the development of lipid oxidation is high.

The **second specific objective** is to evaluate the impact of the use of AO in animal diets instead of their corresponding crude or refined oils on primary and secondary lipid oxidation and oxidative stability of fresh fish fillet and meat and after refrigeration under commercial conditions, as well as the effect of the refrigeration on T and T3 content.

3.3 Evaluation of color and sensory acceptance of fish fillet and meat

The **third hypothesis** is that the trend of AO to accumulate pigments can lead to changes in the color of fish fillet and meat from animals fed with these by-products compared to those from animals fed with the corresponding crude or refined oils. The sensory acceptance may be influenced mainly by the FA profile of fish fillet and meat, so it is expected that using an AO in the diet rather than its corresponding crude or refined oil will not alter this parameter.

Regarding refrigeration under commercial conditions, it is expected that changes in the color of fish fillet and meat will be observed after the refrigeration period, as they usually occur together with lipid oxidation. Similarly, the formation of secondary oxidation compounds can alter the flavor of fish fillet and meat, and, therefore, a lower sensory acceptance can be expected after the refrigeration.

The **third specific objective** of this doctoral thesis is to evaluate the effect of using AO instead of their corresponding crude or refined oils in animal diets on the quality, in terms of color and sensory acceptance, of fresh fish fillet and meat, and after refrigeration under commercial conditions.

4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA



Para poder cumplir el objetivo general y los específicos de la presente tesis, se han diseñado tres estudios independientes, realizándose cada uno de ellos con una especie de animal monogástrico distinta: lubinas (*Dicentrarchus labrax*), cerdos [(Landrace x Large White) x Duroc] y pollos (Ross 308). En los tres estudios, se ha contemplado el aceite ácido de orujo de oliva (OPAO, *Olive pomace acid oil*) como uno de los posibles aceites ácidos (AO, *Acid oil*) a revalorizar como fuente lipídica en alimentación animal. Así mismo, en el diseño de los tres estudios se han incluido aceites crudos o refinados a modo de control para evaluar el uso de los AO y, en cada uno de ellos, se ha considerado la práctica habitual del sector correspondiente. En este sentido, el estudio con lubinas estaba orientado a la evaluación de los AO como posibles sustitutos parciales del aceite de pescado (FO, *Fish oil*) en vez de los aceites crudos, mientras que en cerdos y pollos el objetivo era su empleo como única fuente lipídica añadida a la dieta basal.

En los tres estudios, la crianza, manejo y sacrificio de animales se realizaron reproduciendo condiciones comerciales. Por tanto, todos los procedimientos relativos a la crianza de los animales se realizaron de acuerdo con el Comité de Revisión del Protocolo Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) y conforme a la directiva 2010/63/EU (EU, 2010) o conforme a la normativa europea vigente para la producción comercial de alimentos de origen animal. Además, tanto el filete de lubina como la carne de cerdo y pollo se evaluaron en fresco (es decir, tras el mínimo tiempo necesario para su obtención después del sacrificio de los animales) y tras un período de refrigeración, empleando las condiciones comerciales más habitualmente aplicadas para cada uno de los productos animales. A continuación, se detalla el diseño experimental seguido en cada uno de estos estudios.

4.1 Diseño experimental del estudio con lubinas

El estudio con lubinas estaba enfocado a evaluar el uso de dos tipos de AO frente al uso de aceites vegetales crudos para la sustitución parcial del FO como fuente lipídica en piensos. Por ello, se emplearon cinco grasas diferentes como fuentes lipídicas de las dietas: un FO desgomado; dos aceites crudos de diferente origen botánico, concretamente de soja (SO, *Crude soybean oil*) y de orujo de oliva (OPO, *Olive pomace oil*); y dos AO con un perfil de FA similar al de los aceites crudos. Uno de los AO era una mezcla de AO de soja y de AO de girasol, representativa de un tipo de AO rico en PUFA n-3 con una elevada disponibilidad en el mercado español. Concretamente, la mezcla empleada en este estudio de AO de soja y de girasol era al 55:45 (p/p) y aparece abreviada en esta tesis como SAO (*Soybean-sunflower (55:45; w/w) acid oil*), mientras que el otro subproducto evaluado era un OPAO. Se tomaron muestras de todas las grasas, que fueron alicuotadas en diferentes viales, conservados a -20°C y bajo corriente de N₂ hasta la realización de las diferentes determinaciones analíticas. La información sobre los proveedores y composición se detalla en el apartado 2.1. *Experimental fats* del primer artículo de esta tesis (apartado 5.1).

Tal y como muestra la Figura 4.1, con estas fuentes lipídicas se elaboraron cinco dietas, todas ellas con 15,4% (p/p) de grasa total añadida. En una de las dietas, empleada como control, la grasa añadida era un 100% de FO, mientras que en el resto se mantuvo en un 25% para garantizar el aporte de EPA y DHA recomendado para lubinas (NRC, 2011). Los ingredientes empleados para la fabricación de las diferentes dietas y la composición proximal de las mismas se recogen en el apartado 2.2. *Animals and diets* del primer artículo de esta tesis (apartado 5.1). Las muestras tomadas de los piensos fueron homogeneizadas y conservadas en diferentes bolsas a vacío y a -20°C hasta que fueron analizadas.

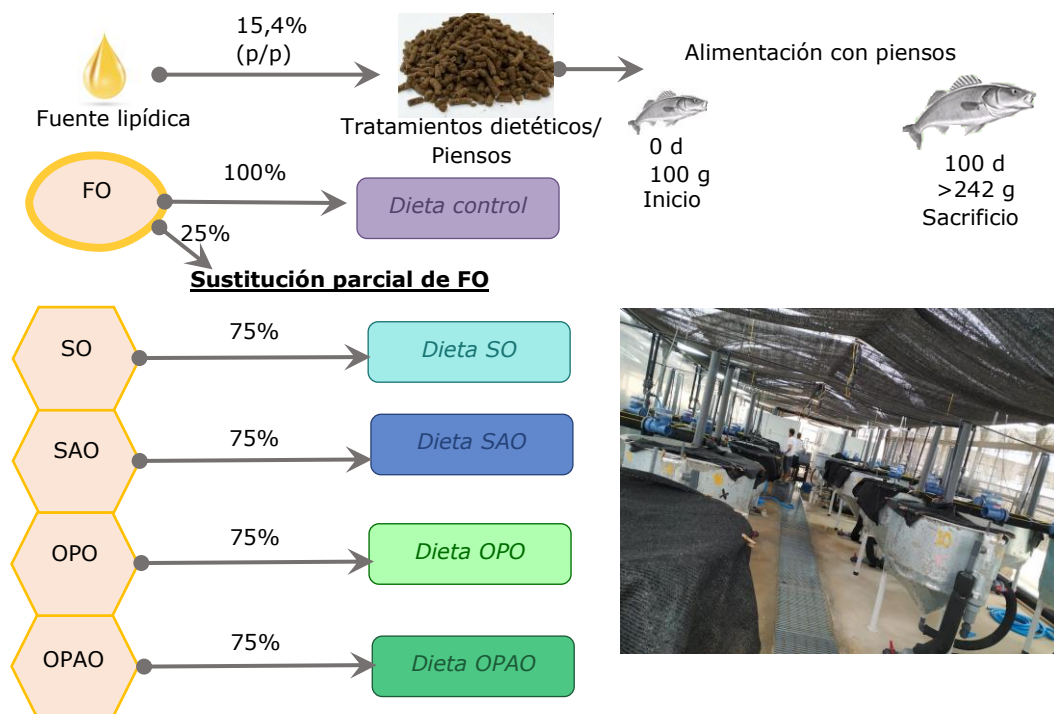


Figura 4.1 Diseño experimental del estudio con lubinas: fuentes lipídicas empleadas, tratamientos dietéticos elaborados a partir de las fuentes lipídicas y esquema temporal. Abreviaturas: FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite de orujo de oliva crudo; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva.

La cría de peces se realizó en el Centro de Acuicultura del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA, *Institute of Agrifood Research and Technology*) situado en Sant Carles de la Ràpita (España), siguiendo las condiciones descritas en el apartado 2.2. *Animals and diets* del primer artículo de esta tesis (apartado 5.1). Para la realización de este estudio, se distribuyeron 300 especímenes de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en 15 tanques, repartiendo entre ellos las cinco dietas experimentales de manera aleatoria (3 tanques por dieta).

Una vez realizado el sacrificio de los peces por hipotermia (tras 100 días de estudio), se tomaron muestras de filete de pescado sin piel para generar cinco réplicas experimentales por cada tratamiento dietético, cada una de ellas creada según el esquema de la Figura 4.2. Los filetes de cada réplica se distribuyeron en dos lotes, uno empleado para el estudio de filete fresco y el otro para el estudio replicando la refrigeración en condiciones comerciales (2°C y atmósfera modificada de CO₂/N₂/O₂, 40/30/30) durante 6 días. Tras la homogeneización de las muestras, se realizó la determinación del color y, parte de la muestra se dividió en diferentes bolsas de vacío para la posterior

realización de los análisis químicos, mientras que otra parte se mezcló con otras muestras del mismo tratamiento dietético para evaluar la aceptación sensorial (Figura 4.2).

Mismo tratamiento dietético (FO, SO, SAO, OPO u OPAO)

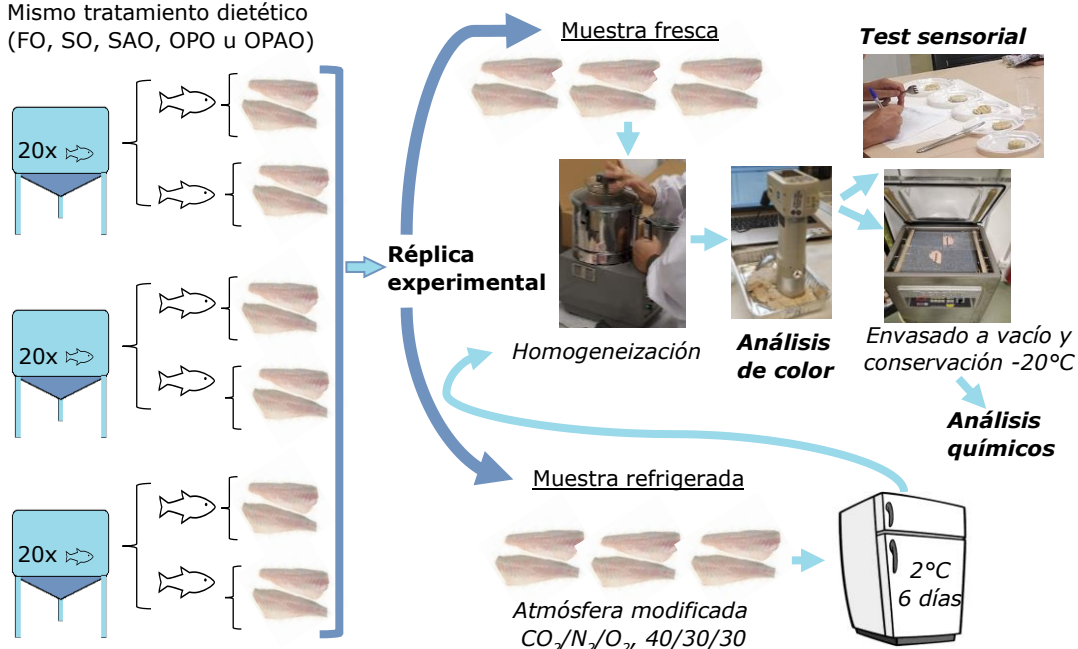


Figura 4.2 Sistemática seguida para generar cada una de las réplicas experimentales dentro de cada tratamiento dietético y para preparar y procesar las muestras de filete de lubina frescas y refrigeradas.

Abreviaturas: FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite de orujo de oliva crudo; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva.

De acuerdo con este diseño experimental, en el estudio con lubinas se evaluaron: 5 muestras de grasas; 5 muestras de piensos y 50 muestras de filete de lubina, de las cuales 25 correspondían a filete de pescado fresco (5 réplicas x 5 tratamientos dietéticos) y las otras 25 a filete de pescado refrigerado (5 réplicas x 5 tratamientos dietéticos). La metodología analítica aplicada a cada tipo de muestra se encuentra descrita en los apartados 4.4, 4.5, 4.6.

4.2 Diseño experimental del estudio con cerdos

El diseño del estudio con cerdos se realizó con el objetivo de evaluar el uso de OPAO en lugar de un OPO, o de manteca de palma (PO, *Crude palm oil*) como fuentes lipídicas en piensos, siendo estos dos últimos frecuentemente utilizados en piensos de cerdo de engorde. Por lo tanto, se utilizaron tres fuentes lipídicas distintas: PO, OPO y OPAO, de las que se tomaron muestras que fueron conservadas en diferentes viales a -20°C y bajo corriente de N_2 hasta su caracterización. La información sobre los proveedores se detalla en el apartado 2.1. *Experimental fats* del segundo artículo de esta tesis (apartado 5.2).

Tal y como esquematiza la Figura 4.3, a partir de estas fuentes lipídicas, se diseñaron cuatro tratamientos dietéticos con un 5% (p/p) de cada grasa o de una mezcla de PO y OPAO (50/50; p/p), abreviado como B (*Blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w)*). Para la fabricación de los piensos se usaron dos dietas basales diferentes, una de crecimiento (*grower diet*) y una de finalización (*finisher diet*). Por tanto, los piensos empleados en este estudio eran el resultado de adicionar un 5% de una de las grasas (PO, OPO u OPA) o de B a una de las dietas basales (Figura 4.3). Consecuentemente, se emplearon un total de ocho piensos diferentes en el estudio con cerdos (2 dietas basales x 4 tratamientos dietéticos). Los ingredientes empleados para la fabricación de las diferentes dietas y la composición proximal de las mismas se recogen en el apartado 2.2. *Animals and diets* del segundo artículo de esta tesis (apartado 5.2).

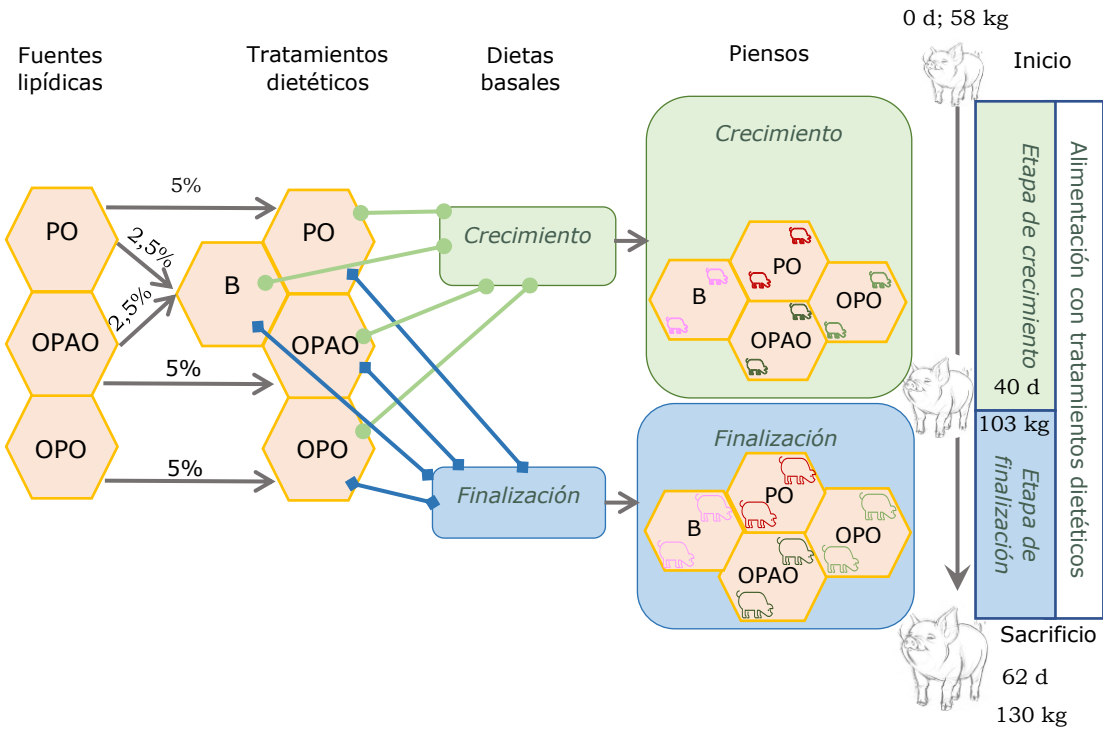


Figura 4.3 Diseño experimental del estudio con cerdos: fuentes lipídicas empleadas, tratamientos dietéticos, dietas basales utilizadas en la elaboración de piensos, piensos elaborados y esquema temporal.
 Abreviaturas: PO, manteca cruda de palma; OPO, aceite de orujo de oliva crudo; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p).

La cría de animales se realizó en las instalaciones experimentales de bonÀrea Agrupa (granja Nial, Guissona, España), empleando 226 cerdos [(Landrace x Large White) x Duroc] de ambos sexos. Los detalles de estas instalaciones se encuentran especificados en el apartado 2.2. *Animals and diets* del segundo artículo de esta tesis (apartado 5.2). Los cuatro tratamientos dietéticos fueron distribuidos aleatoriamente entre los diferentes corrales, contando con 12 corrales por tratamiento dietético (6 corrales por cada sexo). Los cerdos de un mismo corral se alimentaron durante todo el estudio con la misma fuente lipídica. Sin embargo, la dieta basal empleada durante los 40 primeros días era la de crecimiento, mientras que desde ese momento hasta el final del estudio se utilizó la de finalización (Figura 4.3).

Tras el sacrificio, se tomaron muestras de lomo de cerdo (*longissimus dorsi*) entre L2 y L5 y se generaron 8 réplicas experimentales por cada tratamiento dietético (4 réplicas por cada sexo). De cada cerdo se tomaron dos porciones idénticas de lomo y cada réplica experimental estaba formada por las dos porciones de lomo de dos cerdos diferentes, alimentados con el mismo

tratamiento dietético y del mismo sexo (Figura 4.4). Una porción de lomo de cada cerdo se destinó al lote de muestra fresca y el otro al de muestra refrigerada en condiciones comerciales (3 – 4°C y atmósfera modificada de CO₂/O₂, 70/30) durante 8 días (Figura 4.4). Las muestras frescas y refrigeradas fueron procesadas según la sistemática esquematizada en la Figura 4.4. Para más detalle de las condiciones de sacrificio y la toma de muestra ver apartado 2.2. *Animals and diets* del segundo artículo de esta tesis (apartado 5.2).

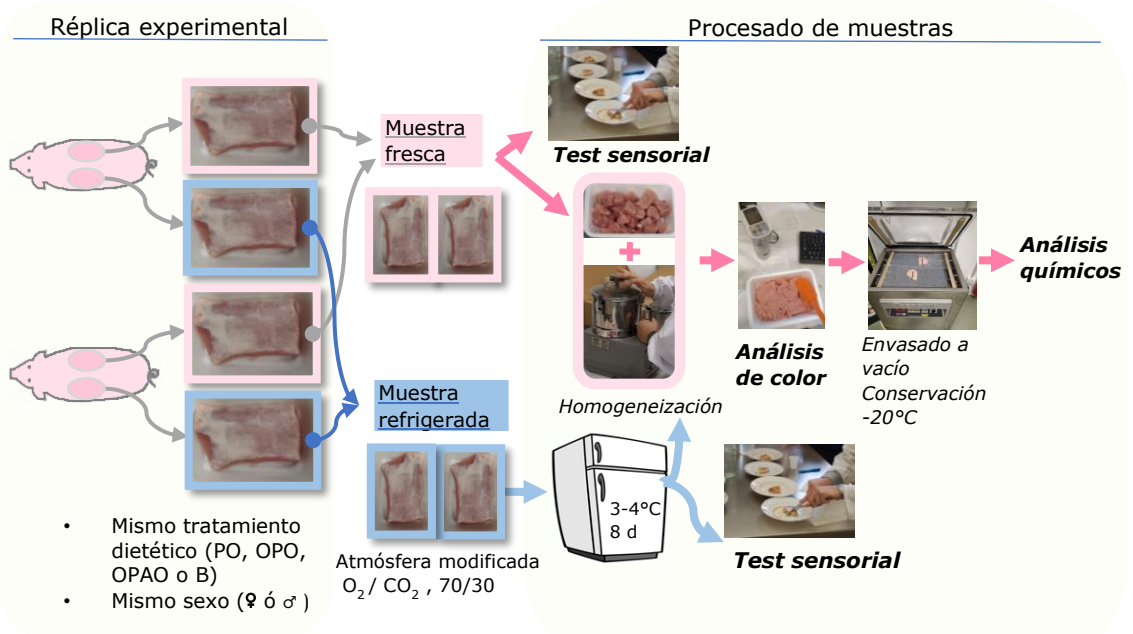


Figura 4.4. Sistemática seguida para generar cada réplica experimental dentro de un mismo tratamiento dietético a partir de cerdos del mismo sexo y para preparar y procesar las muestras de lomo de cerdo frescas y refrigeradas.

Abreviaturas: PO, manteca cruda de palma; OPO, aceite de orujo de oliva crudo; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p).

De acuerdo con este diseño experimental, el número de muestras obtenidas en el estudio con cerdos fueron: 3 muestras de grasas, 8 muestras de piensos y 64 muestras de lomo de cerdo, de las cuales 32 correspondían a lomo de cerdo fresco (4 réplicas x 2 sexos x 4 tratamientos dietéticos) y las otras 32 a lomo de cerdo refrigerado (4 réplicas x 2 sexos x 4 tratamientos dietéticos). La metodología analítica aplicada a cada tipo de muestra se encuentra descrita en los apartados 4.4, 4.5 y 4.6.

4.3 Diseño experimental del estudio con pollos

El estudio con pollos se diseñó para abordar el uso del OPAO como fuente lipídica en pienso para pollos de engorde, empleando como controles el aceite de orujo de oliva refinado (ROPO, *Refined olive pomace oil*) y la PO. La selección de estos dos controles se debe a que el ROPO presenta una composición de FA similar a la del OPAO, pero un contenido en ácidos grasos libres (FFA, *Free fatty acids*) y en la suma de la fracción de humedad más materia volátil, la fracción de impurezas insolubles y la fracción de materia insaponificable (MIU, *Moisture and volatile matter + Insoluble impurities + Unsaponifiable matter*) mucho menor; mientras que la PO es una grasa comúnmente utilizada a nivel comercial en piensos de pollo. Se tomaron muestras de todas las grasas, que se conservaron en diferentes viales a -20°C y bajo corriente de N_2 hasta su caracterización. La información sobre los proveedores se detalla en el apartado 2.1. *Experimental fats* del tercer artículo de esta tesis (apartado 5.3).

En el diseño de este estudio, esquematizado en la Figura 4.5, se evaluaron tres tratamientos dietéticos diferentes, cada uno con un 6% de una de las tres fuentes lipídicas (PO, ROPO u OPAO). Para la elaboración de los piensos se emplearon dos dietas basales diferentes (de crecimiento o de finalización) en función de la etapa de crecimiento de los pollos. De esta manera, durante el estudio se emplearon seis piensos (3 tratamientos dietéticos x 2 dietas basales). Así, los pollos de un mismo corral siempre se alimentaban con la misma fuente lipídica (PO, ROPO u OPAO) a pesar de que la dieta basal era diferente en función de la etapa (Figura 4.5). Los ingredientes empleados para la fabricación de las diferentes dietas y la composición proximal de las mismas se recogen en el apartado 2.2. *Animals and diets* del tercer artículo de esta tesis (apartado 5.3).

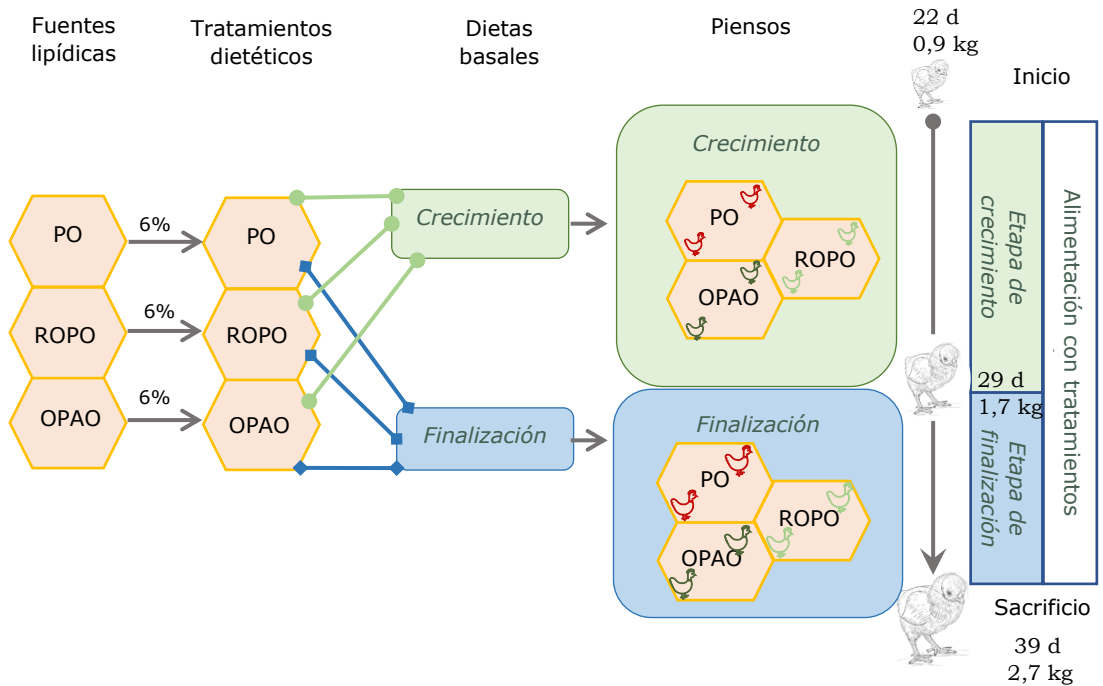


Figura 4.5 Diseño experimental del estudio con pollos: fuentes lipídicas empleadas, tratamientos dietéticos, dietas basales utilizadas en la elaboración de piensos, piensos utilizados y esquema temporal.

Abreviaturas: PO, manteca cruda de palma; OPO, aceite de orujo de oliva crudo; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva.

La cría de animales se realizó en las instalaciones experimentales de bonÀrea Agrupa (granja Nial, Guissona, España). Un total de 3 048 pollos (Ross 308) se distribuyeron en 24 corrales, asignando aleatoriamente uno de los tres tratamientos dietéticos a cada corral. En este diseño, el concepto de réplica experimental representaba un corral, por lo que al final del estudio se obtuvieron 8 réplicas experimentales por cada tratamiento. Los detalles sobre la cría de pollos se encuentran especificados en el apartado 2.2. *Animals and diets* del tercer artículo de esta tesis (apartado 5.3).

Tras el sacrificio, se tomaron las patas (conjunto de muslo y contramuslo) con piel de cuatro pollos hembra por cada corral para crear cada réplica experimental (Figura 4.6). Una pata de cada pollo se empleó para formar el lote de muestras de carne de pollo frescas, mientras que la otra se utilizó para el lote de muestras de carne de pollo refrigerada en condiciones comerciales (3 – 4°C y atmósfera modificada de CO₂/O₂, 70/30) durante 7 días. Así, una muestra fresca o refrigerada de carne de pollo estaba formada por cuatro patas deshuesadas con piel, una de cada animal seleccionado de un mismo corral. Tanto las muestras frescas como las refrigeradas se envasaron en

atmósfera modificada y se procesaron según la Figura 4.6. Para más detalle de las condiciones de sacrificio y la toma de muestra ver apartado 2.2. *Animals and diets* del tercer artículo de esta tesis (apartado 5.3).

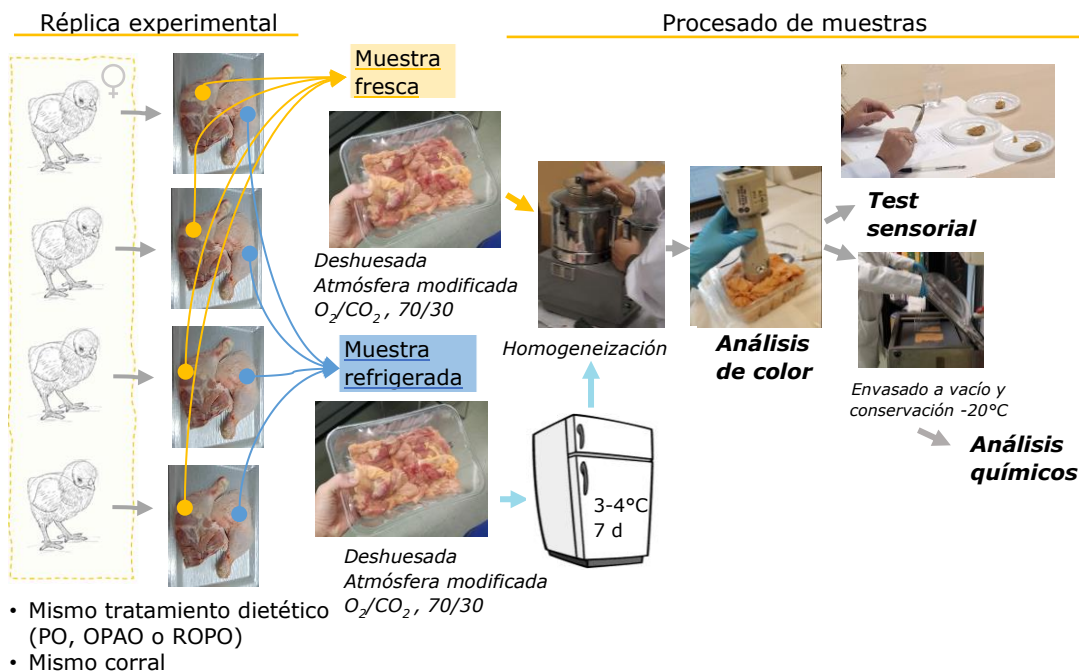


Figura 4.6 Sistemática seguida para generar cada réplica experimental dentro de un mismo tratamiento dietético a partir de pollos hembra de un mismo corral y para preparar y procesar las muestras de carne de pollo frescas y refrigeradas.
 Abreviaturas: PO, manteca cruda de palma; OPO, aceite de orujo de oliva crudo; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva.

En resumen, en el estudio con pollos se evaluaron: 3 muestras de grasas; 6 muestras de piensos y 48 muestras de carne de pollo, de las cuales 24 correspondían a carne de pollo fresca (8 réplicas x 3 tratamientos dietéticos) y las otras 24 a carne de pollo refrigerado (8 réplicas x 3 tratamientos dietéticos).

La metodología analítica aplicada para un mismo tipo de muestra (grasas, piensos o carne/filete de pescado) era similar en los tres estudios y se comenta a continuación (apartados 4.4, 4.5, 4.6.).

4.4 Metodología analítica para la caracterización de las grasas

Según lo descrito en el diseño experimental de los tres estudios con animales que forman parte de esta tesis, se han evaluado un total de 11 grasas diferentes: un FO, un SO, un SAO, dos PO, dos OPO, un ROPO y tres OPAO. Tal y como se menciona en los tres artículos de esta tesis, todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado aplicando la metodología descrita por Varona et al. (2021b), resumida en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Resumen de la metodología analítica seguida para la caracterización de las diferentes fuentes lipídicas empleadas en esta tesis.

Parámetro	Breve descripción
Humedad y materia volátil	Etapas de 1h en estufa a 58°C (T ^a mínima 56°C /T ^a máxima 60°C) y 66 mbar hasta peso constante.
Impurezas insolubles en éter de petróleo	<ul style="list-style-type: none"> - Preparación de crisoles filtrantes con Kieselgur. - Filtrado a vacío de las muestras secas disueltas en éter de petróleo sobre el crisol filtrante. - Eliminación de la humedad de los crisoles filtrantes con las impurezas. - Determinación de las impurezas por gravimetría.
Materia insaponificable	<ul style="list-style-type: none"> - Reacción de saponificación de las muestras con KOH al 50% (80°C; 45 min). - Extracción múltiple líquido-líquido de la materia insaponificable con éter dietílico. - Lavados de la fracción de éter dietílico con agua y KOH 0,5 M. - Eliminación del dietiléter en rotavapor. - Determinación de materia insaponificable por gravimetría.
Composición en ácidos grasos	<ul style="list-style-type: none"> - Derivatización de los ácidos grasos con una doble metilación: primero con CH₃NaO 0,5 N y luego con BF₃ al 14% en metanol. - Determinación por GC-FID. - Cuantificación por normalización interna de áreas.

*Todos los métodos analíticos aplicados son los publicados por Varona et al. (2021b).
Abreviaturas: GC-FID, cromatografía de gases con detector de ionización de llama; HPLC-FLD, cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fluorescencia; HPLC-RID; cromatografía líquida de alta eficacia con detector de índice de refracción; TAG, triacilgliceroles; DAG, diacilgliceroles; MAG, monoacilgliceroles; FFA, ácidos grasos libres.*

Continuación Tabla 4.1 Resumen de la metodología analítica seguida para la caracterización de las diferentes fuentes lipídicas empleadas en esta tesis.

Parámetro	Breve descripción
Contenido en tocoferoles y tocotrienoles	<ul style="list-style-type: none"> – Adición de una disolución antioxidante¹. – Reacción de saponificación de las muestras con KOH al 1,5 M en metanol (70°C; 30 min). – Extracción múltiple con éter de petróleo. – Eliminación del éter de petróleo en rotavapor. – Redisolución en éter de petróleo y filtración a vacío a través de filtro de PTFE de 0,45 µm. – Eliminación del éter de petróleo en termoblock (30°C) bajo corriente de N₂. – Determinación por HPLC-FLD. Cuantificación empleando rectas de calibrado de cada tocoferol (α, β, γ, δ).
Composición en fracciones lipídicas	<ul style="list-style-type: none"> – Disolución de la muestra en tetrahidrofurano. – Filtración a través de filtro de Nylon de 0,45 µm. – Determinación de TAG, MAG, DAG y FFA por HPLC-RID. – Cuantificación por normalización interna de áreas.
Índice de acidez	<ul style="list-style-type: none"> – Disolución de la muestra en una mezcla de tolueno y etanol (1:1; v/v) neutralizada. – Valoración con una disolución de KOH empleando fenolftaleína como indicador.
Índice de peróxidos	<ul style="list-style-type: none"> – Disolución de la muestra en cloroformo. – Adición de ácido acético glacial y desplazamiento del O₂ con corriente de N₂. – Reacción con una disolución saturada de KI (5 min, en oscuridad) que se finaliza adicionando H₂O. – Valoración con tiosulfato sódico usando engrudo de almidón como indicador.
Índice de <i>p</i> -anisidina	<ul style="list-style-type: none"> – Disolución de la muestra en isooctano. – Filtrado de la muestra a través de filtros de PTFE de 5 µm. – Reacción con una disolución de <i>p</i>-anisidina (25 g/100 mL en ácido acético glacial). – Determinación espectrofotométrica a 350 nm.

Todos los métodos analíticos aplicados son los publicados por Varona et al. (2021b).

¹Disolución antioxidante: 1% (p/v) pirogalol, 0,012% (p/v) de BHT y 0,4% (p/v) de ácido cítrico anhidro, en etanol absoluto.

Abreviaturas: GC-FID, cromatografía de gases con detector de ionización de llama; HPLC-FLD, cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fluorescencia; HPLC-RID; cromatografía líquida de alta eficacia con detector de índice de refracción; TAG, triacilgliceroles; DAG, diacilgliceroles; MAG, monoacilgliceroles; FFA, ácidos grasos libres.

4.5 Metodología analítica para la caracterización de los piensos

Todas las determinaciones analíticas aplicadas para la caracterización de los diferentes piensos de cada estudio se realizaron por duplicado. La metodología seguida en cada caso se encuentra detallada en la información suplementaria de los tres artículos que forman parte de esta tesis (Anexo I, Anexo II y Anexo III). Concretamente, los análisis realizados fueron los siguientes:

- Composición en ácidos grasos (FA, *Fatty acid*): Para llevar a cabo este análisis en las muestras de piensos, se realizó una extracción de la grasa con Soxtec utilizando como disolvente éter dietílico. Una vez extraída la grasa, se procedió de la misma manera que en el caso de las muestras de grasa (Tabla 4.1). Este método analítico estaba basado en AOAC International (2019) y Varona et al. (2021b).
- Contenido en tocoferoles (T, *Tocopherol*) y tocotrienoles (T3, *Tocotrienol*): El procedimiento analítico era similar al que se recoge en la Tabla 4.1 para las muestras de grasas, incluyendo una etapa de homogeneización (con homogeneizador de alta velocidad) de la muestra de pienso con la disolución de antioxidantes previa a la reacción de saponificación. Este método analítico estaba basado en Bou et al. (2004) y Aleman et al. (2010).
- Composición en fracciones lipídicas: Para la determinación de triacilgliceroles (TAG, *Triacylglycerol*), diacilgliceroles (DAG, *Diacylglycerol*), monoacilgliceroles (MAG, *Monoacylglycerol*) y ácidos grasos libres (FFA, *Free fatty acid*) en piensos se extrajo la grasa con Soxtec empleando éter dietílico como disolvente. Tras este paso se aplicó la metodología analítica resumida en la Tabla 4.1. Este método analítico estaba basado en AOAC International (2019) y Varona et al. (2021b).

4.6 Metodología analítica aplicada en filete de pescado y en carne

La metodología analítica se encuentra descrita en profundidad en el apartado de material y métodos de cada uno de los artículos (apartado 5). A continuación, se incluye un breve resumen de cada determinación analítica:

- Composición en FA: Esta determinación se realizó en muestras frescas de filete de pescado y carne. Para ello, se llevó a cabo una homogeneización (con homogeneizador de alta velocidad) de la muestra con la mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v) empleada para extraer la fracción lipídica mediante una extracción múltiple. Tras la obtención de la fase clorofórmica y la posterior eliminación del disolvente en rotavapor, se seguía la misma metodología expuesta en la Tabla 4.1. Este método analítico estaba basado en Bou et al. (2004) y Varona et al. (2021b).
- Contenido en T y T3: El análisis del contenido de T y T3 es muy similar al que se recoge en la Tabla 4.1, incluyendo una etapa de homogeneización (con homogeneizador de alta velocidad) del filete de pescado o de la carne con la disolución de antioxidantes de manera previa a la reacción de saponificación. Este método analítico estaba basado en Bou et al. (2004) y Aleman et al. (2010).
- Contenido en hidroperóxidos lipídicos (LHP, *Lipid hydroperoxide*) y estabilidad oxidativa: Ambos parámetros se determinaron aplicando el método del naranja de xilenol (FOX, *Ferrous oxidation-Xylenol orange*). El tratamiento de muestra en el método de FOX consistió en una homogeneización (con homogeneizador de alta velocidad) de muestra con metanol seguida de una extracción. Un volumen determinado de estos extractos metanólicos de muestra se empleó para realizar la reacción colorimétrica con el naranja de xilenol en un medio ácido, creado con la adición de una disolución metanólica de ácido sulfúrico. El contenido en LHP, denominado como *LHP content* en los artículos de esta tesis, se determinó con la medida espectrofotométrica (a 560 nm) realizada a los 30 min del inicio de la reacción e indicaba la oxidación primaria de la muestra. La estabilidad oxidativa (como medida de la tendencia a sufrir reacciones lipídicas) se determinó midiendo la absorción a 560 nm cuando la formación de LHP era estable. Por tanto, para aplicar el método de FOX fue necesario hacer una optimización para establecer el volumen de extracto de muestra requerido y el tiempo a partir del cual el contenido de LHP era estable para cada tipo de muestra. En la Tabla 4.2 se recogen los diferentes

valores de volumen de extracto y tiempo de medida para la determinación de la estabilidad oxidativa en extractos de filete de lubina, carne de cerdo y carne de pollo. Este parámetro se denomina en los artículos de la presente tesis como *Final LHP value* (a mayor *Final LHP value*, mayor tendencia a sufrir reacciones de oxidación lipídica y menor estabilidad oxidativa).

Tabla 4.2 Volumen de extracto metanólico de muestra empleado en la reacción colorimétrica con el naranja de xilenol y tiempo de incubación al que se realizó la medida de la estabilidad oxidativa en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo.

Muestra	Volumen de extracto (µL)	Tiempo de incubación (h)
Filete de pescado	Fresco	70
	Refrigerado	70
Carne de cerdo	Fresca	160
	Refrigerada	150
Carne de pollo	Fresca	160
	Refrigerada	150

¹El extracto metanólico se obtuvo tras extraer 2 g de muestra con 15 mL de metanol.

Para una mayor comprensión de esta optimización, en el Anexo IV se muestran, a modo de ejemplo, los resultados de las diferentes pruebas de optimización llevadas a cabo para el estudio con lubinas.

La cuantificación tanto del contenido en LHP como de la estabilidad oxidativa se realizaba a través de rectas de calibrado preparadas con un patrón de hidroperóxido de cumeno (CHP, *cumene hydroperoxide*), expresando todos los resultados en mmol de CHP/kg de muestra. Este método analítico estaba basado en Grau et al. (2000a) y Tres et al. (2009).

- Índice del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, *2-Thiobarbituric acid*): En esta determinación se empleaban dos disoluciones para prevenir la oxidación de la muestra durante su análisis, una de ellas era de BHT en hexano y la otra de EDTA en agua. Tras la adición de estos antioxidantes y de una disolución acuosa de ácido tricloroacético, la muestra se homogeneizó (con homogeneizador de alta velocidad) y se sometió a una extracción. El extracto acuoso ácido obtenido se empleó para realizar la reacción colorimétrica con el TBA, determinando el valor a 521,5 nm en la tercera derivada del espectro de absorción. La cuantificación en µg de malondialdehído (MDA, *Malondialdehyde*) /kg de muestra se realizó con

rectas de calibrado preparadas a partir de un patrón de 1,1,3,3-tetraetoxipropano, compuesto precursor del MDA. Este método analítico estaba basado en Grau et al. (2000b) y Aleman et al. (2010).

- Contenido en compuestos volátiles: De manera previa al análisis del contenido en compuestos volátiles se realizó una optimización del tratamiento de muestra. Así, independientemente del tipo de muestra, se emplearon 20 µg de patrón interno (4-metil-2-pentanol) y una disolución acuosa antioxidante de EDTA y galato de propilo. Sin embargo, en lubinas y en pollos se utilizaron 2 mL de agua, mientras que para cerdos se usaron 2 mL de una disolución acuosa de NaCl al 20%. En todos los casos, las muestras se homogeneizaron con baño ultrasonidos a 4°C y se analizaron con un cromatógrafo de gases con analizador de masas equipado con un inyector automático que realizaba la microextracción en fase sólida del espacio en cabeza (HS-SPME-GC-MS, *Headspace-Solid phase microextraction-Gas chromatography-Mass spectrometry*). Para la identificación de los compuestos volátiles, se llevaron a cabo medidas escaneando todo el rango de valores m/z del analizador de masas (conocido en inglés como *full scan mode*) en unas muestras seleccionadas. Para realizar la determinación de esos compuestos volátiles identificados, en todas las muestras se monitorizaron relaciones m/z de iones característicos de los mismos (conocido en inglés como *selected ion monitoring* o *SIM*). Los resultados de cada compuesto volátil se expresaron en µg equivalentes del patrón interno (4-metil-2-pentanol) por kg de muestra.
- Color: La determinación de color se realizó en todas las muestras justamente después de ser homogeneizadas, tal y como se esquematiza en la Figura 4.2, la Figura 4.4 y la Figura 4.6. Para ello, se empleó un colorímetro que permitía medir en el espacio de color CIE L*a*b*, calibrado previamente. En cada muestra se realizaron cinco medidas diferentes en posiciones elegidas aleatoriamente, cuya media se tomó como el valor de color de dicha muestra. Además, en los casos en los que se observaron diferencias significativas entre dietas y/o tras la refrigeración en las coordenadas L*, a* y/o b*, se calculó el parámetro adimensional ΔE para estudiar si estas diferencias significativas entre dietas o entre muestras frescas y refrigeradas serían perceptibles al ojo humano (CIE, 2004). Las escalas de perceptibilidad para el ojo humano en función de los rangos de ΔE obtenidos en filete de lubina, carne de cerdo y carne de pollo se

muestran en la Tabla 4.3 y están basada en escalas consideradas previamente por otros autores para estudiar muestras similares a las evaluadas en esta tesis.

Tabla 4.3 Relación considerada entre los valores de ΔE obtenidos a partir de las coordenadas de color del espacio CIE L*a*b* y la posible perceptibilidad por el ojo humano de los cambios de color en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo.

	ΔE	Interpretación
Filete de lubina ¹	<5	No perceptible (<i>not be perceived</i>)
	>5	Perceptible (<i>be perceived</i>)
Carne de cerdo y de pollo ²	0,0 – 0,5	Mínimamente perceptible (<i>trace</i>)
	0,5 – 1,5	Ligeramente perceptible (<i>slight</i>)
	1,5 – 3,0	Notable (<i>noticeable</i>)
	3,0 – 6,0	Apreciable (<i>appreciable</i>)
	6,0 – 12,0	Muy perceptible (<i>much</i>)
	> 12,0	Inevitablemente perceptible (<i>very much</i>)

¹Basado en Costa et al. (2011).

²Basado en Pogorzelska et al. (2018).

- Aceptación sensorial: La evaluación de la aceptación sensorial se realizó con test hedónicos con escala de 9 puntos en los que participaron consumidores habituales de pescado, carne de cerdo o carne de pollo. En el caso del filete de pescado y de la carne de pollo, la preparación de las muestras consistió en la cocción de filete de pescado o de carne picados, utilizando una “hamburguesera” con plancha superior e inferior (Figura 4.2 y Figura 4.6). Para la evaluación de la aceptación sensorial de la carne de cerdo, se prepararon filetes de 1,5 cm de grosor a partir de los lomos de cerdo muestreados y se cocieron a la plancha (Figura 4.4). En todos los casos se controló el tamaño de muestra utilizado y el tiempo de cocción (Tabla 4.4). De manera previa a la realización del análisis de aceptación sensorial, cada participante firmó un consentimiento que contenía información relativa a las muestras que se iban a analizar. Como ejemplo del modelo de formulario de consentimiento empleado, en el Anexo V se muestra el documento elaborado en el análisis de aceptación sensorial de carne de pollo.

Tabla 4.4 Especificaciones sobre la evaluación de la aceptación sensorial del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo: tipo y cantidad de muestra evaluada y tiempo de cocción aplicado.

	Muestra evaluada	Tiempo de cocción
Filete de pescado ¹	22,5 g de filete homogeneizado	3 min
Carne de cerdo ¹	filetes enteros de 1,5 cm de grosor	3 min
Carne de pollo ¹	30 g de carne con piel homogeneizada	3,5 min

¹Las condiciones eran las mismas para la evaluación de muestras frescas y refrigeradas de un mismo tipo.

4.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos en filete de pescado y en carne

En primer lugar, se realizó un estudio de normalidad de los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros analizados en filete de lubina, carne de cerdo y carne de pollo para determinar si el estudio del efecto de la dieta en muestras frescas y en muestras refrigeradas debía ser evaluado mediante pruebas no paramétricas o mediante ANOVA. De acuerdo con lo obtenido en estas primeras pruebas estadísticas, en todos los casos se estudió el efecto de la dieta en los diferentes parámetros aplicando ANOVA y el test post hoc de Scheffé en muestras frescas por un lado y en refrigeradas por otro lado. Para la evaluación del efecto de la refrigeración y de la interacción entre la refrigeración y la dieta en los diferentes parámetros estudiados (excepto en la composición de FA, que se evaluó únicamente en muestras frescas) se emplearon ANOVA multifactoriales. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Todos los test estadísticos se han realizado con el programa SPSS (versión 27.0, IBM Statistics Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Para más detalles sobre los test estadísticos aplicados en cada estudio ver apartado 5.

5 SCIENTIFIC PUBLICATIONS



5.1 Scientific publication I



Effect of feeding acid oils on European seabass fillet lipid composition, oxidative stability, color and sensory acceptance

Paula Albendea, Alba Tres, Magdalena Rafecas, Stefania Vichi,
Roser Sala & Francesc Guardiola

Aquaculture Nutrition, 2023, 6415693

<https://doi.org/10.1155/2023/6415693>

Supplementary material available in Anexo I.



-Efecto de la alimentación con aceites ácidos sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de los filetes de lubina-

-RESUMEN-

Los aceites ácidos (AO, *Acid oil*) son subproductos procedentes de la refinación química de aceites y grasas. Los AO presentan un alto valor energético, por lo que son una opción interesante para la alimentación de peces, pudiendo contribuir a una acuicultura más sostenible.

El objetivo de este estudio era evaluar los efectos del reemplazo parcial del aceite de pescado (FO, *Fish oil*) en los piensos por dos AO, en vez de aceites vegetales crudos, sobre la composición lipídica, oxidación lipídica y calidad de filetes de lubina frescas, y tras un periodo de refrigeración de 6 días en condiciones comerciales.

Según el diseño experimental (apartado 4.1), los peces se alimentaron con cinco piensos diferentes, siendo la grasa añadida:

- 100% de FO (tratamiento dietético control).
- Una mezcla de FO (25%) y otra fuente lipídica vegetal (75%):
 - o Aceite de soja crudo (SO, *Crude soybean oil*).
 - o Aceite ácido de soja-girasol (SAO, *Soybean-sunflower (55:45; w/w) acid oil*).
 - o Aceite de orujo de oliva crudo (OPO, *Crude olive pomace oil*).
 - o Aceite ácido de orujo de oliva (OPAO, *Olive pomace acid oil*).

Tras el muestreo, las determinaciones realizadas en los filetes de lubina frescos y refrigerados fueron: el perfil de ácidos grasos (FA, *Fatty acid*), la composición en tocoferoles (T, *Tocopherol*) y tocotrienoles (T3, *Tocotrienol*), la oxidación primaria, la estabilidad oxidativa, el valor de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, *2-Thiobarbituric acid*), el contenido en compuestos volátiles, el color y la aceptación sensorial (apartado 4.6).

Los resultados mostraron que tras la refrigeración no se vio afectado el contenido total de tocoferoles y tocotrienoles (T + T3, *Total sum of tocopherols and tocotrienols*), pero se produjo un incremento de los productos de oxidación secundaria (valores de TBA y contenido en compuestos volátiles) en filetes procedentes de todas las dietas. En cuanto a las dietas, la sustitución del FO

por cualquiera de las fuentes lipídicas vegetales provocó una disminución del contenido de los ácidos eicosapentaenoico (EPA, *Eicosapentaenoic acid*) y docosahexaenoico (DHA, *Docosahexaenoic acid*) y un aumento de T y T3 en los filetes de pescado. A pesar de esta reducción en dichos FA, la ingesta diaria humana recomendada de EPA + DHA se podría seguir cubriendo con 100 g de filete de pescado. Además, los filetes procedentes de dietas con fuentes lipídicas vegetales mostraron una mayor estabilidad oxidativa y un menor valor de TBA. Concretamente, la mayor estabilidad oxidativa en filetes de lubina se obtuvo con el uso del OPO y del OPAO. La aceptación sensorial no se vio afectada por la dieta o la refrigeración, mientras que las diferencias existentes en los parámetros de color probablemente no serían perceptibles por el ojo humano.

La conclusión principal inferida de este estudio es que, de acuerdo con la estabilidad oxidativa y la aceptabilidad de los filetes de lubina, el SAO y el OPAO son adecuados reemplazos del FO como fuente de energía en los piensos para lubinas. Por tanto, estos subproductos podrían ser reciclados, mejorando la sostenibilidad ambiental y económica de la producción acuícola.

Research Article

Effect of Feeding Acid Oils on European Seabass Fillet Lipid Composition, Oxidative Stability, Color, and Sensory Acceptance

Paula Albendea ^{1,2}, Alba Tres ^{1,2}, Magdalena Rafecas ^{1,3}, Stefania Vichi ^{1,2}, Roser Sala ⁴, and Francesc Guardiola ^{1,2}

¹Nutrition, Food Science and Gastronomy Department-XIA, Campus de l'Alimentació Torribera, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av Prat de la Riba, 171., 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

²Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona, Av Prat de la Riba, 171., 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

³Nutrition, Food Science and Gastronomy Department-XIA, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av Joan XXIII, 27-31., 08028 Barcelona, Spain

⁴Animal Nutrition and Welfare Service (SNiBA), Animal and Food Science Department, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Travessera dels Turons., 08193 Bellaterra, Spain

Correspondence should be addressed to Alba Tres; atres@ub.edu

Received 25 October 2022; Revised 28 November 2022; Accepted 3 December 2022; Published 6 January 2023

Academic Editor: Erchao Li

Copyright © 2023 Paula Albendea et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Acid oils (AO) are fat by-products of edible oil refining with a high energetic value, being an interesting option for a more sustainable aquaculture nutrition. This study was conducted to evaluate the effects of the partial replacement of fish oil (FO) in diets by two AO instead of crude vegetable oils on the lipid composition, lipid oxidation and quality of fresh European seabass fillets, and after their commercial refrigerated storage for 6 days. Fish were fed with five different diets, the added fat being FO (100%) or a blend of FO (25%) and another fat (75%): crude soybean oil (SO), soybean-sunflower acid oil (SAO), crude olive pomace oil (OPO), or olive pomace acid oil (OPAO). Fresh and refrigerated fillets were assessed for fatty acid profile, tocopherol (T) and tocotrienol (T3) composition, lipid oxidative stability, 2-thiobarbituric acid (TBA) value, volatile compound content, color, and sensory acceptance. Refrigerated storage did not affect T + T3 total content but increased secondary oxidation products (TBA values and volatile compound contents) in fillets from all diets. The FO substitution decreased EPA and DHA and increased T and T3 in fish fillets, but the recommended human daily intake of EPA plus DHA could still be covered with 100 g of fish fillets. Both a higher oxidative stability and a lower TBA value were found in SO, SAO, OPO, or OPAO fillets, obtaining the greatest oxidative stability in OPO and OPAO fillets. Sensory acceptance was not affected by the diet or the refrigerated storage, while the differences found in color parameters would not be perceived by the human eye. According to the oxidative stability and acceptability of flesh, SAO and OPAO are adequate replacements of FO as energy source in European seabass diets, which implies that these by-products can be upcycled, improving the environmental and economical sustainability of aquaculture production.

1. Introduction

As the years have gone, the importance of aquaculture production to cover food fish demand has significantly raised [1]. This increasing trend is expected to continue in the future, reaching to cover 62% of food fish production in 2030 [2]. In 2018, 88% of fish production was intended for

human consumption while the rest had other uses, as fish oil (FO) and fish meal production [1]. The commonest lipid source used in fish feed has been FO due to its high percentage of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFA), such as eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, DHA), which are considered essential fatty acids (FA) for fish [3, 4].

The increase of aquaculture production has implied a raise in the demand of FO for fish feeding, while the production of FO has remained stable. As this could jeopardize aquaculture sustainability, it has been very important to find alternative fat sources to partially replace FO in fish diets. This substitution should guarantee enough EPA and DHA for an adequate growth and development of fish, especially for marine species such as European seabass (*Dicentrarchus labrax*) [5, 6]. Moreover, EPA and DHA content in fish diet influences their content in fish flesh, and, since these FA have shown health benefits, it also affects the nutritional value of fish flesh [7]. On the other hand, EPA and DHA have a great tendency to suffer oxidation reactions due to their high number of double bonds, and, consequently, oxidative rancidity is one of the main nonmicrobiological reasons of fish and fish food spoilage [8].

The options that have drawn more attention to replace FO as energy source are vegetable fat sources, the most common being soybean, linseed, rapeseed, sunflower, palm, and olive oil [6]. These fats have low EPA and DHA percentages but high percentages of C18 polyunsaturated fatty acids (PUFA) or monounsaturated fatty acids (MUFA) [9]. Also, some vegetable fats are usually characterized for being rich in tocopherols (T), tocotrienols (T3), and other bioactive compounds, such as polyphenols [9]. Thus, introducing vegetable fat sources to partially replace FO in fish feeding might cause both a FA profile modification of fish flesh, leading to a reduction of its EPA and DHA contents, and an increment in antioxidant compounds in fish flesh, which could prevent the development of lipid oxidation reactions and enhance its preservation [10].

Although crude oils are the most widely used vegetable sources to replace FO, it is also possible to replace it with some fat by-products from the food industry such as acid oils (AO). AO are fat by-products coming from edible oil refining, characterized for having a similar FA profile to the crude oil and a high content of free fatty acids (FFA), as they are obtained from the steps in which FFA are removed from the crude oil [11]. Using AO as feed fats alternatively to other lipid sources is a way to upcycle them, which would contribute to improving aquaculture sustainability. However, there are only a few trials performed with these by-products in the literature, focusing mainly on their effects on lipid digestibility and productive parameters and showing controversial results [12, 13]. In fact, as described by Varona et al. [11, 14], one disadvantage of AO is their high variability in various compositional parameters such as FFA content, insoluble impurities (I), or unsaponifiable matter (U). This affects their nutritional value [11], and consequently, this could impair the animal performance, decreasing the confidence of producers in these feeding fats. Also, the fact that the content of certain antioxidants, such as T and T3, is highly variable in these refining by-products could affect the oxidative stability and the quality of fish fillets during their commercial shelf life [11, 14]. However, the effects of using AO in fish diets on the composition and quality of fish flesh and fish food products are barely studied, which would be essential to upcycle them assuring the nutritional value, oxidative stability, and sen-

sory quality of the fish products even after their storage under commercial conditions.

The aim of this work was to evaluate the effect of the partial replacement of FO in fish diets by AO instead of crude oils from two different vegetable sources (soybean and olive pomace) on lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance of fresh and refrigerated European seabass fillets. This study complements the information published by Verge-Mèrida et al. [13] on growth and digestibility parameters of the same specimens used in the present work.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Fats. Five different experimental fats were used: fish oil (FO), two crude vegetable oils with different FA profile, crude soybean oil (SO) and crude olive pomace oil (OPO), and two AO available in the Spanish market with similar FA composition to theirs, soybean-sunflower (55:45, w/w) acid oil (SAO) and olive pomace acid oil (OPAO) (Table 1). Bunge Ibérica S.A.U. (Sant Just Desvern, Spain) supplied SO and SAO, General d'Olis i Derivats S.L. (Les Borges Blanques, Spain) provided OPO, RIOSA (Refinación Industrial Oleícola S.A., Ibros, Spain) supplied OPAO, and AFAMSA (Agrupación de Fabricantes de Aceites Marinos S.A., Mos, Spain) supplied the commercial degummed FO, which mostly came from tuna.

The contents of moisture and volatile matter (M), I, U, T and T3, and FA and lipid class compositions, and acid and peroxide values of these five fat sources (Table 1) were determined by triplicate as described by Varona et al. [15].

2.2. Animals and Diets. The animal housing and husbandry was conducted at the Aquaculture Center facilities of the Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA, Sant Carles de la Ràpita, Spain). All the procedures were approved by the Animal Protocol Review Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) and were in accordance with the guidelines set by the EU Directive 2010/63/EU [16]. A total of 300 European seabass (*Dicentrarchus labrax*) specimens of approximately 100 g were randomly distributed into 15 tanks of 500 L of capacity (20 fish per tank) with a sea water semirecirculation system (IRTAmor®; IRTA, Sant Carles de la Ràpita, Spain). This system allowed water recirculation of between 1 and 1.5 tank volumes per hour (15 m³/h) and was equipped with an aerobic biofilter for the removal/transformation of ammonia to nitrite and nitrite to nitrate. The fish were reared indoors and subjected to natural photoperiod and breed under controlled conditions of water temperature (22.6 ± 0.8°C), dissolved oxygen levels (7.3 ± 0.7 mg/L), pH (7.7-8.1), and salinity (35.5 ± 0.5‰).

The experimental diets were prepared in form of extruded pellets by the Service of Experimental Diets of the University of Almería (Almería, Spain) using standard aquafeed procedures. The ingredients and the proximate composition of the diets are presented in Table 2. All the diets contained a total of 15.4% (w/w) added fat. In the control

TABLE 1: Composition of the experimental fats used in this study.

	FO	SO	SAO	OPO	OPAO
MIU (g/100 g) ¹					
Moisture ²	0.24 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.31 ± 0.01
Impurities	0.30 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.89 ± 0.15	0.44 ± 0.12	1.94 ± 0.21
Unsaponifiable	2.01 ± 0.12	0.53 ± 0.25	2.35 ± 0.34	1.64 ± 0.35	3.90 ± 0.35
Total	2.55 ± 0.13	0.80 ± 0.25	3.64 ± 0.37	2.44 ± 0.37	6.15 ± 0.41
FA composition (%) ^{1, 3}					
C14:0	3.7 ± 0.13	ND	ND	ND	ND
C16:0	21.8 ± 0.50	10.7 ± 0.04	11.2 ± 0.05	13.3 ± 2.18	11.5 ± 0.05
C18:0	6.4 ± 0.09	3.4 ± 0.11	3.5 ± 0.01	2.7 ± 0.06	3.1 ± 0.01
SFA	34.9 ± 0.53	15.0 ± 0.24	16.3 ± 0.06	16.8 ± 2.18	16.0 ± 0.05
C16:1 n-7	4.7 ± 0.35	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.7 ± 0.02	1.1 ± 0.02
C18:1 n-9	16.0 ± 0.20	23.5 ± 0.02	30.5 ± 0.08	68.7 ± 1.76	63.0 ± 0.19
C18:1 n-7	2.8 ± 0.03	1.7 ± 0.02	1.4 ± 0.01	2.0 ± 0.12	2.1 ± 0.06
MUFA	28.4 ± 0.41	25.6 ± 0.06	32.2 ± 0.08	71.7 ± 1.77	66.5 ± 0.20
C18:2 n-6	1.9 ± 0.02	53.1 ± 0.35	48.3 ± 0.03	10.4 ± 0.15	16.5 ± 0.11
n-6 PUFA	2.8 ± 0.04	53.2 ± 0.35	48.3 ± 0.03	10.5 ± 0.15	16.6 ± 0.12
C18:3 n-3	0.9 ± 0.01	6.1 ± 0.01	3.0 ± 0.01	0.9 ± 0.01	0.7 ± 0.01
C20:5 n-3	6.3 ± 0.92	ND	ND	ND	ND
C22:6 n-3	26.0 ± 0.15	ND	ND	ND	ND
n-3 PUFA	33.6 ± 1.04	6.1 ± 0.01	3.0 ± 0.01	0.9 ± 0.01	0.7 ± 0.01
Total PUFA	36.4 ± 1.04	59.2 ± 0.35	51.3 ± 0.04	11.3 ± 0.15	17.3 ± 0.12
<i>Trans</i> C18:1	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.08	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.04	0.3 ± 0.2
T and T3 content (mg/kg) ¹					
α-T	41.18 ± 1.51	170.93 ± 4.71	40.83 ± 0.40	66.44 ± 0.57	65.61 ± 2.24
β-T	0.32 ± 0.03	20.04 ± 0.03	2.90 ± 0.03	0.47 ± 0.15	1.51 ± 0.10
γ-T	0.21 ± 0.05	535.93 ± 10.96	36.44 ± 0.61	2.22 ± 0.01	1.91 ± 0.09
δ-T	0.65 ± 0.32	53.63 ± 1.63	20.95 ± 0.84	ND	0.55 ± 0.01
β-T3	0.41 ± 0.17	4.35 ± 0.62	0.36 ± 0.03	3.11 ± 0.05	1.29 ± 0.09
γ-T3	ND	9.23 ± 0.28	ND	ND	0.99 ± 0.05
Total (T + T3)	42.77 ± 1.92	794.11 ± 13.72	101.48 ± 1.92	72.64 ± 0.44	71.86 ± 2.46
Lipid class composition (%) ^{1, 4}					
TAG	85.7 ± 0.01	93.9 ± 0.08	29.3 ± 0.30	77.5 ± 0.15	36.3 ± 0.10
DAG	6.9 ± 0.03	4.2 ± 0.08	16.1 ± 0.24	8.4 ± 0.15	17.4 ± 0.01
MAG	4.4 ± 0.03	0.5 ± 0.01	1.3 ± 0.28	0.9 ± 0.17	1.4 ± 0.10
FFA	3.1 ± 0.06	1.5 ± 0.01	53.3 ± 0.34	13.2 ± 0.12	45.0 ± 0.01
Acid value (mg KOH/g) ¹					
	14.3 ± 0.19	2.8 ± 0.11	116.6 ± 1.8	23.3 ± 0.11	96.8 ± 0.45
Peroxide value (meq O ₂ /kg) ¹					
	2.7 ± 0.44	1.5 ± 0.12	1.7 ± 0.08	6.0 ± 0.72	1.7 ± 0.46

Abbreviations: FO: fish oil; SO: crude soybean oil; SAO: soybean-sunflower acid oil; OPO: crude olive pomace oil; OPAO: olive pomace acid oil; MIU: moisture and volatile matter + insoluble impurities + unsaponifiable matter; FA: fatty acid; SFA: saturated fatty acids (sum of C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, and C24:0); MUFA: monounsaturated fatty acids (sum of C16:1 n-9, C16:1 n-7, C17:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C20:1 n-9, C22:1 n-9, and C24:1 n-9); PUFA: polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA: sum of C18:2 n-6, C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, and C20:4 n-6; n-3 PUFA: sum of C18:3 n-3, C20:3 n-3, C20:5 n-3, and C22:6 n-3; total PUFA: sum of n-6 PUFA and n-3 PUFA); T: tocopherol; T3: tocotrienol; TAG: triacylglycerols; DAG: diacylglycerols; MAG: monoacylglycerols; FFA: free fatty acids; ND: not detected. ¹Mean ± standard deviation of the three determinations. ² It included moisture and other compounds that volatilize under the determination conditions. ³ The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. ⁴ The percentage of each lipid class was obtained by peak area normalization.

TABLE 2: Ingredients, proximate composition, and gross energy of the five diets used in this study.

	FO	SO	SAO	OPO	OPAO
<i>Ingredient composition (g/kg)</i>					
Wheat meal	110.3	110.3	110.3	110.3	110.3
Wheat gluten	155.9	155.9	155.9	155.9	155.9
Soya protein concentrate	266.0	266.0	266.0	266.0	266.0
Fish meal	202.4	202.4	202.4	202.4	202.4
Hydrolyzed fish protein	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3
Krill meal	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5
Soybean lecithin	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6
Fish oil	153.9	38.5	38.5	38.5	38.5
Experimental fat	0.0	115.4	115.4	115.4	115.4
L-lysine	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
DL-methionine	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
Betaine	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamin and mineral premix ¹	19.2	19.2	19.2	19.2	19.2
Vitamin C	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Guar gum	19.2	19.2	19.2	19.2	19.2
<i>Proximate composition (g/kg)</i>					
Dry matter	926.1	925.7	932.3	926.2	930.4
Crude protein	418.3	405.3	396.2	413.1	414.3
Ether extract	190.5	190.4	182.8	186.9	180.0
Ash	72.2	72.4	73.2	72.4	73.4
Gross energy (MJ/kg)	21.7	21.8	21.8	21.7	22.0

Abbreviations: FO: fish oil diet; SO: crude soybean oil diet; SAO: soybean-sunflower acid oil diet; OPO: crude olive pomace oil diet; OPAO: olive pomace acid oil diet. ¹ Provides per kg of feed: vitamin A (38,460 IU), vitamin D3 (3,8460 UI), vitamin E (192.23 mg of α -tocopheryl acetate), vitamin K3 (48.08 mg), vitamin B1 (57.69 mg), vitamin B2 (57.69 mg), calcium pantothenate (192.23 mg), nicotinic acid (384.60 mg), vitamin B6 (38.46 mg), vitamin B9 (28.84 mg), vitamin B12 (0.19 mg), biotin (5.77 mg), inositol (961.50 mg), betaine (961.50 mg), cobalt carbonate (1.25 mg), cupric sulphate (17.31 mg), ferrous sulphate (11.54 mg), potassium iodide (0.96 mg), manganese oxide (18.46 mg), sodium selenite (0.02 mg), zinc sulphate (14.42 mg), calcium carbonate (3,577 mg), potassium chloride (463.44 mg), and sodium chloride (769.20 mg).

diet, the added fat source was 100% FO. In the other diets, a 75% of the added fat was one of the vegetable fat sources (SO, SAO, OPO, or OPAO), and the remaining 25% was FO to guarantee enough quantity of essential FA for European seabass (at least 1% of EPA + DHA on dry weight [17]). Feed samples were taken, and the FA composition, T and T3 content, and lipid class composition were determined in duplicate in all diets (Table 3). Therefore, considering the M and the FA profile of each diet (Tables 2 and 3), the EPA + DHA content was expressed on dry weight, being 5.9% in FO diet and 1.8% in the rest of diets. Thus, in all cases, EPA + DHA content was higher than the 1% of recommended for European seabass [17].

The five diets were randomly assigned to different tanks (three tanks per experimental diet), and the experimental feeding period lasted for 100 days. The effects of these diets on animal performance parameters have been published elsewhere [13].

2.3. Sampling of European Seabass Fillets. At the end of the experimental period, fish were fasted for 24 h and slaughtered by immersion in ice-cold water (hypothermia). Five replicates per dietary treatment were prepared. Each repli-

cate was composed by six different fish, obtained from 3 tanks (2 fish from each tank) fed with the same diet. From each fish, the two entire fillets without skin were taken as samples, so a total of twelve fillets (3 tanks per diet \times 2 fish per tank \times 2 entire fillets per fish) were used for one replicate. All the samples were kept in zipper bags on ice until the next morning.

In less than 24 h after slaughter, the twelve fillets per replicate were divided into two groups of six fillets (one fillet of each fish per group), using one group to constitute the fresh sample and the other group to constitute the refrigerated sample. For fresh samples, the six fillets of each replicate were pooled and ground. After measuring the color, various aliquots of 25 g of the ground sample were immediately vacuum packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB3255; permeability to O₂, 17 cm³/m² per day per bar at 23°C and 0% relative humidity, ASTMD-3985; Cryovac Europe, Sealed Air S.L., Sant Boi de Llobregat, Spain) and were kept at -20°C until the chemical analyses were performed. The other part of the ground sample was pooled with the ground sample remains from other replicates of the same diet and used to make hamburgers, which were cooked to perform the sensory acceptance test.

TABLE 3: Fatty acid, tocopherol and tocotrienol, and lipid class compositions of the experimental diets¹.

	FO ²	SO ²	SAO ²	OPO ²	OPAO ²
<i>FA composition (%)³</i>					
C14:0	3.74 ± 0.05	1.40 ± 0.01	1.52 ± 0.06	1.44 ± 0.07	1.51 ± 0.05
C16:0	23.43 ± 1.73	15.13 ± 0.15	15.79 ± 0.59	15.77 ± 0.75	15.29 ± 0.06
C18:0	6.77 ± 0.56	4.45 ± 0.10	3.88 ± 0.85	3.50 ± 0.58	4.16 ± 0.04
SFA	35.16 ± 1.82	21.69 ± 0.18	22.18 ± 1.04	21.27 ± 0.95	21.69 ± 0.10
C16:1 n-7	4.39 ± 0.18	1.54 ± 0.01	1.63 ± 0.06	1.98 ± 0.09	2.20 ± 0.01
C18:1 n-9	16.28 ± 0.61	22.20 ± 0.58	27.20 ± 1.31	50.45 ± 1.56	46.12 ± 0.58
C18:1 n-7	2.71 ± 0.07	1.87 ± 0.04	1.55 ± 0.10	1.58 ± 0.13	2.10 ± 0.45
C20:1 n-9	1.52 ± 0.04	0.67 ± 0.01	0.66 ± 0.02	0.76 ± 0.03	0.71 ± 0.01
MUFA	25.09 ± 0.64	26.38 ± 0.58	31.15 ± 1.32	54.98 ± 1.57	51.32 ± 0.73
C18:2 n-6	6.16 ± 0.18	37.03 ± 0.78	33.13 ± 1.46	11.73 ± 0.57	15.03 ± 0.01
C20:4 n-6	2.10 ± 0.09	0.64 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.68 ± 0.03	0.68 ± 0.01
n-6 PUFA	9.04 ± 0.20	38.21 ± 0.78	34.50 ± 1.47	12.99 ± 0.57	16.31 ± 0.04
C18:3 n-3	1.21 ± 0.02	4.72 ± 0.01	2.60 ± 0.08	1.21 ± 0.06	1.05 ± 0.06
C20:5 n-3	6.72 ± 0.31	2.20 ± 0.01	2.44 ± 0.07	2.36 ± 0.12	2.45 ± 0.01
C22:6 n-3	21.98 ± 0.89	6.51 ± 0.01	6.84 ± 0.22	6.88 ± 0.41	6.92 ± 0.07
n-3 PUFA	30.70 ± 0.94	13.72 ± 0.02	12.17 ± 0.24	10.76 ± 0.43	10.69 ± 0.10
Total PUFA	39.74 ± 0.97	51.93 ± 0.78	46.67 ± 1.48	23.75 ± 0.72	26.99 ± 0.11
<i>T and T3 profile (mg/kg)</i>					
α-T	168.99 ± 5.97	230.03 ± 3.49	186.32 ± 3.90	235.93 ± 4.29	217.13 ± 5.57
β-T	0.95 ± 0.06	3.61 ± 0.22	3.43 ± 0.10	1.93 ± 0.15	3.19 ± 0.18
γ-T	1.40 ± 0.02	69.95 ± 17.29	27.37 ± 0.66	4.11 ± 0.18	3.67 ± 0.38
δ-T	ND	21.30 ± 4.50	16.68 ± 0.28	ND	ND
Total (T+T3)	177.07 ± 6.23	329.20 ± 29.37	240.30 ± 4.27	253.03 ± 4.79	233.95 ± 5.15
<i>Lipid class composition (%)⁴</i>					
TAG	81.56 ± 0.77	86.74 ± 0.03	47.35 ± 0.10	76.06 ± 0.07	50.90 ± 0.26
DAG	8.76 ± 0.72	6.35 ± 0.33	14.17 ± 0.05	10.04 ± 0.01	15.53 ± 1.03
MAG	0.16 ± 0.02	0.47 ± 0.08	2.39 ± 0.01	0.93 ± 0.07	2.61 ± 0.21
FFA	9.53 ± 0.03	6.43 ± 0.22	36.09 ± 0.16	12.97 ± 0.14	30.97 ± 1.50

Abbreviations: For diet abbreviations (FO, SO, SAO, OPO, and OPAO), see Table 2; FA: fatty acid; SFA: saturated fatty acids (sum of C14:0, C15:0, C16:0; C18:0, and C22:0); MUFA: monounsaturated fatty acids (sum of C16:1 n-9, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, and C20:1 n-9); PUFA: polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA: sum of C18:2 n-6, C18:3 n-6, C20:2 n-6, and C20:4 n-6; n-3 PUFA: sum of C18:3 n-3, C20:3 n-3, C20:5 n-3, and C22:6 n-3; total PUFA: sum of n-6 PUFA and n-3 PUFA); T: tocopherol; T3: tocotrienol; TAG: triacylglycerols; DAG: diacylglycerols; MAG: monoacylglycerols; FFA: free fatty acids; ND: not detected. ¹ The analytical methods applied are described in supplementary material. ² Mean ± standard deviation of the two determinations. ³ The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. ⁴ The percentage of each lipid class was obtained by peak area normalization.

For refrigerated samples, the six fillets of each replicate were stored for 6 days under commercial conditions (at 2°C, packed in a modified atmosphere of CO₂/N₂/O₂, 40/30/30). After the refrigerated storage, fillets were pooled and ground. The color determination, the sampling for chemical analysis, and the sensory acceptance test were done as detailed for fresh samples.

2.4. Determination of Fatty Acid Composition. The FA composition of fresh fish fillets (1.5-1.6g) was analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) after extracting the lipid fraction with chloroform/methanol

(2:1, v/v) mixture. First, 20 mL of this mixture was added to the sample and homogenized using a high-speed homogenizer (PT 3100 Polytron, Kinematica, Lucerne, Switzerland) at 19,000 rpm for 20 s and filtered through Whatman No. 1 filter paper. The sample residue retained in the filter was reextracted twice with 10 mL of the same solvent mixture at 19,000 rpm for 20 s. Next steps of lipid extraction were carried out as described by Bou et al. [18]. Then, FA methyl esters were obtained from the extracted lipid fraction by a double methylation procedure and determined by GC-FID [15]. Each compound was identified by comparing its retention time with that of standards (Supelco 37 component

FAME Mix, Supelco®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization.

2.5. Determination of Tocopherol and Tocotrienol Content.

For the determination of the T and T3 content in fresh and refrigerated fish fillets, 2 g of ground sample was homogenized with a mixture of antioxidants in ethanol using a PT 3100 Polytron for 30 s at 20,000 rpm and saponified with methanolic KOH as described by Bou et al. [18]. The nonsaponifiable fraction was extracted with petroleum ether. The solvent was evaporated under a nitrogen stream at 30°C, and the residue was dissolved in 99% n-hexane and injected into the chromatographic system. High performance liquid chromatography separation was carried out as described by Aleman et al. [19], and T and T3 were detected using a 1260 Infinity II Fluorescence Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), setting the excitation and emission wavelengths at 290 and 320 nm, respectively. Each sample was analyzed twice, and calibration curves were prepared using α -, β -, γ -, and δ -T standards (Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The content of α -, β -, γ -, and δ -T3 was calculated by applying the calibration curve obtained for the corresponding T analogue.

2.6. Ferrous Oxidation-Xylenol Orange (FOX) Method.

The FOX method was applied in each sample per triplicate to evaluate the primary oxidation and the oxidative stability of fresh and refrigerated fillets, as detailed by Grau et al. [20]. Briefly, 15 mL of cold methanol was added to 2 g of sample, and a PT 3100 Polytron was used for sample homogenization at 12,000 rpm for 30 s. Then, the mixture was centrifuged (1,400 g, 3 min), and the supernatant methanol extract was collected. The reaction mixture was prepared in glass cuvettes, capped with Teflon caps. The reagents were added as described by Tres et al. [21], using 1030 μ L of methanol and 70 μ L of sample extract. The absorbance at 560 nm was measured using a UV-3600 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) after incubation for 30 min (as a measure of the lipid hydroperoxides (LHP) present in the samples from the beginning, named LHP content) and for 96 h (as a measure of the amount of LHP formed during this time which is considered a measure of sample's oxidative stability, named final LHP value). LHP concentration was expressed as mmol of cumene hydroperoxide (CHP) equivalents/kg of sample, with reference to a calibration curve prepared using CHP as standard (technical grade, 80%, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

2.7. Determination of 2-Thiobarbituric Acid (TBA) Value.

The 2-thiobarbituric acid (TBA) value was determined twice per sample to evaluate the secondary oxidation of fresh and refrigerated fillets, applying the method described by Grau et al. [22] on 1.5 g of sample. The TBA value was measured through third derivative spectrophotometry after an acid aqueous extraction. The results were expressed as malondialdehyde (MDA) concentration (μ g/kg), using a calibration curve prepared as described by Botsoglou et al. [23]

with 1,1,3,3-tetraethoxypropane (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) as MDA precursor.

2.8. Determination of Volatile Compound Content.

The volatile compound content was determined in fresh and refrigerated fillets by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). To perform the analysis, 1 g of sample was weighed into a 10 mL screw-capped vial, and 0.5 mL of a 4 mg/L aqueous solution of 4-methyl-2-pentanol (97%, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added as internal standard. Subsequently, 0.5 mL of an aqueous antioxidant solution with 4% of EDTA and 0.4% of propyl gallate (both from Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 2 mL of double deionized water, and three glass balls were added. The vial was immediately closed and kept in ice until all sample set was prepared. Then, the mixture was homogenized using an ultrasound bath at 4°C for 10 min. Samples were kept in ice at the dark until the HS-SPME-GC-MS determination was carried out. The instrument consisted of an Agilent 6890N Network GC system with an Agilent 5975C Inert MSD quadrupole mass spectrometer (both from Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA) and a PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) configured to perform SPME. After 10 min of sample conditioning at the extraction temperature (45°C), the fiber of divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (2 cm length, 50/30 thickness) from Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was exposed to the head space for 30 min and desorbed in the injector at 260°C for 10 min. To perform the separation of the different volatile compounds, a Supelcowax-10 capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) from Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used. The oven temperature program began at 40°C (held 10 min, during fiber desorption time), 3°C/min up to 150°C, and 15°C/min up to 250°C (held for 5 min). Helium was used as gas carrier with a constant flow of 1 mL/min. The temperatures of the ion source and the transfer line were 230 and 280°C, respectively, and the ionization energy was 70 eV. Data were acquired in full scan mode in selected representative samples for the identification of compounds, which was carried out by comparison of their mass spectra and retention times with those of standard compounds or with those available in mass spectrum library Wiley 6 and in the literature. Then, the quantitative assessment of all samples was carried by selected ion mode, considering m/z 44, 45, 55, 56, 57, 58, 70, 81, and 98, which were representative for the compounds of interest. Data were then analyzed by an Agilent MSD ChemStation. Relative amounts of volatile compounds were calculated by the internal standard method, expressing the results as μ g of 4-methyl-2-pentanol equivalents/kg of sample.

2.9. Color Determination. Immediately after grinding the fillet samples, color was measured by CR-410 Konica Minolta colorimeter (Tokyo, Japan) based on CIE L*a*b* color space. The color parameters determined were lightness (L*), from dark (0) to light (100); redness (a*), from green

($-a^*$) to red ($+a^*$); and yellowness, (b^*) from blue ($-b^*$) to yellow ($+b^*$), as recommended by the International Commission on Illumination in 1976 [24]. The instrument was set for D-65 illuminant at a 2° observer angle and calibrated prior to the determinations with a standard white plate. Five measures were taken for each replicate in random different locations of the ground samples, and the average L^* , a^* , and b^* was calculated.

The dimensionless parameter ΔE [25] was used to evaluate if the differences in color parameters between different sample groups could be perceptible by the human eye.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}. \quad (1)$$

In this study, two different ΔE parameters were obtained:

- (i) ΔE_R was calculated for each dietary treatment to evaluate the differences between the color parameters of fresh and refrigerated fillets. In this case, ΔL^* , Δa^* , and Δb^* in Equation (1) corresponded to the difference between the L^* , a^* , or b^* means of the fresh samples ($n = 5$) and of the refrigerated samples ($n = 5$) of the same dietary treatment
- (ii) ΔE_D was used to study the differences in color parameters of fresh or refrigerated fillets between the control diet (FO) and the other four dietary treatments. Thus, two different ΔE_D were obtained for each dietary treatment: one for fresh fillets and another for refrigerated fillets. In this case, the ΔL^* , Δa^* , and Δb^* in Equation (1) corresponded to the difference between L^* , a^* , or b^* means of fresh ($n = 5$) or refrigerated samples ($n = 5$) from FO diet and those from each one of the other four dietary treatments

A value of $\Delta E > 5$ [26] was considered as the cut-off value above which the instrumental color differences would be perceived by the human eye.

2.10. Sensory Acceptance Test. Two nine-scale hedonic tests were performed to evaluate if there were significant differences in overall acceptance between the dietary treatments in fresh or refrigerated fish fillets. In both cases, hamburgers with 22.5 g ground fish fillet per unit were prepared and cooked for 3 min using five different machines (model SS-5515 750 W, Jocca, Zaragoza, Spain), one for each dietary treatment. A total of 30 regular fish consumers participated in each test. In each test, each participant evaluated five hamburgers (one per dietary treatment) and, for each of them, indicated the degree of acceptability on a 9-point scale (1: "dislike extremely"; 5: "neither like nor dislike"; 9: "like extremely").

2.11. Statistical Analysis. Statistical tests were carried out with SPSS (version 20.0, IBM Statistics Inc.). Multifactor ANOVA (SPSS GLM procedure) was used to study the influence of the refrigeration time (0 and 6 days) as one main factor and its interaction with the main factor dietary treatment (FO, SO, SAO, OPO, or OPAO) on all the param-

eters evaluated in fish fillets ($n = 50$, 2 refrigeration times \times 5 dietary treatments \times 5 replicates each; for sensory acceptance $n = 300$, 2 refrigeration times \times 5 dietary treatments \times 30 replicates each), except for FA profile, which was determined only in fresh samples. One-way ANOVA (SPSS GLM procedure) was used to assess if there was a significant influence of the dietary treatment (FO, SO, SAO, OPO, and OPAO) on all the parameters studied in fresh fillets ($n = 25$, 5 dietary treatments \times 5 replicates each; for sensory acceptance $n = 150$, 5 dietary treatments \times 30 replicates each) and in refrigerated fillets ($n = 25$, 5 dietary treatments \times 5 replicates each; for sensory acceptance $n = 150$, 5 dietary treatments \times 30 replicates each). Significant differences among dietary treatments found by one-way ANOVA in fresh or refrigerated fillets were evaluated by the Scheffé's post hoc test (SPSS GLM procedure). Pearson's correlation test was performed to study the correlations of the oxidative parameters determined in fillets with the FA profile ($n = 25$) and between all the parameters analyzed in fresh and refrigerated fillets ($n = 50$). In all cases, differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

As previously reported, AO present different compositional traits than crude oils and a high variability in their composition [11, 14], and since this can affect their nutritional value, it is important to properly characterize them to evaluate their quality as feed fats. The two AO assayed in this study (SAO and OPAO) presented a higher FFA content than SO and OPO (Table 1), as they are refining by-products coming from neutralization, a refining step performed to remove FFA from crude fats. These FFA percentages were in agreement with the ones reported by Varona et al. [11] for various AO. Another characteristic of AO is that they also tend to accumulate substances present in the I and U fractions, increasing their total MIU value [11]. The total MIU value is a parameter commonly used to evaluate the quality of feed fats as it represents the content of substances that can dilute their energy value. Accordingly, the total MIU values of the two AO used in this study were higher than those of the rest of the fat sources, with the percentages of M, I, and U, and total MIU being similar or lower than the usual levels found for these type of AO in Spanish market [11]. For both SAO and OPAO, U was the fraction with the greatest contribution to the total MIU value (Table 1). Remarkably, the recommendations published by FEDNA [27] for the use of AO in animal diets establish a total MIU value lower than 5%, which was fulfilled by the SAO and slightly exceeded by OPAO. In fact, in the performance parameters resulting from the experimental diets used in this work and that were reported by Verge-Mèrida et al. [13], no effect was observed when SAO was used, but a significantly lower performance was found when fish were fed with OPAO diet, showing the lowest weight (226.22 g vs. the range of 244.45–250.20 g), specific growth rate (0.80%/day vs. the range of 0.88–0.90%/day), and average daily gain (1.25 g vs. the range of 1.43–1.49 g). Regarding the apparent digestibility of dry matter, crude protein, or total FA, no

TABLE 4: Fatty acid profile of fresh fillets coming from fish fed with the five experimental diets.

FA (%)	FO ¹	SO ¹	SAO ¹	OPO ¹	OPAO ¹	SEM ²	<i>p</i> ³
C14:0	2.5 ^a	1.5 ^c	1.7 ^b	1.6 ^{bc}	1.6 ^{bc}	0.026	<0.001
C16:0	19.2 ^a	16.4 ^{bc}	16.4 ^{bc}	16.6 ^b	16.0 ^c	0.130	<0.001
C18:0	4.7 ^a	4.6 ^a	4.3 ^b	4.0 ^c	3.9 ^c	0.053	<0.001
SFA	27.5 ^a	23.2 ^b	23.2 ^b	22.9 ^{bc}	22.3 ^c	0.187	<0.001
C16:1 n-7	4.0 ^a	2.3 ^c	2.5 ^{bc}	2.6 ^b	2.7 ^b	0.053	<0.001
C18:1 n-9	25.8 ^d	27.8 ^d	30.6 ^c	43.3 ^a	40.6 ^b	0.538	<0.001
C18:1 n-7	1.8 ^a	1.6 ^{ab}	1.4 ^{ab}	1.2 ^b	1.6 ^{ab}	0.118	0.022
C20:1 n-9	1.9 ^a	1.4 ^d	1.5 ^{cd}	1.6 ^b	1.6 ^{bc}	0.027	<0.001
MUFA	34.0 ^{bc}	33.4 ^c	36.5 ^b	49.2 ^a	47.0 ^a	0.560	<0.001
C18:2 n-6	11.4 ^e	26.2 ^a	23.7 ^b	12.9 ^d	15.1 ^c	0.310	<0.001
C20:4 n-6	1.7 ^a	0.7 ^b	0.8 ^b	0.8 ^b	0.8 ^b	0.024	<0.001
n-6 PUFA	13.9 ^d	28.3 ^a	25.6 ^b	14.4 ^d	16.6 ^c	0.314	<0.001
C18:3 n-3	2.0 ^c	3.8 ^a	2.6 ^b	1.9 ^d	1.9 ^{cd}	0.028	<0.001
C20:5 n-3	5.3 ^a	2.7 ^c	3.0 ^b	2.9 ^{bc}	3.0 ^b	0.055	<0.001
C22:6 n-3	16.1 ^a	7.7 ^b	8.2 ^b	7.9 ^b	8.1 ^b	0.293	<0.001
n-3 PUFA	24.3 ^a	14.8 ^b	14.4 ^b	13.2 ^b	13.7 ^b	0.331	<0.001
Total PUFA	38.2 ^b	43.0 ^a	40.0 ^b	27.6 ^d	30.3 ^c	0.483	<0.001

Abbreviations: For diet abbreviations (FO, SO, SAO, OPO, and OPAO), see Table 2; FA: fatty acid; SFA: saturated fatty acids (sum of C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, and C22:0); MUFA: monounsaturated fatty acids (sum of C16:1 n-9, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, and C20:1 n-9); PUFA: polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA: sum of C18:2 n-6, C18:3 n-6, C20:2 n-6, and C20:4 n-6; n-3 PUFA: sum of C18:3 n-3, C20:3 n-3, C20:5 n-3, and C22:6 n-3; total PUFA: sum of n-3 PUFA and n-6 PUFA). See Table S1 in supplementary material for the complete FA composition including minor FA results. ¹ Data were expressed as the mean of the five replicates from each dietary treatment (*n* = 5). ² Standard error of the mean. ³ *p* values obtained by ANOVA (*n* = 25). Values in bold were significant (*p* < 0.05). Differences between dietary treatments found with Scheffé's post hoc test were noted in the same row as *a* > *b* > *c* > *d* > *e*.

effect was observed when AO were included in the diets [13]. Beyond this, to promote the upcycling of this type of refining by-products as vegetable feed fats to replace FO for aquaculture nutrition, it is important to comprehensively study their impact not only on fish performance parameters but also on the composition, oxidative stability, and sensory acceptability of the flesh, so that the interest of the various stakeholders (feed producers, farmers, and consumers) is addressed.

3.1. Fatty Acid Profile of Fish Fillets. The results of the FA profile of fresh fillets coming from each diet are presented in Table 4 (the complete FA composition including minor FA can be found in Table S1 in supplementary material).

The differences in the FA profile of fish fillets between dietary treatments were significant for all the determined FA and for the sums of each FA type. Most of the trials found in the literature showed that the FA profile of fish fillets mirrored the FA composition of the diet [6, 28]. In our study, fillets coming from FO diet had the highest content in EPA (5%) and DHA (16%), whereas the other four diets led to ≈3% of EPA and to similar levels of DHA (≈8%) in fillets (Table 4). This was in agreement with the EPA and DHA reductions observed in the diets when FO was partially substituted by vegetable sources (from 7% of EPA and 22% of DHA in the FO diet, to approximately 2% of EPA and 7% of DHA in the rest of diets) (Table 3). Similarly, previous studies reported that the main effect of the partial or total substitution of FO with vegetable oils is a reduction of

EPA and DHA content in the whole fish, organs, and flesh [10]. However, considering that the general recommendation for the daily EPA plus DHA intake is 250 mg [29] and taking into account the amount of fat extracted from fish fillets in this study (data not shown), 100 g of FO fillets would cover 302% of the recommended EPA plus DHA daily intake, whereas fillets from the other four diets would cover between 168% and 192%. Therefore, even though FO was partially replaced with the AO or crude oils, the content of these FA in fish fillets was enough to cover the recommended EPA + DHA daily intake. Nevertheless, it is important to remind that these LC-PUFA are highly prone to lipid oxidation, and, as it will be commented below, they might influence the oxidative stability of fish fillets.

The decrease in saturated fatty acid (SFA) percentage (from 27% to 22%–23%) in fish fillets observed with the partial substitution of FO by SO, SAO, OPO, or OPAO was related to the FA profile of the feed fats and of the diets, as FO diet showed the highest content in SFA (35%). This was also in concordance with previous trials. For example, Mourente and Bell [5] also found a reduction of SFA levels in European seabass fillets when a 60% of FO was replaced by different blends of vegetable fat sources in fish diets with 16% added fat. However, the decrease in the SFA percentage (from 24% to ≈21%) was lower than the one observed in this study, as their vegetable blends included palm oil. Another work representative of this fact is the one carried out by Izquierdo et al. [30] who, despite of working with another species (gilthead seabream) and of replacing FO by 60% or

80% of different vegetable oils (linseed, rapeseed, or S) in diets with 17.6% added fat, observed a SFA reduction in fillets (from 28% to the range of 24%–21%) similar to the one found in this study.

Other distinctive aspects of the FA profile of the fat sources and diets were also reflected in the FA composition of fillets (Table 4). For example, fillets from fish fed with SO diet showed the highest levels of linoleic (26%) and linolenic (4%) acids. In general terms, the FA profiles of SO and SAO fillets were similar, although differences were found for oleic (C18:1 n-9) and linoleic (C18:2 n-6) acids. Again, these differences reflected the ones observed between the corresponding diets (Table 3) and between the two fats (SO and SAO) (Table 1). In fact, the lower linolenic acid content in SAO compared with SO evidenced that this fat by-product contained AO from the refining of soybean and sunflower oils [31]. Previous works performed using diets formulated with SO as a partial replacement of FO also revealed increments of linoleic and linolenic acids in fish muscle. For example, Izquierdo et al. [32] observed that linoleic acid content in seabass muscle raised from 5% to 17% and linolenic from 1% to 2% when using a diet with 19.7% of added fat and a 60% replacement of FO by SO. The lower linoleic acid percentage and the lower increase found by them in comparison to our results can be explained by the presence of a lower content of this FA in their diets (7% in FO and 26% in SO). The same work showed an influence of the fish species on the tendency to mirror the FA profile of the diet, with the increase of the linoleic acid percentage observed in gilthead sea bream flesh (from 6% to 24%) being greater than in seabass muscle [32]. Similarly, when Menoyo et al. [33] replaced 60 or 80% of FO by SO in diets with 17.6% added fat, the increases in the linoleic acid content of gilthead sea bream (from 6% to 24% with the diet with 60% of SO and to 28% with the diet with 80% of SO) were higher than the one observed in our study for European seabass. Although this fact might be due to the different species studied, it can be also related to the greater differences in the linoleic acid content between their diets (5% in FO diet, 30% in the diet with 60% of SO, and 39% in the one with 80% of SO) than among the diets used in this study (Table 3).

Regarding MUFA, the highest MUFA values in the present study were found in fillets from fish on OPO and OPAO diets ($\approx 48\%$), being higher than those found in FO and SO fillets. This agreed with the higher MUFA content in OPO and OPAO diets (Table 3) resulting from the addition of these fats of olive origin (Table 1). Likewise, the study carried out by Mourente et al. [34] showed an increment of oleic acid in fish flesh (from 16% to 28%) when European seabass was fed with a diet with 17.7% of added fat and a 60% of FO replacement by olive oil. However, a great number of factors beyond the fat source used in the diet can determine the FA profile of fish, such as the fish species used, the feeding period, the added fat percentage, or the proportion of FO replacement. For example, Nasopoulou et al. [35] did not obtain significant differences in oleic acid content for gilthead sea bream muscle probably because in diets, FO was substituted by only 8% of OPO. Another variable that affects the magnitude of FA modification is the type of muscle stud-

ied and its proportion between polar lipids, with structural functions, and neutral lipids [36, 37].

3.2. Tocopherol and Tocotrienol Composition of Fish Fillets. Vitamin E has an important role during fish rearing, as it helps preventing some diseases and contributes to a correct development of fish [38]. Moreover, the T and T3 deposited in fish fillets might have an important role in lipid oxidation, and thus, in their shelf life. The T and T3 contents in fresh and refrigerated European seabass fillets are presented in Table 5.

The contents of total T+T3 and α -T, which was the main tocol present in fish fillets, were not significantly affected by refrigeration. The refrigerated storage significantly reduced the β -T, γ -T, and β -T3 concentration in fillets coming from all diets. Literature results on the T and T3 stability during storage are controversial, as they might depend on the storage conditions and on the many factors that can affect T and T3 content in fish, such as the biology of the species, the source of vitamin E used in the diet, the presence of interacting compounds in the diet (such as selenium, vitamin C, or astaxanthin), or the PUFA content [39]. For example, mackerel-minced muscle kept into plastic bags significantly reduced its α -T content from 3.6 mg/kg to 1.0 mg/kg after 3 days of refrigeration at 4°C, and it continued dropping to 0.6 mg/kg after 7 and 11 days [40]. Another trial also showed that when rainbow trout specimens coming from a diet with 100 mg/kg of added α -tocopheryl acetate were packed into black nylon bags and refrigerated for 9 days at 1°C, the α -T concentrations in fillets decreased from 30.1 mg/kg to 19.1 mg/kg [41]. However, when seabass specimens fed diets with 4 different levels of α -tocopheryl acetate were kept in boxes, covered with flake-ice and black nylon bags, and stored in a refrigerated room at 1°C for 12 days, no significant variations in the vitamin E content (α -T + γ -T) of fillets were observed [42].

The total T + T3 content and the tocol profile of fresh and refrigerated fillets depended on the diet (Table 5), with the differences being in concordance with those observed between diets (Table 3) and between fat sources (Table 1). As animals are unable to synthesize T and T3, it is mandatory to have enough levels in diets to, at least, fulfill the essential requirements [43]. Since it might be difficult to reach them only with the T and T3 supplied by the added fat (Table 1) and by the rest of the feed ingredients, the addition of vitamin E in fish diets is a common practice in aquaculture. In this study, the vitamin-mineral premix supplied 192.23 mg of α -tocopheryl acetate per kg of feed (Table 2), making α -T the main tocol in all diets (Table 3) and, consequently, in fish fillets (Table 5). This also attenuated the differences in the tocol profile and in the total T + T3 content observed between the diets (Table 3). However, the influence of the type of fat used in each diet was still noticeable in the diets (Table 3) and thus reflected in the total T + T3 content and tocol profile of fresh and refrigerated fillets (Table 5). For instance, the partial substitution of FO by vegetable oils in fish diets increased T + T3 levels and modified the tocol profile of fish fillets (Table 5) because, among the fat sources, FO had the lowest total T + T3 concentration (Table 1).

TABLE 5: Tocopherol and tocotrienol content of fresh and refrigerated fish fillets coming from fish fed with the five experimental diets.

	α -T (mg/kg)	β -T (mg/kg)	γ -T (mg/kg)	δ -T (mg/kg)	β -T3 (mg/kg)	T + T3 (mg/kg)
Effect of the diet on fresh fillets						
FO ¹	6.98 ^c	0.09 ^c	0.43 ^c	0.05 ^c	0.12 ^b	7.68 ^c
SO ¹	9.12 ^{ab}	0.29 ^a	5.79 ^a	1.08 ^a	0.16 ^b	16.43 ^a
SAO ¹	8.02 ^{bc}	0.22 ^b	1.96 ^b	0.80 ^b	0.16 ^b	11.16 ^b
OPO ¹	10.44 ^a	0.19 ^b	0.71 ^c	0.04 ^c	0.22 ^a	11.60 ^b
OPAO ¹	9.17 ^{ab}	0.26 ^a	0.72 ^c	0.06 ^c	0.23 ^a	10.44 ^b
SEM ²	0.351	0.008	0.124	0.020	0.009	0.457
P_{diet} ³	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Effect of the diet on refrigerated fillets						
FO ¹	6.48 ^c	0.08 ^d	0.39 ^c	0.04 ^c	0.08 ^b	7.06 ^c
SO ¹	8.75 ^{ab}	0.26 ^a	5.20 ^a	0.97 ^a	0.12 ^{ab}	15.28 ^a
SAO ¹	8.15 ^b	0.21 ^b	1.84 ^b	0.73 ^b	0.13 ^{ab}	11.05 ^b
OPO ¹	10.03 ^a	0.17 ^c	0.64 ^c	0.04 ^c	0.19 ^a	11.07 ^b
OPAO ¹	9.38 ^{ab}	0.23 ^{ab}	0.63 ^c	0.04 ^c	0.18 ^a	10.45 ^b
SEM ²	0.287	0.008	0.127	0.016	0.018	0.395
P_{diet} ³	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Effect of the refrigeration						
Fresh Fillets ⁴	8.74	0.21	1.92	0.41	0.18	11.46
Refrigerated Fillets ⁴	8.56	0.19	1.74	0.35	0.14	10.98
SEM ²	0.144	0.004	0.056	0.008	0.006	0.191
$P_{refrigeration}$ ⁵	0.363	< 0.001	0.028	< 0.001	< 0.001	0.089
Effect of the interaction between refrigeration and diet						
$P_{refrigeration \times diet}$ ⁵	0.724	0.617	0.173	0.011	0.891	0.686

Abbreviations: For diet abbreviations (FO, SO, SAO, OPO and OPAO) see Table 2; T, tocopherol; T3, tocotrienol. ¹ Mean of the different replicates for each dietary treatment (n = 5). ² Standard error of the mean. ³ p values obtained from ANOVA (n = 25) of fresh or refrigerated fillets. Values in bold were significant (p < 0.05). The differences between dietary treatments found in fresh or refrigerated fillets with Scheffé's post hoc test (n = 25) were noted in the same column as a > b > c > d. ⁴ Pooled means of fresh or refrigerated fillets coming from the five dietary treatments (n = 25). ⁵ p values obtained for the refrigeration ($P_{refrigeration}$) and the interaction between the refrigeration time and the diet ($P_{refrigeration \times diet}$) from multifactor ANOVA (n = 50). Values in bold were significant (p < 0.05).

Regarding the vegetable fats, the total T + T3 levels were similar for OPO and OPAO, and the highest amount was found for SO, and even if SAO presented the second highest T + T3 amount, it was 7.8 times lower than that of S (Table 1). Consequently, SO fish fillets showed the highest T + T3 content and FO fish fillets the lowest ones (Table 5). Concerning the tocol profile of fish fillets, the highest α -T content was found for fillets from OPO diet, and similar α -T levels were found for OPAO and SO fillets, whereas fillets from SO diet had the highest levels of γ -T and δ -T, followed by the ones from SAO diet. This is also in concordance with the tocol profile of diets (Table 3) and fat sources (Table 1); as in fat sources, the highest γ -T levels were found for SO followed by SOA, with γ -T being the main compound in SO and α -T in SOA, which evidenced the presence of AO of sunflower origin [31]. The use of OPAO diet led to a similar T + T3 content and profile in fish fillets as OPO diet, except for a higher β -T content, which is in concordance with the similar tocol profile between these two fat sources (Table 1). Comparing SO with SAO, SO had a much higher α -T content than SAO (Table 1), but these differences were attenuated in the diets (Table 3) and led to fish

fillets with similar α -T content (Table 5). Some modifications in the tocol profile of fish flesh when vegetable oils are added to fish diets have been reported before. For instance, Regost et al. [44] demonstrated that the α -T content was lower in Atlantic salmon fed with FO and SO diets than with low-erucic acid rapeseed oil, and that the highest γ -T level was observed for SO diet. Ng et al. [45] showed an increase in total T + T3 levels (from 7.5 to 19.3 mg/kg) and T3 content (from 1.0 mg/kg to more than 5.0 mg/kg) of catfish muscle with the replacement of FO by palm fatty acid distillate in the diet (from 0% to 100%). Also, Trullas et al. [46] reported a greater content of β -T + γ -T and total T + T3 in rainbow trout when FO was replaced by 75% of different types of experimental rapeseed oils in diets with 20.1% added fat.

3.3. Lipid Hydroperoxide Content and Oxidative Stability of Fish Fillets. Primary oxidation of fresh and refrigerated fillets was evaluated by the LHP content obtained by the FOX method after a 30 min incubation. The LHP content in fresh fillets was too low to be quantifiable. However, the refrigerated storage increased the LHP content, with the levels being

higher in refrigerated FO fillets (0.10 mmol/kg) than in OPO fillets (0.04 mmol/kg) (Figure 1). This might be related to the different FA unsaturation of fillets from different dietary treatments (Table 4), as FO fillets showed the highest content of unsaturated FA, whereas OPO fillets had the lowest.

The oxidative stability of the different samples (the higher the formation of LHP, the lower the oxidative stability) was evaluated by measuring the LHP by the FOX assay after an incubation period of 96 h (Final LHP value, Figure 2).

The effect of the interaction between the refrigeration time and the diet on the final LHP value was not significant. Also, the refrigerated storage for 6 days at the conditions assayed in this study did not affect the oxidative stability of the fillets. However, there were significant differences for this parameter between the diets (Figure 2) that were in concordance with the FA profile and the T and T3 content of fish fillets. The lowest oxidative stability was found for FO fillets, and it could be associated with its higher EPA and DHA contents, which are FA with a great tendency to suffer lipid oxidation [47]. This fact was supported by the significant Pearson's correlations between the final LHP value and EPA ($r = 0.836$; $p < 0.001$) and DHA percentages ($r = 0.850$; $p < 0.001$). As Figure 2 shows, SO and SAO diets led to fish fillets with an intermediate oxidative stability. Fillets coming from both diets were rich in linoleic and linolenic acid contents (Table 4), which are less susceptible to oxidize than EPA and DHA but more than MUFA. In addition, SO and SAO fillets had a significantly higher T + T3 content than FO fillets (Table 5), which might help preventing oxidation reactions. In fact, the final LHP value was negatively correlated with the content of the main tocopherol (α -T) in fish fillets ($r = -0.807$; $p < 0.001$). Despite SO fillets presented the highest T + T3 levels (Table 5), FA unsaturation was similar in SO and SAO fillets (Table 4), which led to similar behaviors in terms of oxidative stability. The highest oxidative stability was found for OPO and OPAO fillets, and this might also be related with their FA profile (Table 4), in which MUFA were the main type of FA, and PUFA had less relevance than in the other fillets. This is in agreement with the negative correlation found between final LHP value and oleic acid percentage ($r = -0.820$; $p < 0.001$). Therefore, lipid oxidative stability was clearly influenced by the botanical origin of the fat source used, but there was not an observable impact of the type (crude or acid) of vegetable oil. In this sense, the upcycling of SAO or OPAO as a replacement of FO in fish diets could improve the lipid oxidative stability in a similar way than their corresponding crude oils.

3.4. TBA Values of Fish Fillets. The presence of MDA as secondary oxidation product in fish fillets from the different diets was evaluated by the TBA values (Figure 3).

The TBA values of fish fillets were significantly affected by the refrigeration time ($p < 0.001$) and the diet used (for fresh fillets $p < 0.001$ and for refrigerated fillets $p = 0.006$), although there was no significant effect of the interaction between the two factors. The TBA values increased from the range of 112 μg MDA/kg–412 μg MDA/kg to 488 μg MDA/kg–1051 μg MDA/kg during the refrigerated storage

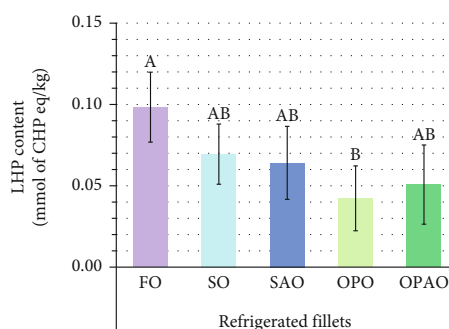


FIGURE 1: Primary oxidation of refrigerated fillets: lipid hydroperoxide content (obtained after an incubation time of 30 min) from the five dietary treatments of interest. The results were represented as mean \pm standard deviation ($n = 5$) of CHP concentrations (mmol/kg). The differences between dietary treatments found in refrigerated fillets with Scheffé's post hoc ($n = 25$) were noted as A>B. Abbreviations: For diet abbreviations (FO, SO, SAO, OPO, and OPAO), see Table 2; LHP: lipid hydroperoxide; CHP: cumene hydroperoxide.

of fish fillets packed in modified atmosphere. Generally, the results found in the literature are in concordance with the development of secondary oxidation reactions in fish during storage observed in our study. For instance, Kyra and Lougovois [48] also found increases in the TBA values (from 370 to 650 μg MDA/kg) in skinned fillets from gutted European seabass stored in ice inside a refrigerator (0°C – 4°C) for 22 days. Likewise, TBA values gradually increased in fillets from rainbow trout packed into black nylon bags and stored at 1°C for 9 days and revealed that a higher α -tocopherol acetate content in the feed led to a higher α -T in trout fillets and a lower TBA values [41].

Concerning the effect of the diet on fillet TBA values, significant differences were observed between FO and the other dietary treatments (Figure 3), with the highest TBA values being found in FO fillets. This agreed with FO fillets showing the lowest oxidative stability (Figure 2), a fact that might be associated with their highest n-3 LC-PUFA content and the lowest T + T3 levels. Accordingly, TBA values had a strong positive correlation with various LC-PUFA, such as arachidonic acid (C20:4 n-6) ($r = 0.943$; $p < 0.001$), C20:3 n-3 ($r = 0.879$; $p < 0.001$), EPA ($r = 0.936$; $p < 0.001$), and DHA ($r = 0.942$; $p < 0.001$). Our observations about the impact of the diet on TBA values are in agreement with those obtained by Regost et al. [44] in Atlantic salmon, who also observed higher TBA levels when FO was added (at 29.8%) to the diet instead of SO. Contrarily, Trullàs et al. [46] found no significant differences in fillets of rainbow trout fed with a FO diet (20%) or those with vegetable fat sources (75% of FO replacement), but in that case, FO fillets showed the highest content in α -T.

3.5. Content of Volatile Compounds of Fish Fillets. The formation of volatile compounds can lead to a loss of sensorial attributes, because they are contributors to the aromatic profile of the fish. Nevertheless, the influence of volatile

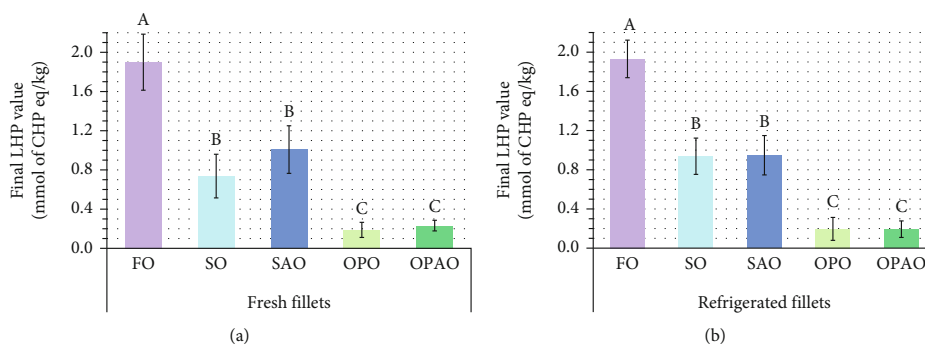


FIGURE 2: Oxidative stability: final lipid hydroperoxide value obtained after an incubation time of 96 h for fresh fillets (a) and refrigerated fillets (b) from the five diets of interest. The results were represented as mean \pm standard deviation ($n = 5$) of CHP concentrations (mmol/kg). The differences between dietary treatments found in fresh or refrigerated fillets with Scheffé's post hoc test ($n = 25$) were noted as $A > B > C$. Abbreviations: For diet abbreviations (FO, SO, SAO, OPO, and OPAO), see Table 2; LHP: lipid hydroperoxide; CHP: cumene hydroperoxide.

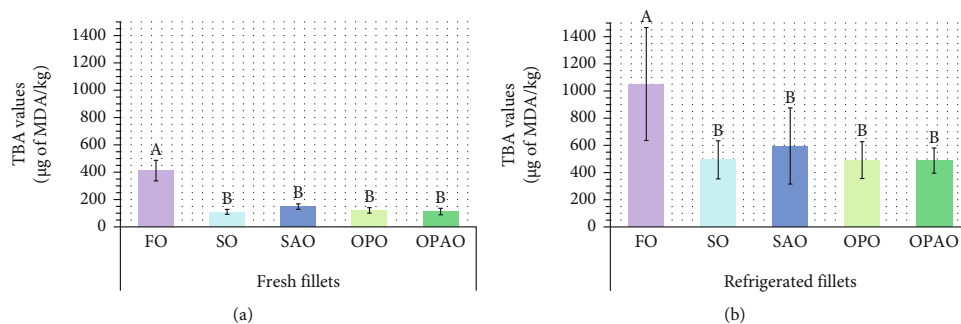


FIGURE 3: Secondary oxidation: TBA values of fresh fillets (a) and refrigerated fillets (b) coming from the different dietary treatments. The results were represented as mean \pm standard deviation ($n = 5$) of TBA values (μg of MDA/kg). The differences between dietary treatments found in fresh or refrigerated fillets with Scheffé's post hoc test ($n = 25$) were noted as $A > B$. Abbreviations: For diet abbreviations (FO, SO, SAO, OPO, and OPAO), see Table 2; MDA: malondialdehyde.

compounds on the odor depends not only on their concentration but also on their odor threshold. In the present study, a total of twelve compounds were identified in fresh and refrigerated European seabass fillets, including seven aldehydes (propanal, pentanal, hexanal, heptanal, (Z)-4-heptenal, octanal, and nonanal), three alcohols (1-penten-3-ol, (Z)-2-penten-1-ol, and 1-octen-3-ol), one ketone (2-octanone), and one furane (2-pentylfuran) (Table 6). Generally, in meat and fish products, aldehydes are considered crucial compounds, as they are characterized for possessing a lower odor threshold than alcohols and ketones [49].

There was not a significant effect of the interaction between the two main factors (refrigeration time and diet) on any volatile compound. The content of all the identified compounds suffered a noticeable increment after the refrigerated storage (Table 6).

Regarding the differences observed between dietary treatments, in fresh fillets, heptanal was the only aldehyde significantly affected by the diet ($p = 0.024$), but Scheffé's post hoc test was not able to separate the means of the differ-

ent diets (Table 6). Heptanal might be associated with the oxidation of n-9 MUFA (such as oleic acid) or n-6 PUFA (such as linoleic or arachidonic acids) [49, 50]. For the aldehydes in refrigerated fillets, significant differences between dietary treatments were only found for propanal (Table 6), with the levels in FO fillets ($6 \mu\text{g}/\text{kg}$) being higher than in OPAO fillets ($2 \mu\text{g}/\text{kg}$). Propanal has been linked to the oxidation of n-3 PUFA [51], and, in this case, its relation with the development of lipid oxidation could be confirmed by its strong correlation with the TBA values ($r = 0.751$; $p < 0.001$). In our study, the main aldehyde observed in fish fillets was hexanal, which has been associated with n-6 PUFA oxidation, and it is commonly used as an indicator of lipid oxidation [49, 50]. However, in this work, hexanal was not significantly affected by the diet, contrary to what was observed for propanal. This is in agreement with some authors that have proposed propanal and heptanal as better indicators of rancidity in fish, whereas hexanal would usually be better correlated with meat flavor deterioration [52, 53]. The other aldehydes found in fish fillets could also

TABLE 6: Volatile compounds ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of fresh and refrigerated European seabass filets.

	Propanal	Pentanal	Hexanal	Heptanal	(Z)-4-Heptenal	Octanal	Nonanal	1-Penten-3-ol	(Z)-2-Penten-1-ol	1-Octen-3-ol	2-Octanone	2-Pentyfuran
<i>Effect of the diet on fresh filets</i>												
FO ¹	2.7	7.0	46.6	9.6	1.2	3.1	7.0	34.8	5.7	49.8 ^a	4.5	9.9 ^b
SO ¹	1.7	5.4	42.8	5.4	0.7	1.9	6.4	23.2	4.6	24.3 ^b	3.0	13.0 ^{ab}
SAO ¹	1.7	5.1	36.9	4.8	1.2	2.2	6.2	15.9	2.2	21.8 ^b	3.5	22.5 ^a
OPO ¹	2.2	6.7	32.3	4.6	0.8	2.1	5.8	26.8	5.9	23.9 ^b	3.8	9.5 ^b
OPAO ¹	1.9	4.1	25.6	4.4	0.8	1.3	4.7	22.6	5.0	21.2 ^b	4.0	11.0 ^b
SEM ²	0.458	1.616	9.024	1.166	0.319	0.500	1.157	4.447	1.141	4.065	0.465	2.296
<i>P</i> _{diet} ³	0.516	0.708	0.511	0.024	0.765	0.192	0.722	0.083	0.202	< 0.001	0.200	0.004
<i>Effect of the diet on refrigerated filets</i>												
FO ¹	6.0 ^a	14.3	100.6	15.1	2.1	4.6	11.8	84.9 ^a	15.4 ^a	126.5 ^a	4.9	14.1
SO ¹	3.8 ^{ab}	17.5	100.3	15.6	2.5	3.6	11.0	40.5 ^b	7.9 ^{ab}	64.6 ^b	7.0	33.1
SAO ¹	3.6 ^{ab}	9.0	91.2	8.2	2.3	3.7	9.0	42.6 ^b	6.0 ^b	66.9 ^b	5.0	33.9
OPO ¹	3.3 ^{ab}	14.8	62.0	9.8	1.7	3.2	10.1	49.9 ^{ab}	10.7 ^{ab}	60.4 ^b	5.3	12.2
OPAO ¹	2.5 ^b	8.9	57.2	13.9	2.5	4.6	10.0	46.4 ^{ab}	8.8 ^{ab}	65.1 ^b	5.4	18.5
SEM ²	0.560	2.824	12.710	3.301	0.910	0.909	3.010	7.829	1.586	11.956	0.519	6.236
<i>P</i> _{diet} ³	0.005	0.192	0.060	0.469	0.971	0.774	0.977	0.005	0.008	0.004	0.067	0.068
<i>Effect of the refrigeration</i>												
Fresh Filets ⁴	2.1	5.6	36.8	5.8	0.9	2.1	6.0	24.6	4.7	28.2	3.8	13.2
Refrigerated Filets ⁴	3.8	12.9	82.2	12.5	2.2	3.9	10.4	52.9	9.8	76.7	5.5	22.4
SEM ²	0.228	1.022	4.908	1.096	0.302	0.326	1.010	2.829	0.615	3.953	0.220	2.081
<i>P</i> _{refrigeration} ⁵	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.006	< 0.001	0.005	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.004
<i>Effect of the interaction between refrigeration and diet</i>												
<i>P</i> _{refrigeration x diet} ⁵	0.108	0.437	0.559	0.595	0.941	0.622	0.989	0.112	0.141	0.179	0.050	0.364

Abbreviations: For diet abbreviations (FO, SO, SAO, OPO and OPAO) see Table 2. ¹ Mean of the different replicates for each dietary treatment (n = 5) expressed as 4-methyl-2-pentanol equivalents. ² Standard error of the mean. ³ *p* values obtained from ANOVA (n = 25) of fresh or refrigerated filets. Values in bold were significant (*p* < 0.05). The differences between dietary treatments found in fresh or refrigerated filets with Scheffé's post hoc test were noted in the same column as a > b. ⁴ Pooled means of fresh or refrigerated filets coming from the five dietary treatments (n = 25). ⁵ *p* values obtained for the refrigeration (*P*_{refrigeration}) and the interaction between the refrigeration time and the diet (*P*_{refrigeration x diet}) from multifactor ANOVA (n = 50). Values in bold were significant (*p* < 0.05).

be linked to oxidation reactions of some specific FA, octanal and nonanal might be associated to n-9 MUFA oxidation, pentanal might come from the oxidative degradation of n-6 PUFA, and (Z)-4-heptenal might be formed during n-3 PUFA oxidation [49], but results did not reveal any significant effect of the dietary treatment on any of them.

Similar to aldehydes, the presence of some alcohols, as the three identified in fish fillets in this study, might be related with lipid oxidation. For example, 1-octen-3-ol was the most important alcohol found in fish fillets, which is well-known because of its low odor threshold [49] and might be generated from n-6 PUFA oxidation [54]. In this study, the highest 1-octen-3-ol content was found in FO fillets (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in fresh fillets and 126 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in refrigerated fillets). This is in agreement with the highest arachidonic acid amount obtained for FO fillets even though they did not have the highest total n-6 PUFA content (Table 4). In addition, 1-octen-3-ol was the volatile compound that most correlated with arachidonic acid content ($r = 0.785$, $p < 0.001$). In refrigerated fish fillets, the diet also had a significant impact on the content of the other two alcohols identified: 1-penten-3-ol and 2-pentenol. Refrigerated FO fillets showed higher levels of 1-penten-3-ol than refrigerated SO and SAO fillets and higher content of (Z)-2-penten-1-ol than SAO fillets (Table 6). This alcohol has been associated with the oxidation of n-3 PUFA, such as linolenic acid, EPA, and DHA [50, 55]. The isomer (E)-2-pentenol has been identified by other authors in sardines, turbot, mussels, and clams [56], whereas (Z)-2-penten-1-ol has been proposed as a potential marker for salmon freshness [57] and for oxidation of krill oil during storage [58]. In fact, some authors have related the formation of this last alcohol with the oxidation of n-3 PUFA, concretely of EPA and DHA [50, 59].

The only ketone identified in this study was 2-octanone, which was a minor volatile compound in fresh ($\approx 4 \mu\text{g}/\text{kg}$) and refrigerated fish fillets ($\approx 6 \mu\text{g}/\text{kg}$). Some studies have linked the formation of this ketone to the oxidation of unsaturated FA, but any of them have specified the type of FA that can be involved [60–62]. However, Parlapani et al. [63] reported a bacterial origin for 2-octanone in a model substrate of seabream (made of sterile flesh fish juice agar) only when it was inoculated with different bacteria (*Pseudomonas* and *Carnobacterium/Lactobacillus*) and stored in modified atmosphere (CO_2 : 60%, O_2 : 10%, and N_2 : 30%) for 18 days at 0°C or for 2 days at 15°C.

The last compound found in fish fillets was 2-pentylfuran which has been associated with n-6 PUFA oxidation [49]. The diet had a significant effect on the content of this compound in fresh fillets but not in refrigerated fillets. Fresh SAO led to higher values (22 $\mu\text{g}/\text{kg}$) than FO, OPO, or OPAO fillets (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ –11 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Despite some volatile compounds can be formed by other reactions not related to FA, such as amino acid degradation or microbial action [49], the relation between the volatile compound formation and lipid oxidation in this study was clear. The significant increase of all volatile compounds in fish fillets after the refrigeration agreed with the development of oxidation reactions (Figure 3). Moreover, strong correlations were found not only for different volatile com-

pounds and the TBA values but also for the total aldehyde content ($r = 0.715$; $p < 0.001$). Also, the differences in volatile compounds observed between FO fillets and fillets from the rest of the diets agreed with their higher TBA values.

3.6. Color of Fish Fillets. The behavior of the color parameters (L^* , a^* , and b^*) in the different diets was the same in fresh than in refrigerated fillets (Table 7). The refrigerated storage had a significant impact on L^* and a^* , whereas no effect was found for b^* . The lightness of the fillets increased after the refrigerated period and the a^* values decreased, implying that refrigerated fillets lost redness and gained greenness compared with fresh fillets.

The ΔE_R parameter that compares instrumental color parameters between fresh and refrigerated fillets reflected that the greatest color stability was found for SO fillets (0.6), whereas FO fillets were the ones which experienced the highest color change after the refrigerated storage (2.4). Since ΔE_R values were in all cases lower than 5 [26], these differences in color parameters might not be perceived by the human eye.

Color differences among fresh fillets from the studied dietary treatments were significant for L^* and a^* . The highest L^* value was observed for SO fresh fillets, whereas FO and OPAO fresh fillets had the lowest values. However, FO fresh fillets were the ones with highest a^* . Accordingly, compared to FO fresh fillets, the highest similarities in color were found for OPAO fresh fillets ($\Delta E_D = 0.8$) and the greatest differences for SO fresh fillets ($\Delta E_D = 2.4$). In the case of refrigerated fillets, significant differences were found only in a^* between FO fillets and SO and OPO fillets. However, considering all three parameters, OPO fillets ($\Delta E_D = 0.8$) had the greatest color similarities to FO refrigerated fillets, whereas OPAO fillets ($\Delta E_D = 0.9$) were the least similar to FO fillets. As ΔE_D in all cases was lower than 5 [26], the color changes of fresh and refrigerated fillets due to the partial substitution of FO for SO, SAO, OPO, or OPAO might not be perceptible by the human eye.

The facts that are behind the color changes in fish and fish products are not as clear as in the case of meat [64] and are less studied in white fish muscle than in flesh rich in pigments, such as salmon. Two different trials showed that 60% or 80% FO replacement by vegetable oils (SO or linseed oil) reduced a^* and b^* in seabream fillets [30, 33]. In the present study, yellowness (b^*) was the most stable parameter as it was not influenced by the refrigeration, and there was no strong correlation between the lightness, redness, or yellowness and lipid oxidation parameters. Contrarily, another study related the increase of b^* in dark muscle of yellowtail after 2 days of storage in ice to the development of lipid oxidation [65]. These differences between our results and the ones found in the literature can be due to the different conditions (type of muscles, fish species, or processing and storage conditions) used in each case.

3.7. Sensory Acceptance of Fish Fillets. Refrigeration had no significant effect on the overall acceptance of European seabass filets (Table 7). Despite ANOVA showed significant

TABLE 7: Color parameters (L^* , a^* , b^* , and ΔE values) and consumer overall acceptance of fresh and refrigerated fish fillets.

	L^*	a^*	b^*	Color parameters		Overall acceptance
				ΔE_R^1 (Fresh vs refrigerated)	ΔE_D^1 (F vs other dietary treatments)	Sensory scores
<i>Effect of the diet on fresh fillets</i>						
FO ²	73.33 ^b	3.81 ^a	9.11	2.35		6.57
SO ²	75.35 ^a	2.57 ^b	8.99	0.64	2.38	5.97
SAO ²	74.67 ^{ab}	2.92 ^b	8.87	1.39	1.63	5.67
OPO ²	74.84 ^{ab}	3.00 ^b	9.35	1.18	1.73	5.30
OPAO ²	73.24 ^b	3.01 ^b	8.94	1.65	0.82	5.03
SEM ³	0.412	0.142	0.102			0.350
p_{diet}^4	0.004	< 0.001	0.032			0.023
<i>Effect of the diet on refrigerated fillets</i>						
FO ²	75.47	2.85 ^a	9.32			6.13
SO ²	75.61	2.04 ^b	9.25		0.83	6.57
SAO ²	75.70	2.28 ^{ab}	8.88		0.89	5.77
OPO ²	75.57	2.10 ^b	9.51		0.78	5.40
OPAO ²	74.73	2.33 ^{ab}	9.09		0.93	5.70
SEM ³	0.463	0.142	0.180			0.326
p_{diet}^4	0.609	0.006	0.125			0.115
<i>Effect of the refrigeration</i>						
Fresh Fillets ⁵	74.29	3.06	9.05			5.71
Refrigerated Fillets ⁵	75.42	2.32	9.20			5.91
SEM ³	0.196	0.064	0.065			0.151
$p_{refrigeration}^6$	< 0.001	< 0.001	0.145			0.335
<i>Effect of the interaction between refrigeration and diet</i>						
$p_{refrigeration \times diet}^6$	0.266	0.508	0.806			0.481

Abbreviations: For diet abbreviations (FO, SO, SAO, OPO and OPAO) see Table 2; L^* , Lightness; a^* , redness; b^* yellowness. ¹ ΔE values were calculated by Equation (1) ($\Delta E > 5$ would mark differences in instrumental color perceptible by the human eye [26]). ² Mean of the different replicates for each dietary treatment (n = 5 for color parameters and n = 30 for sensory scores). ³ Standard error of the mean. ⁴ p values obtained from ANOVA (n = 25 for color parameters and n = 150 for sensory scores) of fresh or refrigerated fillets. Values in bold were significant ($p < 0.05$). The differences between dietary treatments found in fresh or refrigerated fillets with Scheffé's post hoc test were noted in the same column as a > b. ⁵ Pooled means of fresh or refrigerated fillets coming from the five dietary treatments (n = 25 for color parameters and n = 150 for sensory scores). ⁶ p values obtained for the refrigeration ($p_{refrigeration}$) and the interaction between the refrigeration time and the diet ($p_{refrigeration \times diet}$) obtained from multifactor ANOVA (n = 50 for color parameters and n = 300 for sensory scores). Values in bold were significant ($p < 0.05$).

differences between dietary treatments in fresh fillets, Scheffé's post hoc test could not separate the means of the different diets. After the refrigerated storage, the diet used did not significantly affect the overall acceptance of fish fillets.

In our study, the significant increase of TBA values and volatile compound content observed during the refrigerated storage did not result in a reduction of the overall acceptability. A great number of trials associate the loss of the sensory acceptance with the secondary oxidation products measured by TBA values [66–68]. In seabass fillets, sensory rejection was found by trained panelists at TBA values between 700–2,400 μg MDA/kg [67]. The TBA values found for fresh and refrigerated European seabass fillets in our study were not higher than these levels. This indicates that lipid oxidation during the processing and storage of fish fillets may not have developed enough to affect the sensorial properties, which agreed with the results obtained in the overall acceptance test.

In the literature, it has been reported that the use of vegetable oils in fish feeds can alter the sensory characteristics of fresh fish flesh [6]. However, in agreement with our observations, the results obtained by Montero et al. [69] revealed that the organoleptic properties of fresh European seabass fillets were not modified due to the inclusion of vegetable oils (60% of SO, rapeseed, or linseed oils) in diets. Also in other studies, the acceptability of fresh seabream fillets [30, 32] and of seabass fillets [32] was not affected by the dietary supplementation with vegetable oils (SO, rapeseed, or linseed oils at 60% or 80%).

4. Conclusions

The partial substitution of FO with SO, SAO, OPO, or OPAO in fish diets reduced EPA and DHA contents and increased T+T3 in fish fillets. Even though, the recommended EPA plus DHA amount for human daily intake (250 mg) could be covered with 100 g of fish fillets coming

from all experimental diets. These changes in fillet composition led to a decrease of lipid oxidation reactions in fish fillets coming from SO, SAO, OPO, and OPAO diets, revealed by a lower final LHP value, a lower TBA value, and a lower formation of some volatile compounds (e.g., 1-octen-3-ol) in fresh and refrigerated fillets. Moreover, the partial substitution of FO for SO, SAO, OPO, or OPAO did not affect the overall acceptability and may not have influenced consumer's perception of the color of the fish fillets. According to the results obtained in this study, in general, the partial replacement of FO by AO instead of crude oils of similar FA composition similarly affected the oxidative parameters, the color, or the overall acceptance of fish fillets. Overall, the findings show that the final FA composition, T content, and oxidative stability of fish fillets might be more dependent on the botanical origin of acid oils (and thus, on their FA composition and T content), than on the fact that they are acid or crude oils, at least when their quality (MIU value) is close to the recommended values [11, 27].

A clear development of lipid oxidation during the refrigerated storage of European seabass fillets was observed with the increment of TBA values and of the volatile compound content of fish fillets, which occurred in all experimental diets. However, the storage conditions ($\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{O}_2$; 40/30/30; 2°C; 6 days) were adequate to prevent a loss of overall acceptance of fish fillets and might have prevented color changes perceptible by the human eye. Overall, from the quality flesh point of view, it could be possible to upcycle these refining by-products to partially substitute FO in fish diets instead of using crude oils of similar botanical origin.

Abbreviations

AO:	Acid oil
CHP:	Cumene hydroperoxide
DAG:	Diacylglycerol
DHA:	Docosahexaenoic acid
EPA:	Eicosapentaenoic acid
FA:	Fatty acid
FFA:	Free fatty acid
FO:	Fish oil
FOX:	Ferrous oxidation-xylenol orange
GC-FID:	Gas chromatography with flame ionization detector
HS-SPME-GC-MS:	Headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry
I:	Insoluble impurities
LHP:	Lipid hydroperoxide
M:	Moisture and volatile matter
MAG:	Monoacylglycerol
MDA:	Malondialdehyde
MIU:	Moisture and volatile matter + insoluble impurities + unsaponifiable matter
MUFA:	Monounsaturated fatty acid
n-3 LC-PUFA:	n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid
ND:	Not detected
OPO:	Crude olive pomace oil

OPAO:	Olive pomace acid oil
PUFA:	Polyunsaturated fatty acid
SAO:	Soybean-sunflower (55:45, w/w) acid oil
SFA:	Saturated fatty acid
SO:	Crude soybean oil
T:	Tocopherol
T3:	Tocotrienol
TAG:	Triacylglycerol
TBA:	Thiobarbituric acid
U:	Unsaponifiable matter

Data Availability

All data will be available upon request.

Conflicts of Interest

The authors report no conflicts of interest.

Authors' Contributions

P. Albendea was responsible of the conceptualization, validation, formal analysis, investigation, data curation, writing the original draft, and visualization. A. Tres managed the conceptualization, methodology, validation, data curation, writing the review, editing, visualization, and supervision. M. Rafecas was responsible of the conceptualization, methodology, writing the review, editing, and funding acquisition. S. Vichi was in charge of the conceptualization, methodology, validation, writing the review, and editing. R. Sala managed the conceptualization, resources, methodology, validation, writing the review, editing, and project administration. F. Guardiola was responsible of the conceptualization, resources, methodology, validation, writing the review, editing, visualization, supervision, project administration, and funding acquisition.

Acknowledgments

The authors acknowledge Nutrion Internacional S.L.U., Refinación Industrial Oleícola S.A., and Bunge Ibérica S.A.U. for freely providing the vegetable fat sources used in this study. We also thank Francisco Javier Alarcón López from Ceimar-University of Almería (Service of Experimental Diets) for helping in the manufacturing process of the experimental feeds used and the staff at IRTA aquaculture center for their technical support. This research has been supported by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by "ERDF A way of making Europe" through the project (AGL2015-64431-C2-2-R), by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by "ESF Investing in your future" through the grant (RYC-2017-23601), and by the Spanish Ministry of Universities through the predoctoral contract within the FPU program (FPU18/01010).

Supplementary Materials

The supplementary material details the analytical methods applied to diets to determine fatty acid composition,

tocopherol and tocotrienol content and lipid class composition, and the complete FA profile of fish fillets, including minor FA (Table S1). (*Supplementary Materials*)

References

- [1] FAO, *Fishery and Aquaculture Statistics 2018*, FAO, Rome, Italy, 2020.
- [2] World Bank, *Fish to 2030: Prospects for fisheries and aquaculture. Report number 83177-GLB*, Washington DC, USA, 2013, <http://documents.worldbank.org/curated/en/2013/12/18882045/fish-2030-prospects-fisheries-aquaculture>.
- [3] FAO, *Use of fishmeal and fish oil in aquafeeds - Further thoughts on the fishmeal trap*, Rome, Italy, 1997, <https://www.fao.org/3/y3781e/y3781e.pdf>.
- [4] J. R. Sargent and A. G. J. Tacon, "Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat," *The Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 58, no. 2, pp. 377–383, 1999.
- [5] G. Mourente and J. G. Bell, "Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet," *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 145, no. 3–4, pp. 389–399, 2006.
- [6] C. Nasopoulou and I. Zabetakis, "Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds: a review," *LWT*, vol. 47, no. 2, pp. 217–224, 2012.
- [7] N. Smichi, B. E. Abdelmalek, N. Kharrat et al., "The effects of storage on quality and nutritional aspects of farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle: *in vitro* oils digestibility evaluation," *Fisheries Research*, vol. 188, pp. 74–83, 2017.
- [8] S. Maqsood and S. Benjakul, "Retardation of haemoglobin-mediated lipid oxidation of Asian sea bass muscle by tannic acid during iced storage," *Food Chemistry*, vol. 124, no. 3, pp. 1056–1062, 2011.
- [9] F. D. Gunstone, *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2nd edition, 2011.
- [10] G. M. Turchini, B. E. Torstensen, and W. K. Ng, "Fish oil replacement in finfish nutrition," *Reviews in Aquaculture*, vol. 1, no. 1, pp. 10–57, 2009.
- [11] E. Varona, A. Tres, M. Rafecas, S. Vichi, A. C. Barroeta, and F. Guardiola, "Composition and nutritional value of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding," *Animals*, vol. 11, no. 1, p. 196, 2021.
- [12] C. Trullàs, R. Fontanillas, A. Tres, and R. Sala, "Vegetable re-esterified oils in diets for rainbow trout: effects on fatty acid digestibility," *Aquaculture*, vol. 444, pp. 28–35, 2015.
- [13] G. Verge-Mèrida, A. C. Barroeta, C. Ferrer et al., "Olive pomace and soybean-sunflower acid oils as alternative fat sources in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) diets: effects on performance, digestibility and flesh fatty acid composition and quality parameters," *Animals*, vol. 12, no. 9, p. 1198, 2022.
- [14] E. Varona, A. Tres, M. Rafecas, S. Vichi, R. Sala, and F. Guardiola, "Oxidative quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding," *Animals*, vol. 11, no. 9, p. 2559, 2021.
- [15] E. Varona, A. Tres, M. Rafecas, S. Vichi, A. C. Barroeta, and F. Guardiola, "Methods to determine the quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding," *MethodsX*, vol. 8, article 101334, 2021.
- [16] EU, "Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes," *Official Journal of the European Union*, vol. 276, pp. 33–79, 2010.
- [17] NRC, *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*, National Academies Press, Washington DC, USA, 2011.
- [18] R. Bou, F. Guardiola, A. Tres, A. C. Barroeta, and R. Codony, "Effect of dietary fish oil, α -tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat," *Poultry Science*, vol. 83, no. 2, pp. 282–292, 2004.
- [19] M. Aleman, C. D. Nuchi, R. Bou et al., "Effectiveness of antioxidants in preventing oxidation of palm oil enriched with heme iron: a model for iron fortification in baked products," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 112, no. 7, pp. 761–769, 2010.
- [20] A. Grau, R. Codony, M. Rafecas, A. G. Barroeta, and F. Guardiola, "Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xylenol orange method," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 9, pp. 4136–4143, 2000.
- [21] A. Tres, C. D. Nuchi, R. Bou, R. Codony, and F. Guardiola, "Assessing rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through the ferrous oxidation-xylenol orange method," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 111, no. 6, pp. 563–573, 2009.
- [22] A. Grau, F. Guardiola, J. Boatella, A. Barroeta, and R. Codony, "Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 4, pp. 1155–1159, 2000.
- [23] N. A. Botsoglou, D. J. Fletouris, G. E. Papageorgiou, V. N. Vasiliopoulos, A. J. Mantis, and A. G. Trakatellis, "Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 42, no. 9, pp. 1931–1937, 1994.
- [24] A. R. Robertson, "The CIE 1976 color-difference formulae," *Color Research and Application*, vol. 2, no. 1, pp. 7–11, 1977.
- [25] CIE, *Colorimetry*, CIE, International Commission on Illumination, Vienna, Austria, 3rd edition, 2004.
- [26] C. Costa, S. D'Andrea, R. Russo, F. Antonucci, F. Pallottino, and P. Menesatti, "Application of non-invasive techniques to differentiate sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) quality cultured under different conditions," *Aquaculture International*, vol. 19, no. 4, pp. 765–778, 2011.
- [27] FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal), "Normas FEDNA de control de calidad de ingredientes para piensos-Especificación técnica de materia prima, grasas y aceites," 2002, http://www.fundacionfedna.org/sites/default/files/8_Grasas_y_aceites.pdf.
- [28] K. Kwasek, A. L. Thorne-Lyman, and M. Phillips, "Can human nutrition be improved through better fish feeding practices? A review paper," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 60, no. 22, pp. 3822–3835, 2020.
- [29] EFSA, *Dietary reference values for nutrients. Summary report*, EFSA Supporting Publication, 2017.
- [30] M. S. Izquierdo, D. Montero, L. Robaina, M. J. Caballero, G. Rosenlund, and R. Ginés, "Alterations in fillet fatty acid

- profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding," *Aquaculture*, vol. 250, no. 1–2, pp. 431–444, 2005.
- [31] Codex Alimentarius, "Standard for named vegetable oils (CXS 210-1999)," in *Codex Alimentarius, International food standards*, Rome, Italy, 1999 Adopted in 1999; Revised in 2001, 2003, 2009, 2017, 2019; Amended in 2005, 2011, 2013, 2015, 2019.
- [32] M. S. Izquierdo, A. Obach, L. Arantzamendi, D. Montero, L. Robaina, and G. Rosenlund, "Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality," *Aquaculture Nutrition*, vol. 9, no. 6, pp. 397–407, 2003.
- [33] D. Menoyo, M. S. Izquierdo, L. Robaina, R. Ginés, C. J. Lopez-Bote, and J. M. Bautista, "Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils," *The British Journal of Nutrition*, vol. 92, no. 1, pp. 41–52, 2004.
- [34] G. Mourente, J. E. Good, and J. G. Bell, "Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 α , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet," *Aquaculture Nutrition*, vol. 11, no. 1, pp. 25–40, 2005.
- [35] C. Nasopoulou, G. Stamatakis, C. A. Demopoulos, and I. Zabetakis, "Effects of olive pomace and olive pomace oil on growth performance, fatty acid composition and cardio protective properties of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*)," *Food Chemistry*, vol. 129, no. 3, pp. 1108–1113, 2011.
- [36] J. G. Bell, J. McEvoy, D. R. Tocher, F. McGhee, P. J. Campbell, and J. R. Sargent, "Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism," *The Journal of Nutrition*, vol. 131, no. 5, pp. 1535–1543, 2001.
- [37] B. E. Torstensen, L. Frøyland, and Ø. Lie, "Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil – effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities," *Aquaculture Nutrition*, vol. 10, no. 3, pp. 175–192, 2004.
- [38] I. U. Udo and O. E. Afia, "Optimization of dietary vitamin E (tocopherols) in fish: a review," *Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment*, vol. 9, no. 4, pp. 99–107, 2013.
- [39] C. Afonso, N. M. Bandarra, L. Nunes, and C. Cardoso, "Tocopherols in seafood and aquaculture products," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, no. 1, pp. 128–140, 2016.
- [40] M. Pazos, L. Sánchez, and I. Medina, " α -Tocopherol oxidation in fish muscle during chilling and frozen storage," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 4000–4005, 2005.
- [41] M. Yildiz, E. Şener, and H. Gün, "Effect of refrigerated storage on fillet lipid quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) fed a diet containing different levels of DL α -tocopherol acetate," *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, vol. 30, no. 1, pp. 143–150, 2006.
- [42] M. Pirini, P. P. Gatta, S. Testi, G. Trigari, and P. G. Monetti, "Effect of refrigerated storage on muscle lipid quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed on diets containing different levels of vitamin E," *Food Chemistry*, vol. 68, no. 3, pp. 289–293, 2000.
- [43] G. Mourente, J. G. Bell, and D. R. Tocher, "Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish?," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 33, no. 3, pp. 269–280, 2007.
- [44] C. Regost, J. V. Jakobsen, and A. M. B. Rørå, "Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage," *Food Research International*, vol. 37, no. 3, pp. 259–271, 2004.
- [45] W. K. Ng, Y. Wang, and K. H. Yuen, "Palm vitamin E for aquaculture feeds," *Journal of Oil Palm Research*, vol. 8, pp. 1–7, 2008.
- [46] C. Trullàs, A. Tres, J. Saldo, R. Fontanillas, and R. Sala, "Quality characteristics of fillets of rainbow trout fed acid or re-esterified rapeseed oils as dietary fat sources," *Aquaculture*, vol. 480, pp. 22–31, 2017.
- [47] M. B. Betancor, E. Atalah, M. J. Caballero et al., " α -Tocopherol in weaning diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) improves survival and reduces tissue damage caused by excess dietary DHA contents," *Aquaculture Nutrition*, vol. 17, no. 2, pp. e112–e122, 2011.
- [48] V. R. Kyrana and V. P. Lougovois, "Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice," *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 37, no. 3, pp. 319–328, 2002.
- [49] R. Ma, X. Liu, H. Tian et al., "Odor-active volatile compounds profile of triploid rainbow trout with different marketable sizes," *Aquaculture Reports*, vol. 17, pp. 100–312, 2020.
- [50] D. Jimenez-Alvarez, F. Giuffrida, P. A. Golay et al., "Profiles of volatile compounds in milk containing fish oil analyzed by HS-SPME-GC/MS," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 110, no. 3, pp. 277–283, 2008.
- [51] F. Shahidi, "Headspace volatile aldehydes as indicators of lipid oxidation in foods," in *Headspace Analysis of Foods and Flavors*, R. L. Rouseff and K. R. Cadwallader, Eds., vol. 488 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 113–123, Springer, Boston, MA, 2001.
- [52] M. A. Augustin, L. Sanguansri, and O. Bode, "Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders," *Journal of Food Science*, vol. 71, no. 2, pp. E25–E32, 2006.
- [53] C. F. Ross and D. M. Smith, "Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 5, no. 1, pp. 18–25, 2006.
- [54] R. J. Hsieh and J. E. Kinsella, "Lipoxygenase generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 37, no. 2, pp. 279–286, 1989.
- [55] J. D. Wood and M. Enser, "Manipulating the fatty acid composition of meat to improve nutritional value and meat quality," in *New Aspects of Meat Quality. From Genes to Ethics*, P. P. Purslow, Ed., Elsevier Science, Sawston, UK, 2017.
- [56] C. Prost, A. Hallier, M. Cardinal, T. Serot, and P. Courcoux, "Effect of storage time on raw sardine (*Sardina pilchardus*) flavor and aroma quality," *Journal of Food Science*, vol. 69, no. 5, pp. S198–S204, 2004.
- [57] R. L. Wierda, G. Fletcher, L. Xu, and J. P. Dufour, "Analysis of volatile compounds as spoilage indicators in fresh king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during storage using SPME-GC-MS," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 22, pp. 8480–8490, 2006.

- [58] F. S. H. Lu, I. Bruheim, B. O. Haugsgjerd, and C. Jacobsen, "Effect of temperature towards lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions in krill oil upon storage," *Food Chemistry*, vol. 157, pp. 398–407, 2014.
- [59] H. Lee, S. A. Kizito, S. J. Weese et al., "Analysis of headspace volatile and oxidized volatile compounds in DHA-enriched fish oil on accelerated oxidative storage," *Journal of Food Science*, vol. 68, no. 7, pp. 2169–2177, 2003.
- [60] J. S. Del Pulgar, M. Roldan, and J. Ruiz-Carrascal, "Volatile compounds profile of sous-vide cooked pork cheeks as affected by cooking conditions (vacuum packaging, temperature and time)," *Molecules*, vol. 18, no. 10, pp. 12538–12547, 2013.
- [61] S. Ji, S. Gu, X. Wang, and N. Wu, "Comparison of olfactometrically detected compounds and aroma properties of four different edible parts of Chinese mitten crab," *Fisheries Science*, vol. 81, no. 6, pp. 1157–1167, 2015.
- [62] S. Takeungwongtrakul, S. Karnjanapratum, P. Kaewthong, and S. Nalinanon, "Change in fatty acid profile, volatile compounds and FTIR spectra of samrong seed oil during storage," *International Journal of Agricultural Technology*, vol. 16, no. 2, pp. 475–484, 2020.
- [63] F. F. Parlapani, A. Mallouchos, S. A. Haroutounian, and I. S. Boziaris, "Volatile organic compounds of microbial and non-microbial origin produced on model fish substrate un-inoculated and inoculated with gilt-head sea bream spoilage bacteria," *LWT*, vol. 78, pp. 54–62, 2017.
- [64] H. Rehbein and J. Oehlenschläger, *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity*, Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2009.
- [65] J. H. Sohn, Y. Taki, H. Ushio, T. Kohata, I. Shioya, and T. Ohshima, "Lipid oxidations in ordinary and dark muscles of fish: influences on rancid off-odor development and color darkening of yellowtail flesh during ice storage," *Journal of Food Science*, vol. 70, no. 7, pp. s490–s496, 2005.
- [66] S. Cakli, B. Kilinc, A. Cadun, T. Dincer, and S. Tolasa, "Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice," *Food Control*, vol. 18, no. 5, pp. 391–397, 2007.
- [67] M. Kostaki, V. Gitrakou, I. N. Savvaidis, and M. G. Kontominas, "Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) filets," *Food Microbiology*, vol. 26, no. 5, pp. 475–482, 2009.
- [68] P. Masniyom, S. Benjakul, and W. Visessanguan, "Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 82, no. 8, pp. 873–880, 2002.
- [69] D. Montero, L. Robaina, M. J. Caballero, R. Ginés, and M. S. Izquierdo, "Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: a time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet," *Aquaculture*, vol. 248, no. 1–4, pp. 121–134, 2005.

5.2 Scientific publication II



*Effect of feeding olive pomace acid oil on pork lipid composition,
oxidative stability, color and sensory acceptance*



Paula Albendea, Alba Tres, Magdalena Rafecas, Stefania Vichi, David
Solà-Oriol, Marçal Verdú & Francesc Guardiola

Animal, 2023, 100879

<https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100879>

Supplementary material available in Anexo II.



-Efecto de la alimentación con aceite ácido de orujo de oliva sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de carne de cerdo-

-RESUMEN-

La finalidad de este estudio era evaluar los efectos del uso del aceite ácido de orujo de oliva (OPAO, *Olive pomace acid oil*) en lugar del aceite crudo de orujo de oliva (OPO, *Crude olive pomace oil*) o la manteca de palma (PO, *Crude palm oil*) en piensos de cerdo sobre la composición lipídica, la oxidación lipídica y la calidad de lomo de cerdo (*longissimus dorsi*), fresco y tras un periodo de 8 días de refrigeración en condiciones comerciales.

De acuerdo con el diseño experimental (apartado 4.2), los cerdos fueron alimentados con cuatro tipos de piensos, suplementados con un 5% de diferentes fuentes lipídicas: PO, OPO, OPAO o una mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p) (B, *Blend of crude palm oil and olive pomace acid oil at 50/50 (w/w)*).

Las determinaciones analíticas realizadas en lomo de cerdo fresco y refrigerado comprendían: perfil de FA; composición de T y T3; método del naranja de xilenol (FOX, *Ferrous oxidation-Xylenol orange method*) para estudiar tanto la oxidación primaria como la estabilidad oxidativa; valores de TBA; contenido en compuestos volátiles; color y aceptación sensorial (apartado 4.6).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, tras la refrigeración se observó una reducción de los niveles totales de T + T3 y un aumento de los valores de TBA y de las concentraciones de compuestos volátiles en la carne de cerdo. La refrigeración también afectó a los parámetros instrumentales del color (L^* , a^* y b^*) pero no a la aceptación general de la carne de cerdo. Con respecto a las fuentes lipídicas empleadas, la carne procedente de piensos con el OPAO mostró una mayor relación entre FA insaturados y saturados que la carne procedente de las dietas PO y B. El uso del OPAO en piensos dio lugar a la menor concentración de T + T3 en carne, encontrando en carne fresca niveles similares a los obtenidos con el empleo del OPO, pero significativamente menores tras la refrigeración. En cuanto a la estabilidad oxidativa, la adición del OPAO a los piensos dio lugar a una carne fresca con una menor estabilidad oxidativa que la obtenida con los piensos con PO, pero tras la refrigeración no se observó ningún efecto

significativo de la fuente lipídica usada. Los valores de TBA y las concentraciones de compuestos volátiles en carne de cerdo fresca no se vieron afectadas por la fuente energética adicionada. Después de la refrigeración, la carne procedente del OPAO mostró el mayor valor TBA y las mayores concentraciones de compuestos volátiles. En términos de oxidación lipídica, aunque el uso del OPAO al 5% en piensos produjo un impacto significativo en carne de cerdo, su empleo al 2,5% junto con un 2,5% de PO en el tratamiento dietético B no conllevó ninguna modificación con respecto a la utilización de OPO o PO. Además, el tipo de fuente lipídica empleada no afectó ni la posible percepción del color ni la aceptación sensorial por parte del consumidor.

En conclusión, considerando los resultados en la estabilidad oxidativa y oxidación lipídica de la carne de cerdo obtenidos en este estudio, para aprovechar los aceites ácidos en las dietas de cerdo sería preferible adicionar el OPAO utilizado en este estudio combinado con PO (es decir, el tratamiento dietético B).

Effect of feeding olive pomace acid oil on pork lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance

P. Albendea^{a,b}, A. Tres^{a,b}, M. Rafecas^{b,c}, S. Vichi^{a,b}, D. Solà-Oriol^d, M. Verdú^e, F. Guardiola^{a,b}

^a Nutrition, Food Science and Gastronomy Department-XIA, Campus de l'Alimentació Torribera, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona. Av Prat de la Riba, 171, 08921, Santa Coloma de Gramenet, Spain

^b Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona. Av Prat de la Riba, 171. 08921, Santa Coloma de Gramenet, Spain

^c Nutrition, Food Science and Gastronomy Department-XIA, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona. Av Joan XXIII, 27-31, 08028, Barcelona, Spain

^d Animal Nutrition and Welfare Service (SNIWA), Animal and Food Science Department, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Travessera dels Turons, 08193, Bellaterra, Spain

^e Department of Animal Nutrition and Feed Industry, bonÀrea Agrupa, 25210 Guissona, Spain

Corresponding author: Alba Tres. E-mail: atres@ub.edu

Abstract

One of the targets of the meat industry is to reduce production costs and to increase the sustainability of the food chain, which has driven the attention towards the use of by-products as feed ingredients. Acid oils are fat by-products coming from the chemical refining process of edible oils, with a high energy value and that are approved as feed ingredients in the European Union. However, meat producers are hesitant to utilize them due to their varying composition and the limited understanding of their impact on animal performance and meat quality. The objective of this study was to evaluate the effects of using olive pomace acid oil (**OPAO**) instead of its corresponding crude olive pomace oil (**OPO**) or crude palm oil (**PO**) in pig diets on lipid composition, lipid oxidation and quality of pork loin (*longissimus dorsi*), fresh and after commercial refrigerated storage for 8 days. The experimental design consisted on feeding pigs with four diets supplemented with a 5% of PO, OPO, OPAO or a blend (**B**) of PO and OPAO (50:50, w/w). Fresh and refrigerated pork loin samples were assessed for fatty acid profile; tocopherol (**T**) and tocotrienol (**T3**) composition; lipid oxidative stability with the ferrous oxidation-xylenol orange method; 2-thiobarbituric acid (**TBA**) value; volatile compounds; color; and sensory acceptance. Results showed that refrigeration reduced the total T + T3 levels and increased the TBA values and the volatile compound concentrations. The refrigerated storage also affected the instrumental color parameters (L^* , a^* and b^*) but not the overall acceptance of pork. Regarding the diet, pork from OPAO diet showed a higher unsaturated-to-saturated fatty acid ratio than pork from PO and B diets. The lowest T+T3 concentration was found in OPO and OPAO fresh pork and in OPAO refrigerated pork. The oxidative stability of fresh pork was lower for OPAO than for PO diet, but no significant effect of the diet was observed for this parameter in refrigerated pork. The TBA values and volatile compound concentrations of fresh pork were not affected by the diet. After refrigeration, OPAO pork had the highest TBA value and volatile compound concentrations. In any case, color and consumer acceptance of pork were not affected by diet. In conclusion, in order to upcycle acid oils in pig diets, and considering results on the lipid oxidative stability of pork, it would be preferable to add the OPAO used in this study blended with PO.

Keywords: refining by-products, upcycling, pig feed, pork loin, meat quality.

Highlights

- Olive pomace acid oil at 5% in diet had a negative impact on pork lipid oxidation.
- Olive pomace acid oil at 2.5% plus palm oil at 2.5% did not affect lipid oxidation.
- Crude and acid olive pomace oils did not affect pork sensory acceptance and color.
- Crude and acid olive pomace oils led to the lowest fresh pork tocopherol levels.
- During refrigeration pork tocopherols decreased and lipid oxidation increased.

Implications

The use of acids oils (fat by-products from edible oil production) as ingredients in pig diets may have a positive impact on the economy of pork production due to their high availability and low price. This study showed that when olive pomace acid oil was added at 5%, pork lipid oxidation increased; although when used at a 2.5% together with a 2.5% of crude palm oil, pork lipid oxidation was not affected. In no case did the use of acid oils affect the color or the overall acceptance of fresh and commercially refrigerated pork.

Introduction

One of the main targets of meat industry is to reduce the economic costs associated to meat production, which is mostly due to feed formulation. This can be achieved through the replacement of some feed ingredients, which are raw materials, by some by-products of food industry. Therefore, the use of food by-products in feeds can contribute to increase the sustainability of the food chain.

The inclusion of fats in animal diets is a common practice in animal production, as they can improve animal growth due to their high energy value. Fats also provide essential fatty acids (**FA**) and lipid-soluble vitamins, such as tocopherols (**T**) and tocotrienols (**T3**). In the last decades, the type of fat added to animal diets has changed to meet consumer demand for leaner and healthier meat (Cardenia et al., 2011). Thus, the use of animal fat sources (rich in saturated FA) in animal nutrition has decreased in favor of crude vegetable oils (generally with a more unsaturated FA profile) (Alonso et al., 2012). Although a more unsaturated meat may be desirable for its high nutritional value, it may be more prone to lipid oxidation, which is the major cause of non-microbial degradation in meat and meat products (Amaral et al., 2018). Lipid oxidation can have a negative impact on meat nutritional value and on color, texture and flavor, leading to a loss of sensory acceptability. An option to balance a high concentration of unsaturated FA in meat with its oxidative stability might be the use of dietary fat sources rich in monounsaturated FA, such as oils coming from olives.

Despite crude vegetable oils are widely used in animal feeding, some fat by-products are an interesting cheaper alternative, since they are potential sources of energy (Varona et al., 2021a). One of the main by-products of olive oil industry is olive pomace, which is a mixture of olive pulp and stone, still rich in oil and with a high concentration of phenolic compounds (Difonzo et al., 2021). After removing the water of olive pomace, crude olive pomace oil is extracted and subjected to a chemical refining process to avoid undesirable colors, flavors, and compounds that would affect the stability of the final edible oil. This refining process consists of several steps, one of them being a chemical neutralization meant to remove free FA from the oil and that produces soap stocks as by-products. The subsequent acidification of these soap stocks generates acid oils, which have a similar FA profile to the crude oil but are richer in free FA (Varona et al., 2021a, 2021b).

Upcycling acid oils as feed fats, as an alternative to crude fats and oils, is a way to increase their value and would contribute to improving the sustainability of the food chain. From an economical point of view, the price of this refining by-product is lower than that of the corresponding crude oil. Therefore, replacing crude oils by acid oils in feeds would reduce the costs associated with animal nutrition, which is the most expensive area within meat production. However, the composition of acid oils is highly variable (Varona et al., 2021a, 2021b), which could compromise animal performance and affect the composition and quality of meat products, decreasing the confidence in them as feeding fats. Despite the potentially significant impact of the use of acid

oils as animal feed fats, there is a paucity of information in the literature on this topic, with most studies primarily focused on animal performance. Furthermore, the effect of acid oils on the composition and quality of animal products has been studied even less extensively.

The aim of this trial was to evaluate the effect of using olive pomace acid oil (**OPAO**) as fat source in pig diets, instead of its corresponding crude oil (crude olive pomace oil, **OPO**) or crude palm oil (**PO**), on lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance of fresh and refrigerated pork loin. This study complements the information obtained by Verge-Mèrida et al. (2021) about the impact of using OPAO as fat source in pig diets on animal's digestibility and performance.

Material and methods

Experimental fats

The experimental fat sources used in this study were: PO, supplied by bonÀrea Agrupa (Guissona, Spain); OPO and OPAO, both provided by RIOSA (Refinación Industrial Oleícola S.A., Ibros, Spain). Samples of these fats were collected and were kept in vials at -20 °C under N₂ until the **MIU** value (moisture and volatile matter, insoluble impurities in petroleum ether and unsaponifiable matter), T and T3, FA composition and lipid classes were analyzed as detailed by Varona et al. (2021c). The composition of the experimental fat sources is shown in Table 1 and their complete FA profile including minor FA can be found in Supplementary Table S1.

Table 1 Composition of the three fat sources used to formulate the different experimental diets for pigs.

	Fat source ¹		
	PO	OPO	OPAO
MIU (g/100 g of fat)²			
Moisture ³	0.14 ± 0.02	0.28 ± 0.01	1.27 ± 0.03
Insoluble impurities	0.13 ± 0.05	0.79 ± 0.31	7.84 ± 0.42
Unsaponifiable matter	0.22 ± 0.04	3.58 ± 0.02	3.56 ± 0.46
Total	0.50 ± 0.06	4.65 ± 0.31	12.68 ± 0.62
FA (%)^{2,4}			
C16:0	42.4 ± 0.02	12.8 ± 0.15	13.5 ± 0.04
C18:0	4.6 ± 0.02	2.6 ± 0.04	3.6 ± 0.01
Saturated FA ⁵	48.2 ± 0.02	16.1 ± 0.19	18.6 ± 0.04
C18:1 n-9	40.8 ± 0.06	67.0 ± 0.11	62.2 ± 0.23
C18:1 n-7	0.8 ± 0.14	2.8 ± 0.07	2.1 ± 0.01
Monounsaturated FA ⁶	41.8 ± 0.09	71.1 ± 0.18	65.4 ± 0.20
C18:2 n-6	9.7 ± 0.06	12.0 ± 0.01	15.0 ± 0.05
C18:3 n-3	0.3 ± 0.01	0.9 ± 0.01	1.0 ± 0.01
Polyunsaturated FA ⁷	10.0 ± 0.06	12.8 ± 0.01	15.8 ± 0.04
T and T3 (mg/kg of fat)			
α-T	203.90 ± 9.97	454.03 ± 19.99	383.59 ± 16.35
γ-T	2.15 ± 0.20	10.05 ± 1.29	21.39 ± 0.27
α-T3	219.60 ± 9.34	4.69 ± 0.28	6.02 ± 0.61
γ-T3	275.43 ± 13.14	ND	5.31 ± 0.67
T + T3 ⁸	740.06 ± 19.09	500.42 ± 20.28	430.38 ± 16.38
Lipid classes (%)^{2,9}			
Triacylglycerols	86.7 ± 0.41	82.4 ± 0.05	24.0 ± 0.35
Diacylglycerols	8.4 ± 0.22	8.3 ± 0.02	19.8 ± 0.23
Monoacylglycerols	0.6 ± 0.18	0.6 ± 0.01	2.3 ± 0.03
Free FA	4.3 ± 0.45	8.8 ± 0.08	54.0 ± 0.55
Acid value (mg KOH/g of fat)	10.5 ± 0.06	16.1 ± 0.13	109.5 ± 2.87
Peroxide value (meq O₂/kg of fat)	5.0 ± 0.30	6.35 ± 0.06	2.16 ± 0.16

Abbreviations: PO = crude palm oil; OPO = crude olive pomace oil; OPAO = olive pomace acid oil; MIU = moisture and volatile matter + insoluble impurities + unsaponifiable matter; FA = fatty acids; T = tocopherol; T3 = tocotrienol; ND = not detected. ¹ Mean ± SD (n = 3 determinations). ² This information has been previously published by Verge-Mèrida et al. (2021). ³ It includes moisture and other compounds that volatilize under the conditions of the determination. ⁴ The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. See Supplementary Table S1 for the complete FA composition including minor FA results. ⁵ Sum of C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 and C24:0. ⁶ Sum of C16:1 n-7; C18:1 n-9; C18:1 n-7 and C20:1 n-9. ⁷ Sum of C18:2 n-6 and C18:3 n-3. ⁸ Sum of α-T, β-T, γ-T, α-T3, β-T3, γ-T3 and δ-T3. ⁹ The percentage of each lipid class was obtained by peak area normalization.

Animals and diets

The animal housing and husbandry was carried out at the animal facilities of bonÀrea Agrupa (Nial farm, Guissona, Spain). A total of 226 boars and gilts [(Landrace x Large White) x Duroc] of approximately 59 kg (103 days of life) were fed up to 103 kg of BW (from 0 to 40 days of the experimental trial) with a grower diet, and from 103 to 130 kg of BW (41 to 62 days of the experimental trial) with a finisher diet. The experimental diets resulted from supplementing the basal diets (grower or finisher) with a 5% of one of the three experimental fat sources (PO, OPO, OPAO) or a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w) (**B**). All diets were in pelleted form and formulated to cover at least the essential nutritional requirements (FEDNA, 2013). Ingredients, proximate composition and energy of the grower and finisher experimental diets have been previously reported by Verge-Mèrida et al. (2021) and can be found in Supplementary Table S2. The four experimental diets were randomly assigned among the pens, with a total of 12 pens (six for entire males and six for females) per diet. The FA composition, T and T3 content and lipid class composition of the experimental diets are shown in Table 2 (the complete FA profile with minor FA can be found in Supplementary Table S3; analytical methods are also described in Supplementary Material S1). The effects of these diets on animal performance parameters have been published by Verge-Mèrida et al. (2021).

Table 2 Fatty acid, tocopherol and tocotrienol and lipid class compositions of the grower and finisher experimental diets for pigs.

	Grower diets ¹				Finisher diets ¹			
	PO	OPO	OPAO	B	PO	OPO	OPAO	B
FA (%)²								
C16:0	32.9 ± 1.11	13.4 ± 0.03	13.3 ± 0.38	23.7 ± 0.27	31.6 ± 0.13	13.7 ± 0.08	13.5 ± 0.01	23.9 ± 0.27
C18:0	3.8 ± 0.21	2.6 ± 0.02	3.1 ± 0.19	3.5 ± 0.01	3.9 ± 0.17	2.6 ± 0.08	3.0 ± 0.04	3.5 ± 0.06
Saturated FA ³	37.6 ± 1.13	16.8 ± 0.04	17.2 ± 0.42	28.0 ± 0.27	36.4 ± 0.22	17.1 ± 0.11	17.1 ± 0.04	28.4 ± 0.27
C18:1 n-9	35.8 ± 0.46	49.8 ± 0.02	49.4 ± 0.13	41.9 ± 1.26	36.6 ± 0.20	49.8 ± 0.02	48.7 ± 0.03	41.3 ± 0.30
C18:1 n-7	0.9 ± 0.06	2.2 ± 0.26	1.6 ± 0.10	0.8 ± 1.07	0.8 ± 0.01	2.0 ± 0.02	1.7 ± 0.06	1.2 ± 0.11
Monounsaturated FA ⁴	37.0 ± 0.42	53.0 ± 0.21	51.8 ± 0.05	43.2 ± 0.19	37.7 ± 0.18	52.7 ± 0.02	51.3 ± 0.09	43.1 ± 0.19
C18:2 n-6	24.3 ± 0.52	28.8 ± 0.13	29.7 ± 0.90	27.4 ± 0.12	24.7 ± 0.28	28.6 ± 0.08	29.9 ± 0.04	27.1 ± 0.01
C18:3 n-3	0.9 ± 0.08	1.4 ± 0.01	0.9 ± 0.82	1.2 ± 0.01	1.0 ± 0.02	1.5 ± 0.02	1.5 ± 0.01	1.3 ± 0.01
Polysaturated FA ⁵	25.2 ± 0.52	30.2 ± 0.13	30.6 ± 1.22	28.6 ± 0.12	25.7 ± 0.28	30.0 ± 0.08	31.5 ± 0.04	28.4 ± 0.01
T and T3 (mg/kg)								
α-T	43.12 ± 0.90	26.13 ± 1.66	27.12 ± 2.44	30.39 ± 1.01	37.62 ± 0.68	29.91 ± 1.89	26.93 ± 0.52	28.75 ± 0.25
γ-T	15.4 ± 0.31	13.58 ± 0.22	13.96 ± 0.02	14.01 ± 0.47	14.69 ± 0.42	14.07 ± 0.71	14.18 ± 0.35	13.39 ± 0.26
α-T3	13.7 ± 0.30	3.77 ± 0.07	4.00 ± 0.07	7.38 ± 0.46	10.39 ± 0.47	4.02 ± 0.20	4.28 ± 0.09	6.58 ± 0.04
γ-T3	5.17 ± 0.11	2.82 ± 0.01	2.93 ± 0.11	8.03 ± 0.26	13.37 ± 0.26	2.85 ± 0.11	2.97 ± 0.09	7.79 ± 0.12
T + T3 ⁶	85.81 ± 1.74	53.13 ± 1.58	55.46 ± 2.61	67.95 ± 2.39	83.80 ± 1.86	57.60 ± 3.02	55.97 ± 1.09	64.75 ± 0.69
Lipid classes (%)⁷								
Triacylglycerols	83.7 ± 0.46	70.7 ± 0.27	49.3 ± 0.02	68.2 ± 0.42	81.2 ± 0.12	67.1 ± 0.04	44.8 ± 0.04	64.4 ± 0.31
Diacylglycerols	8.9 ± 0.17	11.1 ± 0.06	14.9 ± 0.02	11.8 ± 0.08	9.6 ± 0.04	11.9 ± 0.10	15.1 ± 0.04	12.4 ± 0.04
Monoacylglycerols	0.9 ± 0.01	1.3 ± 0.02	1.7 ± 0.03	1.3 ± 0.01	1.1 ± 0.09	1.4 ± 0.06	1.6 ± 0.03	1.5 ± 0.15
Free FA	6.5 ± 0.29	16.9 ± 0.20	34.2 ± 0.01	18.8 ± 0.33	8.2 ± 0.01	19.6 ± 0.08	38.6 ± 0.10	21.7 ± 0.20

Abbreviations: PO = crude palm oil diet; OPO = crude olive pomace oil diet; OPAO = olive pomace acid oil diet; B = diet with a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w); FA = fatty acids; T = tocopherol; T3 = tocotrienol. ¹ Mean ± standard deviation (n = 2 determinations). ² This information has been previously published by Verge-Merida et al. (2021). ³ The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. See Supplementary Table S3 for the complete FA composition including minor FA results. ⁴ Sum of C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0 and C22:0. ⁵ Sum of C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7 and C20:1 n-9. ⁶ Sum of C18:2 n-6 and C18:3 n-3. ⁷ Sum of α-T, β-T, γ-T, δ-T, α-T3, β-T3, γ-T3 and δ-T3. ⁸ The percentage of each lipid class was obtained by peak area normalization.

Sampling of pork loin

In March 2019, after 62 days of feeding, the animals were stunned with 85% CO₂ for 120 s and immediately exsanguinated at the commercial slaughterhouse of bonÀrea Agrupa (La Closa, Guissona, Spain). From each dietary treatment, a total of 16 pigs (8 entire males and 8 females), closest to the average BW within each treatment (including at least one pig from each pen), were sampled. Then, as Fig. 1 shows, 8 replicates per diet were formed, consisting of 4 pairs of entire males and 4 pairs of females. From each animal, two portions of loin (one from left and one from right *longissimus dorsi* between L2 and L5) were taken (Fig. 1) and, therefore, each replicate was made up of a total of four portions of pork loin from two different pigs. Each portion was placed in a different EPS tray and stored under commercial conditions (at 3 – 4 °C, packed in modified atmosphere O₂/CO₂; 70/30, sealed with a PA/EVOH/PE film). From each replicate, two trays (i.e. one loin from each pig) were stored refrigerated until the following morning (fresh pork samples) and the other two trays (i.e. also one loin from each pig) for 8 days (refrigerated pork samples) (4 diets x 8 replicates x 2 refrigeration storage times = 64 samples).

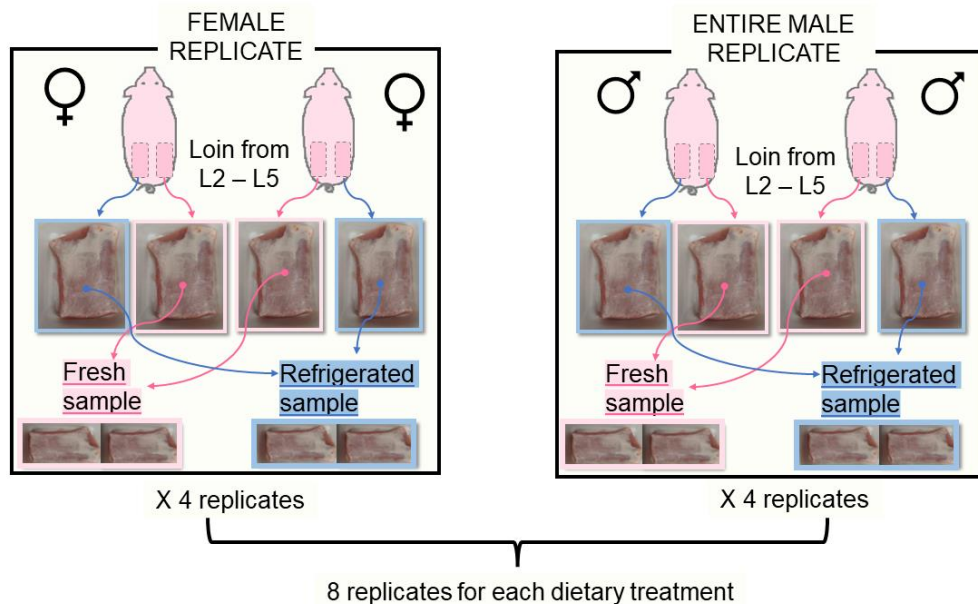


Fig. 1 Pork loin sampling performed to create the different eight replicates (four from female and four from entire male pigs) of fresh and refrigerated samples for each dietary treatment.

For the fresh pork study, in less than 24 h after the slaughter, a portion of the two fresh loins of the replicate was ground and, after color determination, ground pork was vacuum packed in different high-barrier multilayer bags (Cryovac BB3255; permeability to O₂, 17 cm³/m² per day per bar at 23 °C and 0% relative humidity, ASTM D-3985; Cryovac Europe, Sealed Air S. L., Sant Boi de Llobregat, Spain) and kept at -20 °C until analysis. Some portions of female fresh pork loin from each diet were reserved to perform the sensory acceptance test. For the refrigerated storage study, the sampling process and color determination were identically performed after 8 days of refrigeration under commercial conditions.

Determination fatty acid composition

The determination of the FA composition was performed only in fresh pork samples according to Albendea et al. (2023). Briefly, after a lipid extraction of 3.5 g of sample with chloroform/methanol (2:1, v/v), a two-step methylation was performed to obtain the FA methyl esters, which were determined by GLC with flame ionization detector. The percentage of each FA was obtained by peak area normalization.

Regarding the repeatability of the FA determination, the RSD was below 3%, with the RSD being lower than 1% for FA at a concentration equal to or greater than 4% and between 1-3% for FA at a concentration between 0.1-3%.

Determination of tocopherol and tocotrienol concentrations

The concentrations of T and T3 for fresh and refrigerated pork were determined as detailed by Albendea et al. (2023). It consisted in a saponification with methanolic potassium hydroxide, an extraction of the unsaponifiable fraction with petroleum ether and the determination by HPLC with a fluorescence detector. The repeatability (i.e. RSD of 6% for α -T concentrations of 1.00 – 2.00 mg/kg; RSD of 16% for around 0.02 mg/kg of β -T; RSD of 12% for γ -T concentrations of 0.07 – 0.12 mg/kg) and recovery (89%; 91% and 90%, respectively) results were in agreement with the requirements established by AOAC International (2019).

Lipid oxidation determinations

The primary oxidation and oxidative stability of fresh and refrigerated pork were determined by the ferrous oxidation–xylenol orange assay, expressing the results as mmol of cumene hydroperoxide equivalents/kg of sample (Albendea et al., 2023). In summary, lipid hydroperoxides (**LHP**) were extracted from 2 g of sample with 15 mL of cold methanol. To perform the colorimetric reaction, for fresh pork analysis a 940 μ L of methanol and 160 μ L of sample extract were used, whereas for refrigerated pork the volumes were 950 μ L of methanol and 150 μ L of sample extract. Absorbance at 560 nm after 30 min of incubation revealed the amount of LHP present in the pork sample (named LHP content). Measurements after 74 h of incubation (when the absorbance was stable) evaluated the amount of LHP formed during this reaction time, which is considered a measure of sample's oxidative stability (named final LHP value). The quantification limit of the ferrous oxidation–xylenol orange assay was 0.04 mmol of cumene hydroperoxide equivalents/kg of sample. The repeatability (i.e. RSD of 10% for concentrations of 0.5 mmol of cumene hydroperoxide equivalents/kg of pork loin) fulfilled the requirements established by AOAC International (2019).

The determination of 2-thiobarbituric acid (**TBA**) value was carried out to assess the secondary oxidation of fresh and refrigerated pork, expressing the results as μ g of malondialdehyde/kg of sample (Albendea et al., 2023). The repeatability of this method (i.e. RSD of 18% for a TBA value of 36 μ g of malondialdehyde/kg; RSD of 7% for 74 μ g of malondialdehyde/kg; or RSD of 5% for 569 μ g of malondialdehyde/kg) was in agreement with the requirements established by AOAC International (2019).

The volatile compound content was evaluated in fresh and refrigerated pork by headspace solid–phase microextraction coupled with GLC and mass spectrometry as detailed by Albendea et al. (2023), but using 2 mL of a 20% NaCl water solution instead of 2 mL of double deionized water. Results were expressed as μ g of 4-metil-2-pentanol equivalents/kg of sample. The repeatability for the identified volatile compounds (i.e. RSD between 9% and 19% for volatile compounds at concentrations in the range of < 1.0 μ g/kg and 3.7 μ g/kg; between 4% and 12% for concentrations in the range of 9.5 μ g/kg and 78.0 μ g/kg; or RSD of 3% for 911.4 μ g/kg) met the requirements established by AOAC International (2019).

Color determination

Immediately after grinding the pork samples, color was measured on the CIE L*a*b* color space (with D-65 illuminant at a 2° observer angle) (Albendea et al., 2023). The repeatability test of the color determination in pork loin samples showed RSD percentages of 0.3% for L*, 1.3% for a* and 0.8% for b*.

The dimensionless parameter ΔE (Eq. 1) was calculated to evaluate if the differences between the color of fresh and refrigerated pork coming from each diet would be appreciable by human eye.

$$\text{Eq. 1} \quad \Delta E = \sqrt{(L_{0d}^* - L_{8d}^*)^2 + (a_{0d}^* - a_{8d}^*)^2 + (b_{0d}^* - b_{8d}^*)^2}$$

Where L_{0d}^* , a_{0d}^* and b_{0d}^* are the means of color parameters for fresh pork from one of the diets ($n = 8$) and L_{8d}^* , a_{8d}^* and b_{8d}^* are the means of refrigerated pork from the same diet ($n = 8$).

Sensory acceptance test

To evaluate the overall acceptance of fresh and refrigerated pork coming from the different diets, two hedonic tests with a nine-point scale were carried out, one with fresh pork samples and the other one after 8 days of refrigerated storage. The two tests were conducted using pork loin coming from female pigs. It has been extensively reported in the literature that pork from some entire males can show unpleasant off-odor and off-flavor, commonly known as boar taint (Lundstöröm et al., 2009), which could make the meat unacceptable for consumers. As the main purpose of these sensory acceptance tests was to evaluate the effect of the diet on the overall acceptance of pork loin, the test was focused on female loins to avoid the risk that boar taint from entire male loins masked the diet effect. In all cases, pork steaks of female's pork loin (approximately, 1.5 cm thickness) were grilled during 3 min, keeping the steaks coming from different diets separated during the whole process. A total of 36 regular pork consumers [male (41.7%) and female (58.3%) from different ages (20 – 60)] participated in each test. In each test, each participant evaluated four steaks (one per dietary treatment), and for each of them, indicated the degree of acceptability (answering the question “How much do you like or dislike the sample overall?”) on a 9-point scale (1, “dislike extremely”; 5, “neither like nor dislike”; 9, “like extremely”).

Statistical analysis

Multifactor ANOVA (SPSS GLM procedure) was performed to evaluate the impact of the refrigeration time (0 and 8 days) and the interaction of this factor with the experimental diets on the different parameters studied in fresh and refrigerated pork loin ($n = 64$, two refrigeration times x four diets x eight replicates). One-way ANOVA was carried out to study the influence of the experimental diets (PO; OPO; OPAO and B) on FA profile (only for fresh pork), T and T3 composition, oxidation stability, TBA values, color, and sensory acceptance of fresh ($n=32$, four diets x eight replicates) or refrigerated pork ($n=32$, four diets x eight replicates). Significant differences among diets in fresh or refrigerated pork were tested for multiple comparisons with Scheffé's post hoc test. Additionally, the sex effect was evaluated on the different parameters studied in fresh pork loin using multifactor ANOVA tests ($n = 32$, two sexes x four diets x four replicates). In all cases, differences were considered significant when $P < 0.05$. Statistic tests were carried out using the general linear model procedure of SPSS (version 27.0, IBM Statistics Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Fatty acid profile of pork

The FA profile of fresh pork is shown in Table 3 (the complete FA composition including minor FA can be found in Supplementary Table S4). In all cases, pork was rich in monounsaturated FA, with oleic acid being the main FA. Polyunsaturated FA were the FA type found in the lowest proportion in pork, with linoleic acid being the main polyunsaturated FA.

There was a significant effect of the diet on the FA composition of pork, as OPAO pork showed a palmitic acid percentage lower than PO and B pork ($P < 0.001$), a stearic acid percentage lower than B pork ($P = 0.038$) and, consequently, a total saturated FA percentage lower than pork from PO and B diets ($P = 0.002$). Moreover, the unsaturated-to-saturated FA ratio of pork was significantly higher for OPAO pork than for pork from PO and B diets ($P = 0.003$). Overall, the FA profile of pork from OPAO and OPO diets was similar.

The effect of the sex was noticeable in C18:1 n-9, C18:2 n-6 and C20:2 n-6, in total monounsaturated FA, n-6 polyunsaturated FA and total polyunsaturated FA ($P < 0.001$). Pork loin from female pigs showed a lower oleic acid and monounsaturated FA proportions than pork loin from entire male pigs, which was compensated with higher linoleic acid and C20:2 n-6, n-6 polyunsaturated FA and total polyunsaturated FA percentages in the former (Table 3).

Table 3 Fatty acid profile of fresh pork loin.

FA (%)	Diet ¹						Sex ²			SEM	P _{sex} ⁴	P _{sex x diet} ⁴
	PO	OPO	OPAO	B	SEM	P _{diet} ³	Female	Entire male				
C14:0	1.1	1.2	1.2	1.1	0.047	0.399	1.2	1.2	0.032	0.740	0.181	
C16:0	23.7 ^a	22.7 ^{bc}	22.2 ^c	23.3 ^{ab}	0.220	< 0.001	22.8	23.1	0.151	0.105	0.438	
C18:0	11.1 ^{ab}	10.9 ^{ab}	10.4 ^b	11.4 ^a	0.249	0.038	10.8	11.1	0.165	0.343	0.104	
Saturated FA ⁵	35.9 ^a	34.8 ^{ab}	33.8 ^b	35.8 ^a	0.409	0.002	34.8	35.4	0.269	0.146	0.131	
C16:1 n-7	2.4	2.4	2.4	2.3	0.099	0.772	2.3	2.4	0.070	0.137	0.641	
C18:1 n-9	40.3	42.0	41.7	41.5	0.457	0.065	40.6	42.1	0.260	< 0.001	0.799	
C18:1 n-7	3.1	3.1	3.1	2.8	0.093	0.058	3.0	3.1	0.086	0.052	0.052	
Monounsaturated FA ⁶	46.4	48.1	47.8	47.2	0.523	0.140	46.5	48.3	0.297	< 0.001	0.994	
C18:2 n-6	14.6	14.1	15.1	14.2	0.591	0.663	15.6	13.4	0.304	< 0.001	0.429	
C20:4 n-6	1.8	1.6	1.7	1.4	0.113	0.058	1.6	1.6	0.079	0.447	0.276	
n-6 Polyunsaturated FA ⁷	17.1	16.4	17.5	16.3	0.681	0.531	18.0	15.6	0.367	< 0.001	0.361	
n-3 Polyunsaturated FA ⁷	0.5	0.5	0.6	0.5	0.047	0.122	0.6	0.5	0.034	0.200	0.361	
Polyunsaturated FA ⁷	17.5	16.9	18.2	16.8	0.690	0.484	18.6	16.1	0.371	< 0.001	0.411	
Unsaturated-to-saturated	1.8 ^b	1.9 ^{ab}	2.0 ^a	1.8 ^b	0.034	0.003	1.9	1.8	0.022	0.124	0.132	

Abbreviations: PO = crude palm oil diet; OPO = crude olive pomace oil diet; OPAO = olive pomace acid oil diet; B = diet with a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w); FA = fatty acids; SEM = standard error of the mean. ¹ Mean of the different experimental replicates from each diet (n = 8). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. See Supplementary Table S4 for the complete FA composition including minor FA results. ² Mean of the different experimental replicates from each sex (n = 16). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. See Supplementary Table S4 for the complete FA composition including minor FA results. ³ P values obtained by ANOVA (n = 32). Values in bold were significant (P < 0.05).

Tocopherol and tocotrienol composition of pork

The T and T3 composition of fresh and refrigerated pork are presented in Table 4. The main compound in pork loin coming from all diets was α -T, γ -T was quantified in all samples, and α -T3 levels were only quantifiable in fresh and refrigerated pork loin from PO and B diets.

The refrigerated storage of pork loin significantly decreased the α -T ($P < 0.001$) and the T + T3 concentrations ($P = 0.001$) (Table 4). The sex did not affect the T and T3 composition of fresh pork (Supplementary Table S4). The diet significantly affected the α -T and the T + T3 levels of fresh and refrigerated pork ($P < 0.001$, in all cases) (Table 4). In fresh samples, PO pork showed the highest α -T and T + T3 levels, and OPO and OPAO pork the lowest ones. After the refrigerated storage, PO pork remained the meat with the highest α -T and T + T3 amounts, whereas OPAO pork presented the lowest levels. Consequently, OPO and OPAO diets led to similar tocol concentrations in fresh pork, but after the refrigerated storage OPAO pork showed lower levels. However, no significant effect of the interaction between the two factors (refrigeration x diet) was revealed by multifactor ANOVA (Table 4).

Table 4 Tocopherol and tocotrienol concentrations of fresh and refrigerated pork loin.

T and T3 (mg/kg)	Pork	Diet ¹						Multifactor ANOVA			
		PO	OPO	OPAO	B	SEM ³	<i>P</i> _{diet} ²	Refrigeration ³	SEM	<i>P</i> _{refrigeration} ⁴	<i>P</i> _{refrigeration x diet} ⁴
α-T	Fresh	2.32 ^a	1.27 ^c	1.15 ^c	1.73 ^b	0.088	< 0.001	1.62	0.046	< 0.001	0.123
	Refrigerated	2.20 ^a	1.12 ^b	0.63 ^c	1.42 ^b	0.097	< 0.001	1.34			
γ-T	Fresh	0.12	0.10	0.11	0.11	0.009	0.443	0.11			
	Refrigerated	0.11	0.10	0.08	0.11	0.009	0.166	0.10	0.004	0.317	0.464
T + T3 ⁵	Fresh	2.45 ^a	1.38 ^c	1.28 ^c	1.87 ^b	0.090	< 0.001	1.75			
	Refrigerated	2.46 ^a	1.24 ^b	0.77 ^c	1.62 ^b	0.098	< 0.001	1.52	0.047	0.001	0.053

Abbreviations: PO = crude palm oil diet; OPO = crude olive pomace oil diet; OPAO = olive pomace acid oil diet; B = diet with a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w); T = tocopherol; T3 = tocotrienol; SEM = standard error of the mean. ¹ Mean of the different experimental replicates for each diet (n = 8). ² *P* values obtained from ANOVA (n = 32) of fresh or refrigerated pork. Values in bold were significant (*P* < 0.05). Differences between diets found in fresh or refrigerated pork with Scheffé's post hoc test (n = 32) were noted in the same row as a > b > c. ³ Pooled means of fresh or refrigerated pork coming from the four dietary treatments (n = 32). ⁴ *P* values obtained for the refrigeration (*P*_{refrigeration}) and the interaction between the refrigeration time and the diet (*P*_{refrigeration x diet}) from multifactor ANOVA (n = 64). Values in bold were significant (*P* < 0.05). ⁵ Sum of α-T, β-T, γ-T and α-T3.

Lipid hydroperoxide concentration and oxidative stability of pork

The primary lipid oxidation (LHP content) of pork was only quantifiable in refrigerated pork coming from OPAO diet, finding levels of 0.07 mmol of cumene hydroperoxide eq/kg.

The oxidative stability of fresh and refrigerated pork, assessed by the final LHP value, is represented in Fig. 2A and Fig. 2B (a higher final LHP value indicates a higher LHP formation during the 74h incubation of the ferrous oxidation-xylenol orange assay and thus, a lower oxidative stability). The refrigerated storage decreased pork oxidative stability ($P < 0.001$). The oxidative stability in fresh pork was not affected by the sex (Supplementary Table S5) but there was an effect of the diet, as fresh pork from OPAO diet showed a lower oxidative stability than fresh pork from PO diet ($P = 0.004$). However, no significant impact of the diet was found for the oxidative stability of pork after its refrigerated storage (Fig. 2). Despite this different impact of the diet on the oxidative stability of fresh and refrigerated pork, multifactor ANOVA did not reveal a significant interaction between these two factors.

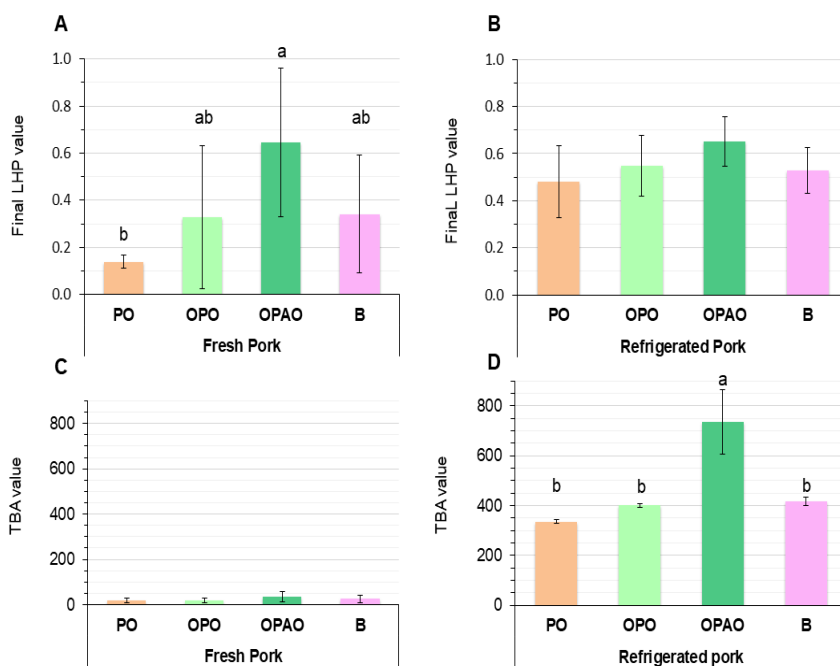


Fig. 2 Oxidative stability (final lipid hydroperoxide (LHP) value after 74 h of incubation, expressed as mmol of cumene hydroperoxide eq/kg) of fresh pork (A) and refrigerated pork (B), and 2-thiobarbituric acid (TBA) values (expressed as µg of malondialdehyde /kg) of fresh pork (C) and refrigerated pork (D) coming from the different diets: PO = crude palm oil diet; OPO = crude olive pomace oil diet; OPAO= olive pomace acid oil diet and B = diet with a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w). The differences between diets found in pork loin with Scheffé's post hoc test (n = 32) were noted as a > b.

2-Thiobarbituric acid values of pork

Pork TBA values, which measure secondary oxidation, are shown in Fig. 2C and Fig. 2D. There was a significant interaction between the refrigeration and the diet ($P < 0.001$). In fresh pork, TBA values did not depend on the diet or the sex (Supplementary Table S5). After refrigeration, TBA values increased in pork from all diets ($P < 0.001$), being the increase higher in OPAO pork ($P < 0.001$) (Fig. 2).

Composition of volatile compounds of pork

A total of five aldehydes (propanal, pentanal, hexanal, heptanal and octanal), three alcohols (1-pentanol, 1-hexanol and 1-octen-3-ol), four ketones (2-heptanone, 2-octanone, 3-octanone and 1-octen-3-one) and one

furan (2-pentylfuran) were identified and quantified in fresh and refrigerated pork (Table 5). There was a significant effect of the interaction between the refrigeration and the diet on propanal ($P = 0.012$), pentanal ($P = 0.019$), all the alcohols ($P < 0.001$), 2-heptanone ($P < 0.001$), 3-octanone ($P < 0.001$), 1-octen-3-one ($P < 0.001$) and 2-pentylfuran ($P < 0.001$). Their concentrations significantly increased after refrigeration ($P \leq 0.003$), but the effect of the diet was significant only for refrigerated pork ($P \leq 0.005$). Refrigeration also increased the concentration of 2-octanone ($P < 0.001$), whereas octanal concentration decreased ($P = 0.002$). After refrigeration, the concentration of all volatile compounds, except 2-octanone, was significantly higher in OPAO pork ($P \leq 0.008$). The sex affected hexanal ($P = 0.035$) and heptanal contents ($P = 0.006$) (Supplementary Table S5). Female fresh pork loin showed higher content of both compounds (50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for hexanal and heptanal, respectively) than entire male fresh pork loin (27.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for hexanal and heptanal, respectively).

Table 5 Volatile compounds of fresh and refrigerated pork loin.

Compound (µg/kg)	Pork	Diet ¹						Multifactor ANOVA				Previously linked to lipid oxidation
		PO	OPO	OPAO	B	SEM	P_{diet}^2	Refrigeration ³	SEM	$P_{refrigeration}^4$	$P_{refrigeration \times diet}^4$	
Propanal	Fresh	0.2	0.2	0.2	0.2	0.015	0.299	0.2	0.022	0.002	0.012	Daza et al. (2005)
	Refrigerated	0.2 ^b	0.2 ^b	0.5 ^a	0.2 ^b	0.060	0.005	0.3				
Pentanal	Fresh	1.7	1.6	2.1	0.7	0.546	0.318	1.6	0.408	0.003	0.019	Daza et al. (2005); Ross and Smith (2006)
	Refrigerated	2.0 ^b	1.9 ^b	7.1 ^a	2.5 ^b	1.016	0.003	3.4				
Hexanal ⁵	Fresh	36.9	37.7	53.0	15.9	14.731	0.378	35.9	7.995	0.621	0.081	Daza et al. (2005); Del Pulgar et al. (2013); Ross and Smith (2006)
	Refrigerated	21.3 ^b	19.8 ^b	109.5 ^a	15.4 ^b	17.155	0.001	41.5				
Heptanal ⁵	Fresh	1.6	1.6	1.9	1.9	0.573	0.982	1.7	0.267	0.126	0.058	Daza et al. (2005)
	Refrigerated	0.4 ^b	0.5 ^b	3.1 ^a	0.6 ^b	0.494	0.001	1.2				Del Pulgar et al. (2013)
Octanal	Fresh	1.7	1.2	1.1	1.5	0.480	0.817	1.4	0.185	0.002	0.195	Daza et al. (2005); Del Pulgar et al. (2013)
	Refrigerated	0.2 ^b	0.3 ^b	1.2 ^a	0.4 ^{ab}	0.206	0.008	0.5				
1-Pentanol	Fresh	10.2	12.6	11.8	7.5	2.792	0.587	10.5	2.858	<0.001	<0.001	Nieminen et al. (2016)
	Refrigerated	77.4 ^b	88.4 ^b	131.4 ^a	85.3 ^b	7.587	<0.001	95.6				
1-Hexanol	Fresh	13.6	15.2	15.0	13.6	2.381	0.940	14.4	1.675	<0.001	<0.001	Nieminen et al. (2016)
	Refrigerated	35.9 ^b	46.4 ^b	85.3 ^a	44.2 ^b	4.096	<0.001	52.9				

Abbreviations: PO = crude palm oil diet; OPO = crude olive pomace oil diet; OPAO = olive pomace acid oil diet; B = diet with a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w); SEM = standard error of the mean. ¹Mean of the different experimental replicates for each diet (n = 8) expressed as µg of 4-methyl-2-pentanol equivalents/kg of sample. ²P values obtained from ANOVA (n = 32) of fresh or refrigerated pork. Values in bold were significant (P < 0.05). The differences among diets found in refrigerated pork with Scheffé's post hoc test were noted in the same row as a > b. ³Pooled means of fresh or refrigerated pork coming from the four dietary treatments (n = 32). ⁴P values obtained for the refrigeration (P_{refrigeration}) and the interaction between the refrigeration time and the diet (P_{refrigeration x diet}) from multifactor ANOVA (n = 64). Values in bold were significant (P < 0.05). ⁵Significant differences (P < 0.05) between female and entire male pigs were obtained from multifactor ANOVA (n = 32). See Supplementary Table S5 for the complete

Continuation of Table 5 Volatile compounds of fresh and refrigerated pork loin.

Compound (µg/kg)	Pork	Diet ¹				Multifactor ANOVA				Previously linked to lipid oxidation		
		PO	OPO	OPAO	B	SEM	P_{diet}^2	Refrigeration ³ SEM	$P_{refrigeration^4}$		$P_{refrigeration \times diet^4}$	
1-Octen-3-ol	Fresh	184.0	194.1	231.0	157.9	29.162	0.374	191.7				
	Refrigerated	329.3 ^b	391.1 ^b	801.4 ^a	363.0 ^b	39.254	< 0.001	471.2	17.289	<0.001	<0.001	Nieminen et al. (2016)
2-Heptanone	Fresh	14.0	13.0	15.0	12.5	1.837	0.778	13.6				
	Refrigerated	47.1 ^b	51.0 ^b	75.5 ^a	51.9 ^b	4.202	< 0.001	56.4	1.621	<0.001	<0.001	Gardner and Selke (1984)
2-Octanone	Fresh	3.5	3.3	3.9	3.5	0.464	0.787	3.5	0.594	<0.001	0.438	Del Pulgar et al. (2013); Takeungwongtrakul et al. (2020)
	Refrigerated	15.9	15.4	19.4	15.6	1.616	0.281	16.6	0.083	<0.001	<0.001	Kiralan et al. (2018)
3-Octanone	Fresh	0.4	0.3	0.4	0.4	0.040	0.511	0.4				
	Refrigerated	0.8 ^b	0.8 ^b	2.5 ^a	0.7 ^b	0.231	< 0.001	1.2	0.487	<0.001	<0.001	Benet et al. (2016)
1-Octen-3-one	Fresh	6.2	6.5	7.0	4.9	0.726	0.224	6.2				
	Refrigerated	10.7 ^b	12.7 ^b	22.6 ^a	11.6 ^b	1.172	< 0.001	14.4	0.810	<0.001	<0.001	Del Pulgar et al. (2013)
2-Pentylfuran	Fresh	4.5	5.1	6.2	4.1	0.775	0.271	5.0				
	Refrigerated	9.3 ^b	12.5 ^b	24.9 ^a	10.3 ^b	2.157	< 0.001	14.2				

Abbreviations: PO = crude palm oil diet; OPO = crude olive pomace oil diet; OPAO = olive pomace acid oil diet; B = diet with a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w); SEM = standard error of the mean. ¹ Mean of the different experimental replicates for each diet (n = 8) expressed as µg of 4-metil-2-pentanol equivalents/kg of sample. ² P values obtained from ANOVA (n = 32) of fresh or refrigerated pork. Values in bold were significant (P < 0.05). The differences among diets found in refrigerated pork with Scheffé's post hoc test were noted in the same row as > b. ³ Pooled means of fresh or refrigerated pork coming from the four dietary treatments (n = 32). ⁴ P values obtained for the refrigeration (P^{refrigeration}) and the interaction between the refrigeration time and the diet (P^{refrigeration x diet}) from multifactor ANOVA (n = 64). Values in bold were significant (P < 0.05). ⁵ Significant differences (P < 0.05) between female and entire male pigs were obtained from multifactor ANOVA (n = 32). See Supplementary Table S5 for the complete

Color and sensory acceptance of pork

The color results obtained for fresh and refrigerated pork are presented in Table 6. The refrigerated storage significantly increased pork lightness (L^*) and decreased its redness (a^*) and yellowness (b^*) ($P < 0.001$). There was no effect of the diet on the color parameters of fresh or refrigerated pork. Sex also did not affect any color parameter (Supplementary Table S5). The ΔE parameter, that was obtained to study if the differences between the color of fresh and refrigerated pork coming from each diet would be appreciable by human eye, was higher for OPAO pork, followed by OPO pork.

The sensory scores obtained for fresh and refrigerated pork did not reveal a significant impact of the refrigeration or the diet on the overall acceptance of pork loin (Table 6).

Table 6 Color parametres (L*; a*; b* instrumental parameters and ΔE values) and consumer overall acceptance of fresh and refrigerated pork loin.

	Pork	Diet				SEM	P _{diet} ⁴	Multifactor ANOVA			
		PO	OPO	OPAO	B			Refrigeration ⁵	SEM	P _{refrigeration} ⁶	P _{refrigeration x diet} ⁶
Color parameters^{1,2}											
L*	Fresh	60.97	60.77	61.64	62.25	0.622	0.338	61.41	0.270	<0.001	0.765
	Refrigerated	64.56	64.54	65.69	65.18	0.445	0.229	64.99			
a*	Fresh	21.11	21.67	21.24	20.92	0.365	0.525	21.24	0.198	<0.001	0.238
	Refrigerated	15.51	15.18	14.21	15.20	0.424	0.178	15.03			
b*	Fresh	12.14	12.42	12.32	12.62	0.125	0.079	12.38	0.061	<0.001	0.447
	Refrigerated	11.80	11.89	11.75	11.87	0.119	0.829	11.82			
ΔE		6.66	7.53	8.13	6.47						
Overall acceptance³											
Sensory scores	Fresh	6.64	5.89	6.19	6.28	0.345	0.495	6.25	0.160	0.160	0.770
	Refrigerated	5.92	5.67	6.11	6.03	0.295	0.732	5.93			

Abbreviations: PO = crude palm oil diet; OPO = crude olive pomace oil diet; OPAO = olive pomace acid oil diet; B = diet with a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w); L* = lightness; a* = redness; b* = yellowness; SEM = standard error of the mean. ¹For L*, a* and b* mean of the different experimental replicates for each dietary treatment (n = 8). ²ΔE values were calculated by Eq. 1 to compare the color parameters between fresh and refrigerated pork from the same diet. ³Data were expressed as the mean of the different sensory scores obtained for each dietary treatment (n = 36). ⁴P values obtained from ANOVA (n = 32 for color parameters and n = 144 for sensory scores) of fresh or refrigerated pork. P < 0.05 was considered significant. ⁵Pooled means of fresh or refrigerated pork coming from the four dietary treatments (n = 32 for color parameters and n = 144 for sensory scores). ⁶P values obtained for the refrigeration (P_{refrigeration}) and the interaction between the refrigeration time and the diet (P_{refrigeration x diet}) from multifactor ANOVA (n = 64 for color parameters and n = 288 for sensory scores). Values in bold were significant (P < 0.05).

Discussion

Composition of fat sources and diets

It is known that acid oils, such as OPAO, might present a high variability in their nutritional quality and composition (Varona et al., 2021a). Regarding quality, the MIU percentage represents a fraction of compounds that can dilute the energy value of a fat and, has been pointed out as especially relevant for the quality control of acid oils as it can reach high values in them (Varona et al., 2021a). In fact, the OPAO used in this study had the highest total MIU (12.7 g/100 g) and insoluble impurities fraction (7.8 g/100 g) compared to the other experimental fat sources (Table 1). Furthermore, the total MIU and insoluble impurities values in this OPAO were higher than the median values found for acid oils from the Spanish market (7.6 g/100 g and 1.8 g/100 g, respectively) (Varona et al., 2021a). Despite this high content of energy diluting compounds in OPAO, Verge-Mèrida et al. (2022) did not find significant differences in the productive parameters of pigs when 5% of OPAO was used instead of OPO in diets. Also, OPAO was the richest experimental fat in free FA, as well as in diacylglycerols and monoacylglycerols, these proportions being quite similar to the median values previously reported for acid oils derived from olive origin (60.8%, 17.7% and 4.6%, respectively) (Varona et al., 2021a). Despite a higher free FA content might have conditioned lipid digestibility, no differences were observed in the feed digestible energy and total FA apparent digestibility when using a 5% of OPAO in diets instead of OPO (Verge-Mèrida et al., 2022).

It has also been reported that the FA and tocol composition of acid oils are highly influenced by the botanical origin of the crude oil (Varona et al., 2021a). Accordingly, both the OPAO and the OPO used in this study had a high proportion of oleic acid. On the other hand, OPAO had the lowest T + T3 levels, closely followed by OPO, with α -T being the main tocol compound in both fats, whereas PO presented the highest total T + T3 content, and was richer in T3 than in T. Considering this information, the OPAO used in this study showed a lower quality than that usually found for similar acid oils.

The composition of the diets (Table 2) was clearly influenced by the fat source (Table 1), as the experimental fats were added at 5% and the crude fat (ether extract) was \approx 6% (Supplementary Table S2). For instance, the proportion of oleic acid was higher in diets that included oils of olive origin (OPO and OPAO), whereas the concentrations of T3 and T + T3 were higher in diets that included PO. Still, there was a contribution of other ingredients (Supplementary Table S2) to the lipid composition of the diets. For instance, the higher proportion of polyunsaturated FA found in the diets compared with the fat sources was due to the contribution of the cereals that were used to formulate the diets, some of which are rich in linoleic acid (Kan, 2015). The T and T3 concentrations of the diets were mainly influenced by the cereals, the premix and the experimental fat source. The contribution of the cereals led to an increment of γ -T, α -T3 and γ -T3 concentrations in the diets compared with the fat sources (Niculita et al., 2007; Nielsen y Hansen, 2008). The supply of 15 mg of α -tocopheryl acetate per kg of feed by the premix (Supplementary Table S2) was clearly noticeable in PO diets (Table 2), as it changed their T and T3 profile (richer in T than in T3) with respect to the PO fat source (richer in T3 than in T) (Table 1). Regarding the lipid classes of the diets, lipids supplied by cereals were mainly triacylglycerols, which caused the increment of this fraction in OPAO diets (45 – 49%) with respect to the fat source (24%) and, consequently, diluted the final free FA percentage in OPAO diets (34 – 39%) (Table 2) compared to the fat source (54%) (Table 1).

Lipid composition of pork

It has been demonstrated that the FA composition of the diet can be mirrored in the FA profile of meat from monogastric animals. In this study, oleic acid was the main FA found in pork (\approx 41%) and in all diets, but even if OPO and OPAO diets presented a higher monounsaturated FA proportion (\approx 52%) than PO diets (\approx 37%), the effect of the diet on pork monounsaturated FA was not significant. Regarding saturated FA, the diet significantly affected some saturated FA ($P \leq 0.038$) and total saturated FA ($P = 0.002$) of pork, but the numerical difference between treatments was approximately of 2%, even though PO diet had a higher total

saturated FA content ($\approx 37\%$) than OPO and OPAO diets ($\approx 17\%$). In fact, there are several factors that can affect the FA profile of the meat besides the diet, as not all absorbed FA are deposited. Some studies have suggested that the FA metabolism of pigs can be adapted to the FA profile of the diet, as for instance reflected by the activity of some desaturases. Particularly, Δ -9 desaturase activity increases when the diet is rich in saturated FA and decreases when the diet is rich in oleic acid (Vehovský et al., 2018). Thus, this adaptability of the FA metabolism in pigs depending on their diet might explain why the differences in the FA profiles between the experimental diets were attenuated in pork in this study. The same attenuation was observed by Verge-Mèrida et al. (2021) who evaluated the effect of the same dietary treatments (PO, OPO, OPAO or B) on pork loin taken from a different location (between the last rib and the first lumbar). In general, the use of OPAO diet had the same effect as OPO diet, but the differences observed in the pork FA profile between diets were slightly different to the ones obtained in our study. This could be due to the fact that Verge-Mèrida et al. (2021) only studied pork loin coming from female pigs, and our results suggested that loins from entire male pigs had a higher proportion of oleic acid, and a lower C18:2 n-6 percentage (Table 3). Generally, the studies in the literature about the differences in the FA composition of pork loin coming from entire males and females showed the opposite behavior when entire males and females of similar BW are compared (Hallenstvedt et al., 2010; Grela et al., 2013). But it has also been reported that the proportion of oleic acid increases with the BW of the pigs (both in entire males and in females), whereas that of linoleic and linolenic decreases (Kouba et al., 2003; Zomeño et al., 2023). So these differences might be attributed to the different composition of the diets, the breed of the pigs, or the anatomical location where the loin sample was taken in each study, but also to the fact that in our study females reached a significantly lower final BW than entire males (Verge-Mèrida et al., 2021).

Regarding T and T3 levels, animals are unable to synthesize them, so the concentrations found in pork came entirely from the diet. The highest T + T3 concentration was found in fresh and refrigerated pork from the PO diet, which had the highest T + T3 concentration. Thus, the use of a 5% OPAO in diets, or its blend with PO, led to lower T + T3 concentrations than the use of 5% PO, but similar to those obtained when using 5% OPO, except for α -T in refrigerated pork, for which, 5% OPAO resulted in lower levels (Table 4). The α -T levels in fresh and refrigerated pork loin (0.63 – 2.32 mg/kg) were similar to those observed by Nuernberg et al. (2005) for fresh pork loin (0.8 – 1.2 mg/kg) when 5% of linseed oil or olive oil was added to a basal diet containing 12 mg α -T/kg. In the same line, a study performed with pig diets supplemented with 40 mg/kg of α -tocopheryl acetate and containing different blends of olive acid oil, sunflower acid oil and Iberian pig lard reported levels between 2 – 3 mg of α -T/kg and between 0.1 – 0.2 mg of γ -T/kg in fresh loin (Daza et al., 2005). These concentrations are similar to the ones found in this study for fresh pork, α -T (1.2 – 2.3 mg/kg) and γ -T (0.1 mg/kg), even though the vitamin premix of our diets provided a much lower amount of α -tocopheryl acetate (15 mg/kg).

Lipid oxidation in pork

The use of OPAO in pig diets did not result in a higher lipid oxidation in fresh pork, but after the refrigerated storage, OPAO pork showed a higher increase in TBA values and in the content of most volatile compounds. The volatile compound composition of meat has been widely studied, as it can affect the aroma of the meat and, therefore, its sensory acceptance. The presence of certain volatile compounds in meat, such as those identified in pork in this study, has been linked to lipid oxidation reactions (Table 5). Aldehydes are typically the main secondary products of meat lipid oxidation, with hexanal being the most predominant and prone to a higher increase (Amaral et al., 2018). However, in this study, hexanal was not the predominant volatile compound in pork and, furthermore, it was not affected by refrigeration. Instead, the main volatile compound was 1-octen-3-ol (Table 5), which suffered the highest increment after the refrigerated storage. Both may arise from the oxidation of n-6 polyunsaturated FA, such as linoleic and arachidonic acids, although the chemical pathways of production differ. Hexanal can be produced by the homolytic cleavage of five different hydroperoxides derived from linoleic and arachidonic acids, whereas 1-octen-3-ol may be formed after a

multistep decomposition of two different hydroperoxides, involving intermediate reactants (Meynier et al., 1998). It is important to notice that, besides lipid oxidation, there are other chemical or microbiological process that can be involved in the production of volatile compounds. For instance, Park et al. (2009) revealed that heat and refrigeration had a different impact on the volatile compound composition of pork loin. During heating, they found a greater increase in aldehydes, which suggested that lipid oxidation was the main pathway for the formation of volatile compounds. However, during pork refrigeration, they observed an increase in methyl alcohols and ketones (overall 1-methoxy-2-propanol and 3-hydroxy-2-butanone, both not detected in our study), suggesting that, contrarily to our outcomes, branched chain amino acids and pyruvate catabolism had a greater impact than lipid oxidation on the production of volatile compounds during refrigeration (Park et al., 2009). In our study, the increase in TBA values (Fig. 2C and Fig. 2D) and volatile compound concentrations (Table 5) plus the decrease in oxidative stability (Fig. 2A and Fig. 2B) and α -T levels (Table 4) after refrigerated storage, revealed a clear development of lipid oxidation reactions in pork during refrigeration. This is consistent with the results obtained by Fan et al. (2019), who found an increase in TBA values from $\approx 200 \mu\text{g}$ malondialdehyde/kg to $\approx 1\,000 \mu\text{g}$ malondialdehyde/kg after seven days of refrigeration (at $4 \pm 1^\circ\text{C}$) of pork tenderloin placed in enamel trays and sealed with plastic wrap with bleeder vents. However, their TBA values were higher than the ones obtained in the present work (Fig. 2C and Fig. 2D), which might be attributed to the modified atmosphere used in this study.

In terms of the effect of the diet, fresh OPAO pork exhibited a higher tendency to form LHP than pork from other diets (Fig. 2A), which is consistent with its greater increase in TBA values (Fig. 2D) and volatile compound concentrations (Table 5) after refrigeration. Moreover, this agreed with the greater reduction in α -T in OPAO pork during the refrigerated storage (Table 4). This different behavior of OPAO pork might be due to its higher unsaturated-to-saturated FA ratio (Table 3) and lower α -T concentration (Table 4) compared with PO and B pork. However, the lower quality of the OPAO fat source used in this study compared with other OPAO from the Spanish market (Varona et al., 2021a) could also have had some negative impact on the lipid quality of OPAO pork.

The relationship between pork unsaturated-to-saturated FA ratio and the lipid oxidation has been previously reported by Nuernberg et al. (2005), who observed a significantly lower oxidative stability in pork coming from a diet rich in polyunsaturated FA (5% of added linseed oil) compared with pork from a diet rich in monounsaturated FA (5% of added olive oil). In addition, Rey et al. (2001) found that the TBA values in pork loin kept in PVC stretch overwrap after three days of refrigerated storage, also depended on the FA profile of the diet (no added fat or 20% of sunflower, olive oil or a blend of sunflower and linseed oils), whereas they observed similar α -T levels in fresh pork coming from the four diets used ($\approx 1.0 \text{ mg/kg}$). In our study, fresh PO pork showed the highest α -T level (2.32 mg/kg); however, this did not lead to a significant positive effect on the oxidative stability (Fig. 2A and Fig. 2B), the TBA values (Fig. 2C and Fig. 2D) or the volatile compound concentrations (Table 5) compared with OPO and B pork, as they showed similar unsaturated-to-saturated ratio. Likewise, Daza et al. (2005) observed no clear influence of the dietary α -tocopheryl acetate levels on TBA values of pork loin placed into polystyrene trays and wrapped in an oxygen-permeable PVC stretch wrap after 9 days of refrigerated storage, but TBA values depended on the FA profile of the diet used. Moreover, although *longissimus muscle* has a lower capacity to accumulate T and T3 compared to other pig muscles richer in α -T, such as *psoas major*, *tibialis*, or *biceps femoris*, it has been suggested that it is a muscle more stable to oxidation (O'Sullivan et al., 1997; Mason et al., 2005).

Although female pork loin had a higher polyunsaturated FA proportion than entire male pork loin (Table 3), the oxidative stability, the TBA values and the concentration of most of the volatile compound observed in fresh pork loin were not affected by the sex. This is in agreement with the results obtained by Grela et al. (2013), who found similar TBA values in pork loin from entire males and females (370 vs 360 μg malondialdehyde/kg), despite the pork loin from entire males showed a higher percentage of polyunsaturated FA. This means that

the differences in the FA profile of pork loin due to the sex of the pigs were negligible in terms of lipid oxidation in any of the two studies.

Color and sensory acceptance of pork

The addition of OPAO to pig diets did not let to color differences in fresh or refrigerated pork compared to the other fat sources assayed. However, after the storage of the loin portions for 8 days under commercial conditions (at 3 – 4 °C, packed in modified atmosphere O₂/CO₂; 70/30), the color parameters of pork measured after grinding were modified: L* increased, and a* and b* decreased. It is well known that meat color depends on the myoglobin concentration, its oxidation state and the meat structure. Concretely, the increase in pork lightness (L*) after refrigeration (Table 6) might be linked to a higher oxymyoglobin fraction (Lindahl et al., 2001), which is in concordance with the promotion of myoglobin oxygenation in meat packed in high oxygen atmospheres (Mancini and Hunt, 2005) such as the one used in this study. Similarly, Jongberg et al. (2018) reported an increase in L* on the surface of pork chops after their refrigerated storage in a high-oxygen atmosphere (80% O₂ and 20% CO₂). According to Lindahl et al., (2001), the decrease in pork redness (a*) after the refrigerated storage (Table 6) may be related to a lower myoglobin oxidation (lower proportion of metmyoglobin) and to a higher deoxymyoglobin (Lindahl et al., 2001), whereas the reduction in pork yellowness (b*) may be related with a lower oxymyoglobin/deoxymyoglobin proportion and to a lower internal reflectance (Lindahl et al., 2001). In some cases, decreases in a* (Table 6) have also been observed together with the development of meat lipid oxidation during refrigerated storage. In our study, this agreed with the increase in the TBA values (Fig. 2C and Fig. 2D) and the volatile compound concentrations (Table 6).

According to the National Bureau of Standards Unit (NBS unit), the following scale for ΔE reveals if color differences could be perceived by humans: 0 – 0.5, *trace*; 0.5 – 1.5, *slight*; 1.5 – 3.0, *noticeable*; 3.0 – 6.0, *appreciable*; 6.0 – 12.0, *much*; and > 12.0, *very much* (Pogorzelska et al., 2018). This means that the color differences between fresh and refrigerated pork found in this trial led to ΔE values between 6.5 and 8.1, and thus in meat from all the studied diets would be highly (*much*) appreciable by the human eye (Table 6).

Regarding sensory acceptance, the use of a 5% of OPAO as feed fat led to the highest TBA value in refrigerated pork (734 μg malondialdehyde/kg), but it did not result in a loss of sensory acceptance. Several authors in the literature have studied the correlation between TBA levels and the sensory acceptance of different food products, but the TBA value threshold that can be linked to an acceptance loss is difficult to establish, since there are several analytical methods to evaluate the TBA values in meat and different types of sensory acceptance tests. For example, Gray et al. (1996) reported different ranges of TBA values associated with the detection of rancid odors and flavors in cooked meat by trained taste panelists (0.5 – 1.0 mg malondialdehyde/kg) or by inexperienced taste panelists (0.6 – 2.0 mg malondialdehyde/kg). Even if the sensory acceptance results should be corroborated in loins from male pigs, which are also commercialized, it is highly probable that there would also be an absence of diet effect, as the FA composition revealed that male loins were less rich in PUFA, no sex differences were observed for TBA values, and the only volatile compounds for which a sex difference was observed (hexanal and heptanal) were lower in male loins.

Conclusion

The addition of a 5% of OPAO to pig diets had a negative impact on pork's oxidative parameters which might be due to the higher unsaturated-to-saturated FA ratio and the lower α -T levels of OPAO pork but might also be related to the lower quality of the acid oil used in this study. This effect on the oxidative parameters was not observed when OPAO was added to the diet as a blend with PO (B diet) or when using OPO diet. In addition, the color and the overall acceptance of pork were not significantly affected by any of the diets. Thus, in order to upcycle acid oils, the use of 5% of OPAO in pig diets would not be noticed by pork consumers, but considering the results obtained for the lipid oxidative stability of pork, it would be preferable the addition of the OPAO source used in this study as a blend with PO.

Ethics approval

The Ethics Committee on Animal and Human Research (CEEAH) of the Universitat Autònoma de Barcelona (code 4006), on the 19/04/2021, confirmed that this experiment did not require their approval since all the procedures were performed under commercial conditions following the European Regulations for pork meat production.

Data and model availability statement

None of the data were deposited in an official repository. Available upon request.

Author ORCIDs

P. Albendea: <https://orcid.org/0000-0002-0801-3522>

A. Tres: <https://orcid.org/0000-0003-3626-8511>

M. Rafecas: <https://orcid.org/0000-0001-6308-1125>

S. Vichi: <https://orcid.org/0000-0001-7859-7087>

D. Solà-Oriol: <http://orcid.org/0000-0001-8365-340X>

M. Verdú: <https://orcid.org/0000-0003-4055-5804>

F. Guardiola: <https://orcid.org/0000-0002-8624-8749>

Author contributions

P. Albendea: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, data curation, writing – original draft, writing – review and editing, visualization.

A. Tres: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, data curation, writing – review and editing, visualization, supervision, funding acquisition.

M. Rafecas: conceptualization, methodology, validation, writing – review and editing, funding acquisition.

S. Vichi: conceptualization, methodology, validation, writing – review and editing.

D. Solà-Oriol: conceptualization, methodology, validation, writing – review and editing.

M. Verdú: conceptualization, methodology, validation, resources, writing – review and editing.

F. Guardiola: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing – review and editing, visualization, supervision, project administration, funding acquisition.

Declaration of interest

The authors declare that bonÀrea Agrupa provided technical support, staff and facilities free of charge. M. Verdú works for bonÀrea Agrupa. All authors contributed to analyzing and interpreting the data and declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors acknowledge bonÀrea Agrupa for the support during pig production, slaughtering and meat processing and to our colleagues from Universitat Autònoma de Barcelona for their collaboration in this study. The authors are also grateful to RIOSA S.A. for providing two experimental fates. Also, the authors would like to thank all the participants in the sensory acceptance test. The *Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB)* is recognized as a Maria de Maeztu Unit of Excellence (grant CEX2021-001234-M) funded by MICIN/AEI/FEDER, EU.

Financial support statement

This research has been supported by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe” through the project AGL2015-64431-C2-2-R; by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ESF Investing in your future” through the grant RYC-2017-23601; by Spanish Ministry of Universities through the FPU program (FPU18/01010), the University of Barcelona through the pre-doctoral program APIF (APIF_18_19_10) and the Universitat Autònoma de Barcelona -Banco de Santander through the Talent Program.

References

- Albendea, P., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Sala, R., Guardiola, F., 2023. Effect of feeding acid oils on European seabass fillet lipid composition, oxidative stability, color and sensory acceptance. *Aquaculture Nutrition*. 2023, 6415693. doi:10.1155/2023/6415693
- Alonso, V., Najes, L.M., Provincial, L., Guillén, E., Gil, M., Roncalés, P., Beltrán, J.A., 2012. Influence of dietary fat on pork eating quality. *Meat Science*. 92, 366–373. doi:10.1016/j.meatsci.2012.01.004
- Amaral, A.B., da Silva, M.V., Lannes, S. C. S., 2018. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors – a review. *Food Science and Technology*. 38, 1-15. doi:10.1590/fst.32518
- AOAC International, 2019. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, volume 3, 21th edition. AOAC International, Rockville, MD, USA.
- Benet, I., Guàrdia, M.D., Ibañez, C., Solà, J., Arnau, J., Roura, E., 2016. Low intramuscular fat (but high in PUFA) content in cooked cured pork ham decreased Maillard reaction volatiles and pleasing aroma attributes. *Food Chemistry*. 196, 76–82. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.026
- Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Cumella, F., Sardi, L., Della Casa, G., Lercker, G., 2011. Oxidative stability of pork meat lipids as related to high-oleic sunflower oil and vitamin E diet supplementation and storage conditions. *Meat Science*. 88, 271–279. doi:10.1016/j.meatsci.2010.12.034
- Daza, A., Rey, A.I., Ruiz, J., Lopez-Bote, C.J., 2005. Effects of feeding in free-range conditions or in confinement with different dietary MUFA/PUFA ratios and α -tocopheryl acetate, on antioxidants accumulation and oxidative stability in iberian pigs. *Meat Science*. 69, 151–163. doi:10.1016/j.meatsci.2004.06.017
- Del Pulgar, J.S., Roldan, M., Ruiz-Carrascal, J., 2013. Volatile compounds profile of sous-vide cooked pork cheeks as affected by cooking conditions (vacuum packaging, temperature and time). *Molecules*. 18, 12538–12547. doi:10.3390/molecules181012538
- Dífonzo, G., Troilo, M., Squeo, G., Pasqualone, A., Caponio, F., 2021. Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods – a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101, 15–26. doi:10.1002/jsfa.10478
- Fan, X.J., Liu, S.Z., Li, H.H., He, J., Feng, J.T., Zhang, X., Yan, H., 2019. Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on lipid oxidation and color of pork meat during refrigerated storage. *Meat Science*. 147, 82–90. doi:10.1016/j.meatsci.2018.08.022
- FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal), 2002. Normas FEDNA de control de calidad de ingredientes para piensos-Especificación técnica de materia prima, grasas y aceites. Retrieved on 16 December 2022 from http://www.fundacionfedna.org/sites/default/files/8_Grasas_y_aceites.pdf.
- Gardner, H.W., Selke, E., 1984. Volatiles from thermal decomposition of isomeric methyl (12 S, 13 S)-(E)-12,13-epoxy-9-hydroperoxy-10-octadecenoates. *Lipids*. 19, 375–380. doi:10.1007/BF02537398
- Gray, J.I., Gomaa, E.A., Buckley, D.J., 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*. 43, 111–123. doi:10.1016/0309-1740(96)00059-9
- Grela, E.R., Kowalczyk-Vasilev, E., Klebaniuk, R., 2013. Performance, pork quality and fatty acid composition of entire males, surgically castrated or immunocastrated males, and female pigs reared under organic system. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 16, 107–114. doi:10.2478/pjvs-2013-0015
- Hallenstvedt, E., Kjos, N.P., Rehnberg, A.C., Øverland, M., Thomassen, M., 2010. Fish oil in feeds for entire male and female pigs: Changes in muscle fatty acid composition and stability of sensory quality. *Meat Science*. 85, 182–190. doi:10.1016/j.meatsci.2009.12.023
- Jongberg, S., Tørngren, M., Skibsted, L., 2018. Protein oxidation and sensory quality of brine-injected pork loins added ascorbate or extracts of green tea or maté during chill-storage in high-oxygen modified atmosphere. *Medicines*. 5, 7. doi:10.3390/medicines5010007

- Kan, A., 2015. Characterization of the fatty acid and mineral compositions of selected cereal cultivars from Turkey. *Records of Natural Products*. 1, 124–134.
- Kiralan, M., Çalik, G., Kiralan, S., Ramadan, M. F., 2018. Monitoring stability and volatile oxidation compounds of cold-pressed flax seed, grape seed and black cumin seed oils upon photo-oxidation. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12, 616–621. doi:10.1007/s11694-017-9674-3
- Kouba, M., Enser, F. M., Whittington, M., Nute, G. R., Wood, J.D., 2003. Effect of a high-linolenic acid diet on lipogenic enzyme activities, fatty acid composition, and meat quality in the growing pig. *Journal of Animal Science*. 81: 1967-1979. doi:10.1016/s0309-1740(98)00146-6
- Lindah, G., Lundström, K., Tornberg, E., 2001. Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. *Meat Science*. 59, 141–151. doi:10.1016/S0309-1740(01)00064-X
- Lundström, K., Matthews, K.R., Haugen, J.E., 2009. Pig meat quality from entire males. *Animal* 3, 1497–1507. doi:10.1017/s1751731109990693
- Mancini, R.A.; Hunt, M.C. Current research in meat color, 2005. *Meat Science*. 71, 100-121. doi:10.1016/j.meatsci.2005.03.003
- Mason, L.M., Hogan, S.A., Lynch, A., O'Sullivan, K., Lawlor, P.G., Kerry, J.P., 2005. Effects of restricted feeding and antioxidant supplementation on pig performance and quality characteristics of longissimus dorsi muscle from Landrace and Duroc pigs. *Meat Science*. 70, 307–317. doi:10.1016/j.meatsci.2005.01.017
- Meynier, A., Genot, C., Gandemer, G., 1998. Volatile compounds of oxidized pork phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75, 1–7. doi:10.1007/s11746-998-0001-3
- Niculita, P., Popa, M., Ghidurus, M., Turtoi, M., 2007. Effect of vitamin E in swine diet on animal growth performance and meat quality parameters. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 57, 125–129.
- Nielsen, M.M., Hansen, Å., 2008. Rapid high-performance liquid chromatography determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Cereal Chemistry*. 85, 248–251. doi:10.1094/CCHEM-85-2-0248
- Nieminen, T.T., Dalgaard, P., Björkroth, J., 2016. Volatile organic compounds and Photobacterium phosphoreum associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged raw pork. *International Journal of Food Microbiology*. 218, 86–95. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.003
- Nuernberg, K., Fischer, K., Nuernberg, G., Kuechenmeister, U., Klosowska, D., Eliminowska-Wenda, G., Fiedler, I., Ender, K., 2005. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. *Meat Science*. 70, 63–74. doi:10.1016/j.meatsci.2004.12.001
- O'Sullivan, M.G., Kerry, J.P., Buckley, D.J., Lynch, P.B., Morrissey, P.A., 1997. The distribution of dietary vitamin E in the muscles of the porcine carcass. *Meat Science*. 45, 297–305. doi:10.1016/S0309-1740(96)00121-0
- Park, S.Y., Yoon, Y.M., Schilling, M.W., Chin, K.B., 2009. Evaluation of volatile compounds isolated from pork loin (Longissimus dorsi) as affected by fiber type of solid-phase microextraction (SPME), preheating and storage time. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 29, 579–589. doi:10.5851/kosfa.2009.29.5.579
- Pogorzelska, E., Godziszewska, J., Brodowska, M., Wierzbicka, A., 2018. Antioxidant potential of Haematococcus pluvialis extract rich in astaxanthin on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigerated storage. *Meat Science*. 135, 54–61. doi:10.1016/j.meatsci.2017.09.002
- Rey, A.I., López-Bote, C.J., Kerry, J.P., Lynch, P.B., Buckley, D.J., Morrissey, P., 2001. Effects of dietary vegetable oil inclusion and composition on the susceptibility of pig meat to oxidation. *Animal Science*. 72, 457–463. doi:10.1017/S1357729800051973
- Ross, C.F., Smith, D.M., 2006. Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5, 18–25. doi:10.1111/j.1541-4337.2006.tb00077.

Takeungwongtrakul, S., Karnjanapratum, S., Kaewthong, P., Nalinanon, S., 2020. Change in fatty acid profile, volatile compounds and FTIR spectra of samrong seed oil during storage. *International Journal of Agricultural Technology*. 16, 475–484.

Varona, E., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Barroeta, A.C., Guardiola, F., 2021a. Composition and nutritional value of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding. *Animals*. 11, 196. doi:10.3390/ani11010196

Varona, E., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Sala, R., Guardiola, F., 2021b. Oxidative quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding. *Animals*. 11, 2559. doi:10.3390/ani11092559

Varona, E., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Barroeta, A.C., Guardiola, F., 2021c. Methods to determine the quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding. *MethodsX*. 8, 101334. doi:10.1016/j.mex.2021.101334

Vehovský, K., Zadinová, K., Stupka, R., Čítek, J., Lebedová, N., Okrouhlá, M., Šprysl, M., 2018. Fatty acid composition in pork fat: De-novo synthesis, fatty acid sources and influencing factors - A review. *Agronomy Research*. 16, 2211–2228. doi:10.15159/AR.18.196

Verge-Mèrida, G., Barroeta, A.C., Guardiola, F., Verdú, M., Balart, M., Font-i-Furnols, M., Solà-Oriol, D., 2021. Crude and acid oils from olive pomace as alternative fat sources in growing-finishing pigs. *Animal*. 15, 100389. doi:10.1016/j.animal.2021.100389

Zomeño, C., Gispert, M., Čandek-Potokar, M., Mörlein, D., Font-i-Furnols, M., 2023. A matter of body weight and sex type: Pig carcass chemical composition and pork quality. *Meat Science*. 197, 109077. doi:10.1016/j.meatsci.2022.109077

5.3 Scientific publication III



Effect of feeding olive pomace acid oil on dark chicken meat lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance

Paula Albendea, Francesc Guardiola, Magdalena Rafecas, Stefania Vichi, Ana C. Barroeta, Marçal Verdú & Alba Tres

Animals, 2023, 13, 1343

<https://doi.org/10.3390/ani13081343>

Supplementary material available in Anexo III



-Efecto de la alimentación con aceite ácido de orujo de oliva sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de la carne de pollo-

-RESUMEN-

El objetivo de este estudio era evaluar el efecto del uso del aceite ácido de orujo de oliva (OPAO, *Olive pomace acid oil*) en vez de la manteca de palma (PO, *Crude palm oil*) o del aceite refinado de orujo de oliva (ROPO, *Refined olive pomace oil*) sobre la composición lipídica, la oxidación lipídica y la calidad de la carne de pollo en fresco y tras un periodo de 7 días de refrigeración en condiciones comerciales.

De acuerdo con el diseño experimental de este estudio (apartado 4.3), los pollos fueron alimentados con piensos que contenían un 6% de PO, ROPO u OPAO y, tras el sacrificio, se tomaron muestras de las patas (muslo y contramuslo) deshuesadas con piel.

Los métodos analíticos aplicados en carne de pollo fresca y refrigerada comprendían: perfil de FA; composición de T y T3; método de FOX para estudiar tanto la oxidación primaria como la estabilidad oxidativa; valores de TBA; contenido en compuestos volátiles; color y aceptación sensorial (apartado 4.6).

Los resultados de este estudio mostraron que el uso del ROPO y del OPAO en los piensos dio lugar a una carne más rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, *Monounsaturated fatty acid*). El empleo del OPAO resultó en la producción de una carne con niveles más bajos de α -T en comparación a la carne procedente de los piensos con la PO. La estabilidad oxidativa, los valores de TBA, los compuestos volátiles y la aceptación sensorial de la carne no se vieron afectados por la fuente lipídica adicionada a los piensos. Tras la refrigeración, se produjo un aumento de los valores de TBA y de las concentraciones de algunos compuestos volátiles (hexanal, 2-hexenal, 1-pentanol, 1-hexanol y 1-octen-3-ol). Sin embargo, las condiciones de refrigeración empleadas eran adecuadas para prevenir la disminución tanto de la tonalidad rojiza (a^*) como de la aceptación sensorial de la carne de pollo por parte de los consumidores.

Por lo tanto, la conclusión de este estudio es que el OPAO utilizado es una fuente lipídica adecuada para las dietas de pollo cuando se adiciona al 6%, ya que produjo una carne con una composición en FA y T y T3 similar a la carne

obtenida de animales alimentados con un 6% del ROPO (mayor proporción de MUFA que la carne procedente del uso de la PO), sin afectar a la oxidación lipídica ni a la aceptación sensorial. De esta manera, este OPAO puede ser empleado como fuente de energía en alimentación para pollos, contribuyendo a la sostenibilidad de la cadena alimentaria.

Article

Effect of Feeding Olive Pomace Acid Oil on Dark Chicken Meat Lipid Composition, Oxidative Stability, Color, and Sensory Acceptance

Paula Albendea ^{1,2}, Francesc Guardiola ^{1,2,*}, Magdalena Rafecas ^{2,3}, Stefania Vichi ^{1,2}, Ana C. Barroeta ⁴, Marçal Verdú ⁵ and Alba Tres ^{1,2}

- ¹ Nutrition, Food Science and Gastronomy Departament-XIA, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
 - ² Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona, Av. Prat de la Riba, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
 - ³ Nutrition, Food Science and Gastronomy Departament-XIA, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Campus Diagonal, Universitat de Barcelona, Av. de Joan XXIII, E-08028 Barcelona, Spain
 - ⁴ Animal Nutrition and Welfare Service (SNI&A), Animal and Food Science Department, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici V, Travessera dels Turons, E-08193 Bellaterra, Spain
 - ⁵ Department of Animal Nutrition and Feed Industry, bonÀrea Agrupa, E-25210 Guissona, Spain
- * Correspondence: fguardiola@ub.edu; Tel.: +34-934-03-71-96

Simple Summary: One current aim of the chicken meat industry is to reduce production costs, which can be achieved using by-products as feed ingredients. Additionally, this can contribute to the food chain sustainability. This study evaluated lipid composition, lipid oxidation, and quality of fresh and refrigerated chicken meat when an edible oil refining by-product (olive pomace acid oil) was added as a fat source (6%) in broiler diets, using refined olive pomace oil and crude palm oil as fat controls. Results showed that the use of olive pomace acid oil resulted in a similar meat fatty acid composition to the use of refined olive pomace oil, in both cases being rich in oleic acid, and in lower meat α -tocopherol levels compared to the use of palm oil. It did not affect meat lipid oxidation, its color, or its overall acceptance even after its refrigerated storage under commercial conditions, as compared to both control fats. Refrigeration increased meat lipid oxidation, redness, and yellowness, but its overall acceptance was not affected. Thus, considering these results, the olive pomace acid oil used in this study is an adequate fat source for broiler feeds in the conditions used in this study.

Citation: Albendea, P.; Guardiola, F.; Rafecas, M.; Vichi, S.; Barroeta, A.C.; Verdú, M.; Tres, A. Effect of Feeding Olive Pomace Acid Oil on Dark Chicken Meat Lipid Composition, Oxidative Stability, Color, and Sensory Acceptance. *Animals* **2023**, *13*, 1343. <https://doi.org/10.3390/ani13081343>

Academic Editor: Kyung-Woo Lee

Received: 3 March 2023

Revised: 5 April 2023

Accepted: 11 April 2023

Published: 13 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This study evaluated the effect of using olive pomace acid oil (OPAO) instead of crude palm oil (PO) or refined olive pomace oil (ROPO) on lipid composition, lipid oxidation, and quality of chicken meat. Broiler chickens were fed diets with 6% of PO, ROPO, or OPAO, and deboned legs with skin were sampled. Fresh and refrigerated (commercial conditions; 7 days) chicken meat samples were assessed for fatty acid (FA) composition, tocopherol (T) and tocotrienol (T3) content, lipid oxidative stability, 2-thiobarbituric acid (TBA) values, volatile compounds, color, and sensory acceptance. Using ROPO and OPAO led to meat richer in monounsaturated FAs and OPAO to lower α -T levels compared to PO. Oxidative stability, TBA values, volatile compounds, and overall acceptance of meat were not affected by diet. Refrigeration increased TBA values and some volatile compounds' concentrations, but it did not decrease redness or consumers' overall acceptance. Therefore, the OPAO used was an adequate fat source for chicken diets at 6%, as it produced dark meat lower in saturated FAs than PO without affecting lipid oxidation or overall acceptance. According to this, upcycling OPAO as an energy source in chicken diets would be possible, which can contribute to the sustainability of the food chain.

Keywords: edible oil refining by-product; upcycling; chicken feed; chicken diet; poultry meat quality; fat by-product; broiler meat; meat refrigeration; palm oil; olive pomace oil

1. Introduction

Poultry diets are commonly supplemented with fat sources to cover the energy and essential fatty acid (FA) requirements. There are a wide variety of fat sources that have been used in poultry nutrition, but currently, the fats most commonly used are crude oils of vegetable origin (e.g., soybean and palm oils). The selection of these fat sources is mostly driven by their cost, but an improvement in the environmental sustainability of poultry meat production might also be desirable. Consequently, fat by-products of the edible oil industry can be an attractive alternative to crude vegetable oils to supplement animal diets.

Olive oil production represents an important industry in the European Union, as this area is responsible for 68% of the world's production (about 2 million tons per year) [1]. This industry also generates a significant amount of waste, which is approximately four times greater than the amount of olive oil produced [2]. The main by-product of the olive oil industry is olive pomace, which is a mixture of olive pulp and stone. Olive pomace is still rich in oil and characterized by its high concentration of phenolic compounds and other bioactive substances [3]. After removing the water from the olive pomace, the crude olive pomace oil is extracted and subjected to a refining process, usually chemical.

The chemical refining of crude oils, such as crude olive pomace oil, is performed to remove substances that are naturally present in their composition and are undesirable for the taste, stability, and appearance of the edible oil. These compounds might include, among others, particles, pigments, impurities, volatile compounds, and some contaminants. Likewise, oil refining aims to decrease the acidity of the final edible oil, which is achieved through the neutralization step in the chemical refining process. In the neutralization, an alkali treatment is used to remove free fatty acids (FFAs) in the form of soap stocks [4]. Acid oils (AOs), such as olive pomace acid oil (OPAO), are obtained as by-products after acidifying soap stocks. Therefore, AOs are characterized by a high content in FFAs, a high variability of composition, and an FA profile related to the botanical origin of the crude oil [4]. Therefore, OPAO is rich in oleic acid as other oils of olive origin and, as a by-product, represents an economical alternative to the conventional fat sources used in poultry nutrition. Moreover, the carbon footprint can be reduced by upcycling them in the food chain instead of using them in the chemical industry, as the latter always involves additional processing. Despite the benefits that the use of OPAO in animal nutrition may have, a few trials have been performed to evaluate its impact as feeding fat on growth parameters [5–7], whereas the information about its effect on the quality of animal products is scarcer [8]. Therefore, further research is needed to increase confidence in OPAO as a feed ingredient.

The objective of this study was to assess the impact of using OPAO as a fat source in chicken diets on the lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance of fresh and refrigerated dark chicken meat, in comparison to the effects of using crude palm oil (PO) and refined olive pomace oil (ROPO). This work complements the results obtained by Verge-Mérida et al. [5] within the same study on growth and digestibility parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Fat Sources

Three experimental fat sources were used: OPAO, provided by RIOSA (Refinación Industrial Oleícola S.A., Ibros, Spain); and PO and ROPO, provided by bonÀrea Agrupa (Guissona, Spain). The MIU value (sum of moisture and volatile matter (M), impurities (I)

and unsaponifiable (U) fractions), the FA profile, the tocopherol (T) and tocotrienol (T3) contents, the lipid class composition, the acid value and the peroxide value of these fat sources were determined in triplicate as described in Varona et al. [9] (Table 1). In this study, ROPO was chosen as a control fat due to its similar FA profile to OPAO but with a much lower FFA content and MIU value, whereas PO was selected because of its common usage in broiler diets.

Table 1. Characterization of the experimental fat sources.

	PO ¹	ROPO ¹	OPAO ¹
MIU (g/100 g)			
Moisture ²	ND	ND	0.73 ± 0.01
Impurities	0.49 ± 0.03	0.28 ± 0.09	1.37 ± 0.21
Unsaponifiable	0.22 ± 0.11	1.44 ± 0.47	4.53 ± 0.30
Total	0.71 ± 0.12	1.72 ± 0.48	6.63 ± 0.37
FAs (%) ³			
C16:0	42.5 ± 0.05	12.7 ± 0.01	12.4 ± 0.14
C18:0	4.5 ± 0.01	2.7 ± 0.01	2.7 ± 0.89
SFAs	48.5 ± 0.03	16.2 ± 0.01	16.6 ± 0.74
C16:1 n-7	0.2 ± 0.01	0.9 ± 0.01	1.0 ± 0.01
C18:1 n-9	40.6 ± 0.05	70.0 ± 0.01	63.2 ± 0.61
C18:1 n-7	0.6 ± 0.01	1.6 ± 0.01	1.7 ± 0.01
MUFAs	41.6 ± 0.05	72.9 ± 0.02	66.2 ± 0.63
C18:2 n-6	9.5 ± 0.01	10.1 ± 0.02	15.8 ± 0.12
C18:3 n-3	0.3 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.9 ± 0.01
PUFAs	9.8 ± 0.01	10.8 ± 0.02	16.7 ± 0.13
Ts and T3s (mg/kg)			
α-T	178.40 ± 6.40	545.81 ± 4.28	266.16 ± 12.34
γ-T	2.29 ± 0.59	6.19 ± 0.49	15.25 ± 0.41
α-T3	215.24 ± 8.38	2.33 ± 1.08	2.08 ± 0.08
γ-T3	220.45 ± 2.95	ND	6.12 ± 0.73
T + T3	669.15 ± 16.63	579.68 ± 6.31	309.99 ± 12.47
Lipid classes (%) ⁴			
TAGs	88.0 ± 0.24	91.1 ± 0.09	24.5 ± 1.27
DAGs	8.7 ± 0.12	8.4 ± 0.14	18.6 ± 1.34
MAGs	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.01	2.3 ± 0.15
FFAs	3.31 ± 0.15	0.2 ± 0.04	54.6 ± 2.46
Acid value (mg KOH/g)	10.4 ± 0.07	0.3 ± 0.04	110.7 ± 0.26
Peroxide value (meq O ₂ /kg)	3.8 ± 0.01	8.3 ± 0.11	7.0 ± 0.19

Abbreviations: PO, crude palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; MIU, moisture and volatile matter + insoluble impurities + unsaponifiable matter; FAs, fatty acids; SFAs, saturated fatty acids (sum of C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, and C24:0; see Table S1 in Supplementary Materials); MUFAs, monounsaturated fatty acids (sum of C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, and C20:1 n-9; see Table S1); PUFAs, polyunsaturated fatty acids (sum of C18:2 n-6, and C18:3 n-3); Ts, tocopherols; T3s, tocotrienols; T + T3, total tocol content (sum of α-T, β-T, γ-T, δ-T, α-T3, β-T3, γ-T3, and δ-T3); TAGs, triacylglycerols; DAGs, diacylglycerols; MAGs, monoacylglycerols; FFAs, free fatty acids; ND, not detected. ¹ Data were expressed as mean ± standard deviation of three determinations. ² It included moisture and other compounds that volatilize under the determination conditions. ³ The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. See Table S1 for the complete FA composition, including minor FA results. ⁴ The percentage of each lipid class was obtained by peak area normalization.

2.2. Animals and Diets

Chicken housing and husbandry were carried out at the animal experimental facilities of bonÀrea Agrupa (Nial farm, Guissona, Spain). All the procedures were performed according to the directive 2010/63/EU [10], and all management practices and procedures were approved by the Animal Ethics Committee (CEEAH) of the Universitat Autònoma de Barcelona (code number: 10167). A total of 3048 one-day-old newly hatched broiler chickens (Ross 308) were distributed into 24-floor pens (127 animals per pen), balanced by body weight (average of 40.83 ± 0.26 g). During the trial, the temperature and the relative humidity of the pens were controlled (average of 24.5 ± 1.7 °C and $73.5 \pm 6.8\%$, respectively), and the animals had ad libitum access to feed and water.

The animals were fed with experimental diets (PO, ROPO, or OPAO diets) that consisted of a grower basal diet (from day 22 to day 29) or a finisher basal diet (from day 30 to day 39), supplemented with a 6% of one of the three fat sources of interest (PO, ROPO, or OPAO). The ingredient composition of grower and finisher diets is shown in Table 2. All diets were formulated to cover or exceed the nutritional requirements [11]. Diets were randomly assigned among the 24 pens, counting a total of 8 pens per diet.

Table 2. Ingredients, proximate composition, and gross energy of the grower and finisher experimental diets.

	Grower Diets ¹	Finisher Diets ¹
Ingredients (%)		
Corn	35.01	33.94
Wheat	10.85	15.01
Sorghum	10.00	10.00
Sunflower meal	10.00	10.00
Soybean meal 47%	23.79	19.74
Experimental fat ²	6.00	6.00
Calcium carbonate	0.69	1.02
Dicalcium phosphate	0.98	0.73
Sodium chloride	0.29	0.28
Silicate	-	1.00
Vitamin and mineral premix ³	0.67	0.67
DL-Methionine ⁴	0.28	0.24
L-Lysine ⁵	0.46	0.45
L-Threonine	0.09	0.08
L-Valine	0.01	0.01
Marigold flower extract ⁶	0.10	0.10
Canthaxanthin powder ⁷	0.05	0.05
Coccidiostat agent ⁸	0.60	0.60
Choline ⁹	0.04	0.03
Sodium hydrogencarbonate	0.07	0.07
Proximate composition (%) ¹⁰		
Dry matter	89.44	89.93
Crude protein	19.26	18.39
Ether extract	7.65	7.95
Crude fiber	4.64	4.70
Ash	5.34	5.66
Gross energy (kcal/kg)	4225.7	4226.0

¹ Grower diets were used from 22 to 29 days and finisher diets from 30 to 39 days. ² Crude palm oil (PO), refined olive pomace oil (ROPO), or olive pomace acid oil (OPAO). ³ Provides, per kg of feed: vitamin A, 1000 IU; vitamin D, 4700 IU; vitamin E, 100 mg (α -tocopheryl acetate); vitamin K, 4 mg; vitamin B1, 4 mg; vitamin B2, 8 mg; vitamin B6, 5 mg; vitamin B12, 0.02 mg; biotin, 0.3 mg; Cu, 13.1

mg (CuSO₄); I, 1.3 mg (KI); Mn, 122 mg (MnO₂); Se, 0.3 mg (Na₂SeO₃); Zn, 68 mg (ZnO); Fe, 142 mg (FeSO₄); phytase, 1500 FYT; endo-β-1,4-xylanase, 24,000 BXU. ⁴ DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMTBa), the hydroxy analog of DL-methionine. ⁵ L-Lysine sulfate. ⁶ Contains a minimum of 40 g of carotenoids/kg, of which a minimum of 32 g/kg is *trans*-lutein, and 2 g/kg is *trans*-zeaxanthin. ⁷ Contains 10 g of canthaxanthin/kg. ⁸ Narasin at 10%. ⁹ Choline chloride 75% (*w/w*) aqueous solution. ¹⁰ Mean of values obtained for the three grower diets (PO, ROPO, and OPAO) and the three finisher diets (PO, ROPO, and OPAO), expressed on a fresh matter basis.

Feed samples were collected and stored at −20 °C until analysis. The FA composition, T and T3 content, and the lipid fractions of feeds (Table 3) were determined following the methods described in the Supplementary Materials.

Table 3. Fatty acid, tocopherol and tocotrienol, and lipid class compositions of the grower and finisher experimental diets.

	Grower Diets			Finisher Diets		
	PO ¹	ROPO ¹	OPAO ¹	PO ¹	ROPO ¹	OPAO ¹
	FAs (%) ²					
C16:0	31.7 ± 0.04	13.0 ± 0.04	14.9 ± 0.02	32.6 ± 0.20	13.6 ± 0.01	16.5 ± 0.65
C18:0	3.8 ± 0.01	2.7 ± 0.01	3.2 ± 0.01	3.8 ± 0.07	2.9 ± 0.01	3.2 ± 0.07
SFAs	37.6 ± 0.05	16.9 ± 0.05	19.7 ± 0.02	38.3 ± 0.12	17.6 ± 0.01	21.2 ± 0.81
C18:1 n-9	35.5 ± 0.04	54.7 ± 0.08	46.7 ± 0.11	35.9 ± 0.33	55.0 ± 0.01	47.8 ± 1.41
C18:1 n-7	1.1 ± 0.01	1.9 ± 0.03	1.7 ± 0.06	1.1 ± 0.02	1.8 ± 0.11	1.6 ± 0.08
MUFAs	36.9 ± 0.05	57.5 ± 0.04	49.3 ± 0.05	37.3 ± 0.32	57.3 ± 0.11	50.2 ± 1.51
C18:2 n-6	24.6 ± 0.02	24.4 ± 0.06	29.6 ± 0.03	23.6 ± 0.19	24.0 ± 0.10	27.3 ± 0.69
C18:3 n-3	0.9 ± 0.02	1.1 ± 0.02	1.3 ± 0.01	0.8 ± 0.01	1.0 ± 0.01	1.1 ± 0.01
PUFAs	25.5 ± 0.01	25.5 ± 0.09	30.8 ± 0.01	24.4 ± 0.20	25.0 ± 0.11	28.4 ± 0.70
	Ts and T3s (mg/kg)					
α-T	99.46 ± 1.65	108.67 ± 2.65	96.09 ± 0.69	105.09 ± 1.00	102.64 ± 0.98	97.7 ± 1.14
γ-T	13.68 ± 0.03	13.12 ± 0.25	13.37 ± 0.02	17.63 ± 0.40	16.39 ± 1.52	17.46 ± 0.62
α-T3	13.98 ± 0.18	5.52 ± 0.11	5.87 ± 0.02	14.47 ± 0.37	3.48 ± 0.48	5.75 ± 0.414
γ-T3	18.35 ± 0.30	4.80 ± 0.06	6.11 ± 0.43	21.23 ± 0.32	3.52 ± 1.26	2.60 ± 0.41
T + T3	152.52 ± 2.22	138.36 ± 2.95	128.28 ± 0.28	168.06 ± 3.82	133.04 ± 4.65	130.93 ± 2.09
	Lipid classes (%) ³					
TAGs	82.5 ± 0.21	84.1 ± 0.04	54.8 ± 0.20	84.2 ± 0.16	85.0 ± 0.16	56.4 ± 0.10
DAGs	8.8 ± 0.22	9.2 ± 0.03	13.2 ± 0.32	8.3 ± 0.25	8.8 ± 0.14	12.7 ± 0.28
MAGs	0.4 ± 0.03	0.6 ± 0.02	1.3 ± 0.06	0.5 ± 0.01	0.6 ± 0.13	1.1 ± 0.01
FFAs	8.2 ± 0.45	6.1 ± 0.06	30.7 ± 0.47	7.1 ± 0.08	5.6 ± 0.18	29.8 ± 0.17

Abbreviations: PO, crude palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; FAs, fatty acids; SFAs, saturated fatty acids (sum of C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, and C24:0; see Table S2 in Supplementary Materials); MUFAs, monounsaturated fatty acids (sum of C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, and C20:1 n-9; see Table S2); PUFAs, polyunsaturated fatty acids (sum of C18:2 n-6, and C18:3 n-3); Ts, tocopherols; T3s, tocotrienols; T + T3, total tocol (sum of α-T, β-T, γ-T, δ-T, α-T3, β-T3, γ-T3, and δ-T3); TAGs, triacylglycerols; DAGs, diacylglycerols; MAGs, monoacylglycerols; FFAs, free fatty acids. ¹ Data were expressed as mean ± standard deviation of two determinations. ² The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. See Table S2 for the complete FA composition, including minor FA results. ³ The percentage of each lipid class was obtained by peak area normalization.

The effects of these diets on animal performance parameters have been published by Verge-Mèrida et al. [5], and no effect was observed on broiler body weight at 39 days of age.

2.3. Sampling of Dark Chicken Meat

After 17 days of feeding the experimental diets, broilers were fasted for 4 h and slaughtered following the habitual commercial procedure at the slaughterhouse of bonArea Agrupa (Guissona, Spain). To perform the sampling, each pen was considered as an experimental unit (24 experimental units = 3 diets × 8 pens per diet), and four female chickens from each pen were chosen. From each animal, deboned legs (thigh plus drumstick) with skin were taken as samples. One deboned leg per animal was used for the fresh dark meat study, and the other one for the refrigerated dark meat study. Thus, for each experimental unit, 4 legs were placed in a PET/PE tray for the fresh sample study, and the other 4 legs were placed in a different PET/PE tray for the refrigerated sample study. The trays were sealed with a PA/EVOH/PE film and kept under commercial conditions (O₂/CO₂; 70/30; 3–4 °C) until the following morning (fresh chicken meat) or for 7 days (refrigerated chicken meat).

For the fresh chicken meat study, the morning after the slaughter, the 4 legs of each tray were cut, pooled, and ground, and color determination was performed. Part of the ground sample was immediately vacuum-packed in various high-barrier multilayer bags (Cryovac BB3255; permeability to O₂, 17 cm³/m² per day per bar at 23 °C and 0% relative humidity, ASTMD-3985; Cryovac Europe, Sealed Air S. L., Sant Boi de Llobregat, Spain) and kept at −20 °C until the chemical parameters were determined (fresh dark meat with skin). The ground sample remains from the experimental units from the same diet (PO, OPO, or OPAO diet) were pooled and immediately used to prepare cooked burgers for the sensory acceptance test. Preparation of all fresh samples, including color determination and sensory acceptance testing, was carried out in one morning.

For the refrigerated storage study, the sampling process and color and sensory analysis were performed identically after 7 days of refrigeration.

2.4. Determination of Fatty Acid Composition

The FA composition was determined only in fresh dark chicken meat. The lipid fraction from 1 g of the sample was extracted with chloroform/methanol (2:1, *v/v*) [12]. The fatty acid methyl esters were obtained and determined by GC-FID, as described in Varona et al. [9]. Each FA was expressed in percentage after peak area normalization. The FA determination is described in more detail in Supplementary Materials.

2.5. Determination of Tocopherol and Tocotrienol Content

The fresh and refrigerated dark chicken meat was saponified, and the unsaponifiable compounds were extracted as described by Bou et al. [12], redissolving the final extract with an exact volume of n-hexane. Then, the content of Ts and T3s was determined by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD) under the chromatographic conditions described by Aleman et al. [13]. More details on the procedure can be found in Supplementary Materials.

2.6. Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay

The ferrous oxidation orange xylenol (FOX) assay was carried out in fresh and refrigerated samples of dark chicken meat to evaluate the primary oxidation and oxidative stability [14]. After a methanolic extraction of lipid hydroperoxides (LHPs), the colorimetric reaction was performed as detailed by Tres et al. [15], but with 940 µL of methanol and 160 µL of sample extract for fresh samples, and with 950 µL of methanol and 150 µL of sample extract for refrigerated samples. Absorbance at 560 nm after an incubation of 30 min evaluated the LHPs present in the sample (named LHP content). After 96 h of incubation (when the absorbance was stable), the measurements revealed the amount of LHPs formed depending on meat susceptibility to oxidation (named final LHP value). A calibration curve with cumene hydroperoxide (CHP) standard was used to quantify the LHP

concentrations (expressed as mmol of CHP equivalents/kg of the sample). More details on the procedure can be found in Supplementary Materials.

2.7. Determination of 2-Thiobarbituric Acid Value

The 2-thiobarbituric acid (TBA) value was measured for fresh and refrigerated samples of chicken meat as a secondary oxidation parameter. The determination was carried through third derivate spectrophotometry as described by Grau et al. [16], and the TBA value was expressed as malondialdehyde (MDA) concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [17]. For more detail, see Supplementary Materials.

2.8. Determination of Volatile Compound Content

The volatile compound content was analyzed in fresh and refrigerated dark chicken meat, according to Albendea et al. [8], by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). The quantification was performed in selected ion mode [8], and results were expressed as μg of 4-methyl-2-pentanol equivalents/kg of sample. For more detail, see Supplementary Materials.

2.9. Color Determination

Immediately after grinding the samples, the color of fresh and refrigerated dark chicken meat with skin was determined according to CIE $L^*a^*b^*$ color space [8].

To estimate if the differences in color parameters due to the refrigeration or the diet might be perceptible by the human eye, two dimensionless parameters ΔE were calculated:

- ΔE_R : was calculated with Equation (1) to study the differences between the color of fresh and refrigerated chicken meat coming from each diet.

$$\Delta E_R = \sqrt{(L_{0d}^* - L_{7d}^*)^2 + (a_{0d}^* - a_{7d}^*)^2 + (b_{0d}^* - b_{7d}^*)^2}, \quad (1)$$

In Equation (1), L_{0d}^* , a_{0d}^* and b_{0d}^* were the L^* , a^* or b^* means of fresh chicken meat from one of the diets ($n = 8$) and L_{7d}^* , a_{7d}^* and b_{7d}^* were the L^* , a^* or b^* means of the refrigerated chicken meat from the same diet ($n = 8$).

- ΔE_D : was obtained with Equation (2) to evaluate the differences between the color of refrigerated chicken meat coming from the diet with the edible oil refining by-product (OPAO) and refrigerated chicken meat from the other diets (ROPO or PO diets).

$$\Delta E_D = \sqrt{(L_{OPAO}^* - L_D^*)^2 + (a_{OPAO}^* - a_D^*)^2 + (b_{OPAO}^* - b_D^*)^2}, \quad (2)$$

In Equation (2), L_{OPAO}^* , a_{OPAO}^* and b_{OPAO}^* were the L^* , a^* or b^* means of refrigerated chicken meat from the OPAO diet ($n = 8$) and L_D^* , a_D^* and b_D^* were the L^* , a^* or b^* means of refrigerated chicken meat from ROPO or PO experimental diets ($n = 8$).

2.10. Sensory Acceptance Test

Two tests were carried out (one for fresh meat and the other one for refrigerated meat) to determine the overall acceptance of chicken meat, using a nine-point hedonic scale (1, “dislike extremely”; 5, “neither like nor dislike”; 9, “like extremely”). Hamburgers with 30 g of ground dark chicken meat with skin were prepared and cooked for 3.5 min, using a different machine for each diet. In each test, a total of 36 habitual consumers of chicken meat participated, each of whom evaluated one hamburger per dietary treatment.

2.11. Statistical Analysis

Multifactor ANOVA was carried out to evaluate the impact of the refrigeration time (0 and 7 days) and its interaction with the experimental diets (PO, ROPO, and OPAO) on the different parameters studied on fresh and refrigerated chicken meat. One-way ANOVA was performed to study the influence of the diets (PO, ROPO, and OPAO) on the

FA profile of chicken meat (only for fresh samples); and on T and T3 composition, oxidation stability, TBA values, color, and sensory acceptance of fresh chicken meat or of refrigerated chicken meat. The differences among diets in fresh or refrigerated chicken meat were tested for multiple comparisons with Scheffé's post hoc test. In all cases, differences were considered significant when $p < 0.05$. Statistic tests were carried out using the general linear model procedure of SPSS (27.0 version, IBM Statistics Inc. (Chicago, IL, USA)).

3. Results

3.1. Fatty Acid Profile of Dark Chicken Meat

The FA composition of fresh chicken meat from animals fed with three experimental diets is shown in Table 4 (see Table S3 in Supplementary Materials for a more detailed FA composition).

Table 4. Fatty acid profile (%) of fresh dark chicken meat with skin coming from the three experimental diets.

FAs	PO ¹	ROPO ¹	OPAO ¹	SEM	<i>p</i> ²
C16:0	26.0 ^a	20.7 ^b	21.4 ^b	0.243	<0.001
C18:0	5.6	5.3	5.5	0.110	0.273
SFAs	32.7 ^a	26.8 ^b	27.7 ^b	0.311	<0.001
C16:1 n-9	0.4 ^b	0.5 ^a	0.5 ^a	0.014	<0.001
C16:1 n-7	3.8	3.4	3.5	0.120	0.097
C18:1 n-9	39.1 ^b	44.8 ^a	42.6 ^a	0.592	<0.001
C18:1 n-7	2.0 ^b	2.4 ^a	2.3 ^a	0.041	<0.001
MUFAs	45.7 ^b	51.6 ^a	49.4 ^a	0.640	<0.001
C18:2 n-6	19.1	19.0	20.1	0.332	0.046
C20:4 n-6	0.7	0.7	0.8	0.027	0.170
n-6 PUFAs	20.5	20.4	21.6	0.364	0.048
C18:3 n-3	0.9 ^c	1.0 ^b	1.1 ^a	0.013	<0.001
n-3 PUFAs	0.9 ^b	1.1 ^a	1.1 ^a	0.014	<0.001
Total PUFAs	21.5	21.4	22.7	0.375	0.039

Abbreviations: PO, crude palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; FAs, fatty acids; SFAs, saturated fatty acids (sum of C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, and C18:0; see Table S3 in Supplementary Materials); MUFAs, monounsaturated fatty acids (sum of C14:1, C16:1 n-9, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, and C20:1 n-9; see Table S3); PUFAs, polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFAs: sum of C18:2 n-6, C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, and C20:4 n-6; n-3 PUFAs sum of C18:3 n-3, C20:5 n-3, and C22:6 n-3; Total PUFAs: sum of n-3 PUFAs and n-6 PUFAs; see Table S3); SEM, standard error of the mean. ¹ Least-squares means of the different experimental units from each dietary treatment (n = 8). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. See Table S3 for the complete FA composition, including minor FA results. ² *p* values obtained by ANOVA (n = 24). Values in bold were significant ($p < 0.05$). Differences between diets found with Scheffé's post hoc test were noted in the same row as a > b > c. For C18:2 n-6, n-6 PUFAs, and total PUFAs, Scheffé's post hoc test could not differentiate the least-squares means of the dietary treatments.

Compared with PO dark chicken meat, meat from ROPO and OPAO diets was richer in MUFAs ($p < 0.001$), particularly in oleic acid. The latter two meats also showed a lower proportion of palmitic acid and, consequently, of SFAs ($p < 0.001$). Regarding the PUFA fraction, there were differences in the percentages of linoleic acid ($p = 0.046$), n-6 PUFAs ($p = 0.047$), and total PUFAs ($p = 0.039$), but Scheffé's post hoc test could not separate the means of the different diets. The highest linolenic acid and n-3 PUFA proportions were observed in OPAO meat and the lowest in PO meat ($p < 0.001$). Therefore, the use of the OPAO diet led to a FA profile in chicken meat very similar to the use of the ROPO diet.

3.2. Tocopherol and Tocotrienol Composition of Dark Chicken Meat

The T and T3 content found for fresh and refrigerated chicken meat from broiler chickens fed with the three diets of interest is presented in Table 5. Refrigeration only affected the levels of γ -T and α -T3.

Regarding the effect of the diet, fresh and refrigerated chicken meat coming from the PO diet showed higher α -T than OPAO meat ($p = 0.013$) and higher α -T3 levels than ROPO and OPAO meats ($p < 0.001$). The total T + T3 levels in fresh PO meat were higher than those in fresh OPAO meat ($p = 0.007$), whereas the PO diet led to the highest levels in refrigerated chicken meat ($p < 0.001$).

Table 5. Tocopherol and tocotrienol content (mg/kg) of fresh and refrigerated dark chicken meat with skin.

	α -T	γ -T	α -T3	T + T3
Effect of the diet on fresh chicken meat				
PO ¹	11.19 ^a	0.70	0.54 ^a	12.68 ^a
ROPO ¹	10.37 ^{ab}	0.78	0.07 ^b	11.45 ^{ab}
OPAO ¹	9.59 ^b	0.77	0.08 ^b	10.74 ^b
SEM	0.346	0.039	0.023	0.392
p_{diet}^2	0.013	0.319	<0.001	0.007
Effect of the diet on refrigerated chicken meat				
PO ¹	10.89 ^a	0.74 ^b	0.41 ^a	12.59 ^a
ROPO ¹	10.13 ^{ab}	0.86 ^a	0.01 ^b	11.32 ^b
OPAO ¹	9.36 ^b	0.83 ^{ab}	0.03 ^b	10.44 ^b
SEM	0.231	0.029	0.038	0.313
p_{diet}^2	0.001	0.028	<0.001	<0.001
Effect of refrigeration on chicken meat				
Fresh chicken meat ³	10.38	0.75	0.23	11.62
Refrigerated chicken meat ³	10.13	0.81	0.15	11.45
SEM	0.170	0.020	0.018	0.205
$p_{\text{refrigeration}}^4$	0.289	0.041	0.005	0.556
Effect of the interaction between refrigeration and diet				
$p_{\text{refrigeration} \times \text{diet}}^4$	0.992	0.833	0.362	0.951

Abbreviations: PO, crude palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; Ts, tocopherols; T3s, tocotrienols; T + T3, sum of α -T, β -T, γ -T, α -T3, β -T3, and γ -T3; SEM, standard error of the mean. ¹ Least-squares means of the different experimental units for each dietary treatment ($n = 8$). ² p values obtained from ANOVA ($n = 24$) of fresh or refrigerated chicken meat. Values in bold were significant ($p < 0.05$). Differences between diets found in fresh or refrigerated chicken meat with Scheffé's post hoc test ($n = 24$) were noted in the same column as $a > b$. ³ Pooled means (least-squares means) of fresh or refrigerated chicken meat coming from the three dietary treatments ($n = 24$). ⁴ p values obtained for the refrigeration ($p_{\text{refrigeration}}$) and the interaction between the refrigeration time and the diet ($p_{\text{refrigeration} \times \text{diet}}$) from multifactor ANOVA ($n = 48$). Values in bold were significant ($p < 0.05$).

3.3. Lipid Hydroperoxide Content and Oxidative Stability of Dark Chicken Meat

The LHP content of fresh and refrigerated chicken meat was under the quantification limit, and therefore this data is not shown. The oxidative stability of chicken meat was not significantly affected by the refrigerated storage or the type of diet, showing in all cases final LHP values of ≈ 0.20 mmol of CHP/kg of sample.

3.4. 2-Thiobarbituric Acid Value of Dark Chicken Meat

The TBA value of fresh and refrigerated chicken meat depending on the type of fat added to diets, is represented in Figure 1. Refrigeration increased ($p < 0.001$) the TBA value

of chicken meat from 35–40 µg/kg to 79–96 µg/kg, whereas the type of experimental diet had no significant impact on either fresh or refrigerated meat.

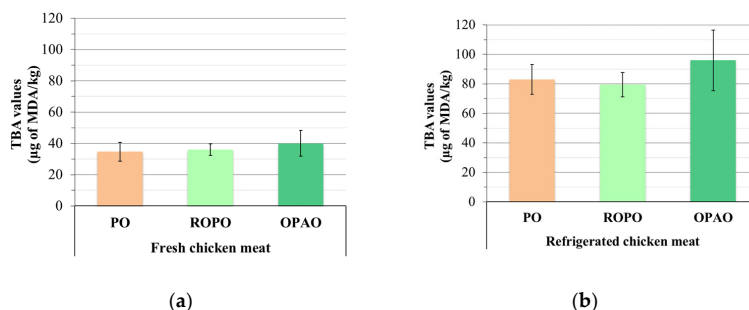


Figure 1. Thiobarbituric acid (TBA) values (µg of malondialdehyde (MDA)/kg) of (a) fresh and (b) refrigerated dark chicken meat with skin coming from the different diets (PO, crude palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil). The results were represented as mean ± standard deviation (n = 8).

3.5. Content of Volatile Compounds in Dark Chicken Meat

A total of eight volatile compounds were identified in fresh and refrigerated chicken meat (Table 6). Three of them were aldehydes (hexanal, 2-hexenal, and nonanal), and the other three were alcohols (1-pentanol, 1-hexanol, and 1-octen-3-ol). The 1-octen-3-one was the only ketone found in chicken meat. The other identified compound was 2-pentylfuran. The refrigerated storage of chicken meat increased the concentrations of hexanal ($p = 0.002$), 2-hexenal ($p = 0.038$), 1-pentanol ($p < 0.001$), 1-hexanol ($p = 0.007$) and 1-octen-3-ol ($p < 0.001$). The content of 1-octen-3-ol increased to a greater extent than the other volatile compounds. There was no effect of the diet on the volatile content of fresh or refrigerated chicken meat.

Table 6. Volatile compounds (µg/kg) of fresh and refrigerated dark chicken meat with skin.

	Hexanal ¹	2-Hexenal ¹	Nonanal ¹	1-Pentanol ¹	1-Hexanol ¹	1-Octen-3-ol ¹	1-Octen-3-one ¹	2-Pentylfuran ¹
Effect of the diet on fresh chicken meat								
PO ²	5.7	4.5	1	1	2.6	11.1	0.8	6.1
ROPO ²	4.2	4.3	0.8	0.9	2.4	9.2	0.7	5.7
OPAO ²	4.6	3.9	0.7	1.1	3.3	14.3	0.7	5.5
SEM	0.782	0.533	0.073	0.116	0.305	1.438	0.068	0.525
p_{diet} ³	0.394	0.698	0.128	0.556	0.124	0.058	0.848	0.695
Effect of the diet on refrigerated chicken meat								
PO ²	10	6.7	0.9	2.7	4	24.5	0.8	5.7
ROPO ²	7.4	5.5	0.6	2.6	3.8	20.4	0.9	5.3
OPAO ²	6.5	4.3	0.5	2.3	3.2	17.8	0.7	4.5
SEM	1.407	0.85	0.168	0.237	0.454	2.965	0.077	0.671
p_{diet} ³	0.206	0.152	0.271	0.558	0.475	0.295	0.147	0.449
Effect of the refrigeration on chicken meat								
Fresh chicken meat ⁴	4.8	4.2	0.8	1	2.8	11.5	0.72	5.74
Refrigerated chicken meat ⁴	8	5.5	0.7	2.5	3.7	20.9	0.79	5.17
SEM	0.657	0.409	0.075	0.108	0.233	1.345	0.042	0.348
$p_{\text{refrigeration}}$ ⁵	0.002	0.038	0.291	<0.001	0.007	<0.001	0.233	0.252
Effect of the interaction between refrigeration and diet								
$p_{\text{refrigeration} \times \text{diet}}$ ⁵	0.575	0.442	0.799	0.399	0.109	0.096	0.314	0.871

Abbreviations: PO, crude palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; SEM, standard error of the mean. ¹ Volatile compound contents were expressed as 4-metil-2-pentanol equivalents. ² Least-squares means of the different experimental units for each dietary treatment (n = 8). ³ p values obtained from ANOVA (n = 24) of fresh or refrigerated chicken meat. Values in bold were significant (p < 0.05). ⁴ Pooled means (least-squares means) of fresh or refrigerated chicken meat coming from the three dietary treatments (n = 24). ⁵ p values obtained for the refrigeration (p_{refrigeration}) and the interaction between the refrigeration time and the diet (p_{refrigeration × diet}) from multifactor ANOVA (n = 48). Values in bold were significant (p < 0.05).

3.6. Color of Dark Chicken Meat

The values obtained for the three instrumental parameters of color (L*, a*, and b*) and for the two calculated ΔE parameters (ΔE_R and ΔE_D) are presented in Table 7. There was a significant (p = 0.040) interaction between the refrigeration and the diet for meat yellowness (b*). Refrigeration increased meat yellowness for all diets (p < 0.001), but this increment was higher for ROPO chicken meat. Refrigeration also raised meat redness (p < 0.001). After refrigeration, there was an effect of the diet on meat lightness (p = 0.012), as ROPO refrigerated meat showed a higher lightness in comparison to PO refrigerated meat. Nevertheless, according to the dimensionless parameter ΔE_R, overall, the color changes in chicken meat due to the refrigerated storage were similar for all the diets, finding values from 2.23 (PO meat) to 2.94 (ROPO meat). The ΔE_D obtained for refrigerated chicken meat showed that the color of OPAO meat was more similar to that of PO meat than to the color of ROPO meat.

Table 7. Color parameters (L*, a*, b* instrumental parameters, ΔE_R, and ΔE_D) and overall consumer acceptance of fresh and refrigerated dark chicken meat with skin.

	Color Parameters				Overall Acceptance	
	L*	a*	b*	ΔE _R ¹ (Fresh vs. Refrigerated)	ΔE _D ¹ (OPAO vs. Other Diets)	Sensory Scores
Effect of the diet on fresh chicken meat						
PO ²	64.97	15.33	23.10	2.23	NC	5.94
ROPO ²	65.15	14.46	23.18	2.94	NC	6.44
OPAO ²	65.77	14.18	22.56	2.63		6.59
SEM	0.475	0.386	0.26			0.318
p ^{diet} ³	0.466	0.115	0.215			0.318
Effect of the diet on refrigerated chicken meat						
PO ²	65.08 ^b	17.53	23.60 ^b		1.28	6.66
ROPO ²	66.67 ^a	16.35	24.88 ^a		1.72	6.53
OPAO ²	66.01 ^{ab}	16.69	23.31 ^b			6.56
SEM	0.343	0.332	0.22			0.244
p ^{diet} ³	0.012	0.057	<0.001			0.931
Effect of the refrigeration on chicken meat						
Fresh chicken meat ⁴	65.3	14.66	22.95			6.32
Refrigerated chicken meat ⁴	65.92	16.86	23.93			6.58
SEM	0.239	0.208	0.139			0.164
p ^{refrigeration} ⁵	0.071	<0.001	<0.001			0.262
Effect of the interaction between refrigeration and diet on chicken meat						
p ^{refrigeration × diet} ⁵	0.181	0.697	0.04			0.368

Abbreviations: PO, crude palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; SEM, standard error of the mean; L*, lightness; a*, redness; b*, yellowness; NC, not calculated as there were no significant differences between diets. ¹ ΔE_R values were calculated by Equation (1) and ΔE_D values were calculated by Equation (2). ² Least-squares means of the different experimental units for each dietary treatment (n = 8 for color parameters and n = 36 for sensory scores). ³ p values

obtained from ANOVA ($n = 24$ for color parameters and $n = 108$ for sensory scores) of fresh or refrigerated chicken meat. Values in bold were significant ($p < 0.05$). Differences between diets found with Scheffé's post hoc test were noted in the same row as a > b. ⁴ Pooled means (least-squares means) of fresh or refrigerated chicken meat coming from the three dietary treatments ($n = 24$ for color parameters and $n = 108$ for sensory scores). ⁵ p values obtained for the refrigeration ($p_{\text{refrigeration}}$) and the interaction between the refrigeration time and the diet ($p_{\text{refrigeration} \times \text{diet}}$) obtained from multi-factor ANOVA ($n = 48$ for color parameters and $n = 216$ for sensory scores). Values in bold were significant ($p < 0.05$).

3.7. Sensory Acceptance of Dark Chicken Meat

The sensory scores obtained for fresh and refrigerated chicken meat coming from the experimental diets are presented in Table 7. The sensory acceptance of chicken meat was not significantly affected by the refrigerated storage or the diet.

4. Discussion

4.1. Composition of Fat Sources and Diets

The three experimental fat sources used in this study presented differences in their MIU fraction, FA profile, T and T3 content, and lipid classes (Table 1). As reported by Varona et al. [4], the composition of some refining by-products, such as AOs, can be highly variable. In this study, OPAO showed the highest MIU value, as it had the highest M, I, and U contents. The MIU value of a fat represents a fraction of compounds that can dilute the energy provided by the fat. Thus, the energy dilution related to the MIU value was much higher in OPAO than in PO and ROPO. However, when OPAO was compared with olive AOs from the Spanish market, its MIU value (6.6 g/100 g) was close to the median value reported by Varona et al. [4] (7.6 g/100 g). Its FFA percentage (54.6%) and acid value (110.7 mg KOH/g) were the highest of the three fat sources, but they were in agreement with the range commonly observed for olive AOs (38.1–65.3% and 81.8–138.9 mg KOH/g, respectively) [4]. The peroxide value (7.0 meq O₂/kg) showed by OPAO was lower than the value observed for ROPO (8.3 meq O₂/kg), but it was higher than the median value obtained by Varona et al. [4] for similar AOs (1.3 meq O₂/kg). However, all the fat sources used in this study met the peroxide value recommendations (<10 meq O₂/kg) published in the national framework for fats with animal nutrition purposes [18].

Regarding the other compositional parameters, both the FA profile and the T and T3 composition of the three fat sources reflected their botanical origin. For instance, PO showed the highest SFA content and total T + T3 levels, being rich in T3s. With respect to OPAO, it showed similarities with ROPO, as both were rich in oleic acid, and their main tocol was α -T, which was in agreement with previous studies [4,19]. Despite these similarities between OPAO and ROPO due to the same botanical origin, the α -T content and total T + T3 level were lower in OPAO than in ROPO. Nevertheless, OPAO showed the highest U proportion (also compared to ROPO), which might indicate a higher content of some potentially bioactive compounds included in this fraction, such as squalene, some sterols or pigments, which are characteristic of olive pomace [3]. Overall, it can be assumed that the quality of the OPAO used in this study was similar to that of other AOs of olive origin in the Spanish market.

The FA composition of the diets was mainly influenced by the added fat source since it was added at 6%, and the total fat content of the diets was \approx 8% (ether extract in Table 2). For instance, ROPO and OPAO diets had a similar FA profile and T and T3 composition. The other \approx 2% of the total fat content of the diet came from the rest of the ingredients, mainly cereals. This explained the greater γ -T levels and PUFA proportions observed in the diets (Table 3) compared with the fat sources (Table 1), as some cereals are rich in Ts and T3s, especially in γ -T [20], and in linoleic acid [21,22]. However, the main contribution to the α -T and the total T + T3 levels in the diets was due to the premix, as it provided 100 mg of α -tocopheryl acetate/kg. Consequently, α -T was the main tocol in all diets, and the

differences in the T + T3 levels observed between diets (Table 3) were attenuated in comparison to the differences found between the three fat sources (Table 1). Regarding the lipid class composition of the diets, the lipids provided by the rest of the ingredients were mainly TAGs, which caused the dilution of the FFAs provided by the OPAO (54.6%) in OPAO diets (29.8–30.7%).

4.2. Lipid Composition of Dark Chicken Meat

In this study, the FA composition of the diets was clearly mirrored by the FA profile of chicken meat. The fact that the FA profile of meat coming from monogastric animals can be easily modified with the diet has been widely reported in the literature [23–26]. In the present work, the main FA observed in dark chicken meat was oleic acid, and most of the FAs were MUFAs, even when the PO diet was used. This was consistent with Zaki et al. [27], who reported that chicken fed a diet containing 5% of PO produced thigh chicken meat with a higher proportion of MUFAs (40%) than SFAs (31%), with oleic acid being the main FA (33%). The use of OPAO in diets resulted in a FA composition of meat similar to the use of ROPO, with a higher MUFA content and a lower SFA content than when PO was used ($p < 0.001$). These results were in agreement with Crespo and Esteve-Garcia [28], as these authors also observed significantly higher MUFA ($\approx 50\%$) and lower SFA ($\approx 28\%$) proportions in thigh chicken meat when a 10% of olive oil was added to the diet than when a 10% of tallow was used ($\approx 34\%$ of SFAs; $\approx 41\%$ MUFAs).

The differences in T and T3 concentrations found in fresh and refrigerated chicken meat (Table 5) reflected the different T and T3 levels observed in the finisher diets (Table 3). Even if in diets, the α -tocopheryl acetate supplementation attenuated the differences observed between fat sources (Table 1), the effect of the added fat source was still evident in meat, as OPAO meats showed a lower α -T content than PO meats (Table 5). Similarly, O'Neill et al. [29] also found differences in α -T concentrations in thigh meat from chickens fed with different fat sources (6% of olive oil or 6% of tallow), despite the fact that diets were supplemented with 200 mg/kg of α -tocopheryl acetate. The effect of the fat source was also noticeable in meat α -T3 content, as it was greater ($p < 0.001$) in PO meat. Thus, even if T3 uptake is not as efficient as that of α -T, dietary differences influenced meat T3 levels. This implication was also observed by Kang et al. [30], who found an increase in T3 levels (from 0.3 to 0.4 mg/kg) for hen white meat when the PO percentage added to the diet was raised from 1.5% to 3.5%.

4.3. Lipid Oxidation of Dark Chicken Meat

Despite primary oxidation (LHP content) being very low in fresh and refrigerated meat, secondary oxidation increased during the refrigerated storage under commercial conditions. According to the results of volatile compound composition and TBA value, the use of OPAO in chicken diets led to oxidation levels of fresh and refrigerated meat that were similar to those obtained with the use of ROPO or PO. Volatile compounds are responsible for the characteristic aroma and flavor of meat, but they can also cause a loss of its sensorial attributes. These compounds can be produced in meat by different pathways, such as lipid oxidation, amino acid degradation, or microbial action. For example, some authors have linked the formation of 1-octen-3-ol in chicken meat, which was the main volatile compound found in the present study, to the oxidation of linoleic acid or other PUFAs [31,32]. However, other authors related the formation of this alcohol to the presence of some bacteria [33,34]. Regarding the other aldehydes found in this study, hexanal might have been produced mainly due to the oxidation of linoleic and arachidonic acids, 2-hexenal due to linolenic acid oxidation, and nonanal due to n-9 MUFA oxidation [31,35]. The alcohols 1-pentanol and 1-hexanol, as well as 1-octen-3-one and 2-pentylfuran (Table 6), have also been associated with linoleic acid oxidation [31,36,37]. Therefore, all the volatile compounds identified in dark chicken meat in this study could mainly originate from lipid oxidation. Consequently, the increase in the content of hexanal, 2-hexenal, 1-penta-

anol, and, to a greater extent, 1-octen-3-ol with the refrigerated storage (Table 6) was consistent with the increase in the secondary oxidation products revealed by the TBA values (Figure 1). In the present study, the TBA values observed for fresh dark chicken meat with skin (35–40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were similar to the ones found by Botsoglou et al. [38] for dark chicken meat without skin ($\approx 40 \mu\text{g}/\text{kg}$). However, in refrigerated meat, the values (79–96 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were lower than those observed by these authors in meat from the control diet after 6 days of storage wrapped in oxygen-permeable PVC stretch wrap at 4 °C ($\approx 200 \mu\text{g}/\text{kg}$). There are several reasons that may explain these differences, such as the more unsaturated diet (6% of soybean oil) used by these authors and the lower amount of α -tocopheryl acetate added to the control diet (30 mg/kg) compared to ours (100 mg/kg). In fact, the α -T levels that they achieved in fresh meat (3.5 mg/kg) were lower than those in our study (on average, 10.4 mg/kg). Moreover, the importance of using a properly modified atmosphere to prevent lipid oxidation in chicken meat has been previously reported by several authors [39–41].

Although the type of added fat (PO, ROPO, or OPAO) resulted in a different FA profile and total T + T3 levels in meat, it did not affect the oxidative parameters (LHP content and formation, TBA values, and volatile compound levels) neither in fresh nor in refrigerated meat. This outcome is in agreement with the results obtained by Narciso-Gaytán et al. [42], who reported similar TBA values for cooked chicken thighs coming from diets with 5% of a commercial blend of an animal–vegetable fat source, palm kernel oil, or soybean oil, all supplemented with 33 mg/kg of α -tocopheryl acetate. Oppositely, Grau et al. [43] found higher TBA values in fresh dark chicken meat with 46% of PUFAs than in meat with 18% of PUFAs that came from diets with 6% of linseed oil or 6% of beef tallow respectively. It is well known that the FA type with the highest tendency to suffer lipid oxidation are PUFAs, and this explains the differences in TBA values observed by Grau et al. [43]. In our study, the differences between the total PUFA proportions in chicken meat coming from the different diets (PO, ROPO, or OPAO) were minimal, as Scheffé's post hoc test did not find differences between the diets used (21–23%). This contributes to explaining the similar behavior of chicken meat from the different diets in terms of lipid oxidation. Regarding the relation between lipid oxidation and α -T content, Lauridsen et al. [44] found lower TBA values in chicken thighs from a 10% olive oil diet than from a 10% tallow diet due to the higher α -T level provided by olive oil to the diet (57 mg/kg of α -T in the diet) compared with tallow (34 mg/kg of α -T in the diet). In the present study, the slightly lower α -T amount provided by the OPAO diets, even if it was reflected in the α -T levels of chicken meat, did not affect the lipid oxidation parameters.

4.4. Color of Dark Chicken Meat

The first perception of chicken meat quality by consumers is its color, so one important implication of this study is that the use of OPAO did not affect fresh meat color and that, after refrigeration, the color was still similar to the PO diet. The preservation of color during the refrigerated storage is an important goal for the meat industry. The most common effect of refrigeration on the color of chicken meat reported in the literature is its discoloration, which implies a decrease in redness [45,46]. This has been associated with the oxidation of myoglobin, which usually occurs together with lipid oxidation in chicken meat [47]. In the present study, refrigeration increased chicken meat redness (a^*) ($p < 0.001$), showing a trend opposite to that related to the discoloration process. Therefore, color results obtained for chicken meat revealed that the modified atmosphere and the conditions of storage were adequate to avoid meat discoloration. Pogorzelska et al. [48] evaluated meat color differences by applying the National Bureau of Standards Unit (NBS unit) criteria that relate the ΔE parameter with differences between colors detectable by humans (0–0.5 trace; 0.5–1.5 slight; 1.5–3.0 noticeable; 3.0–6.0 appreciable; 6.0–12.0 much; >12.0 very much). According to this, the change in color due to refrigeration would be equally noticeable by the human eye ($\Delta E_R = 2.23$ –2.94) regardless of the diet used.

The color of chicken meat can also be influenced by pigments present in the diet, such as carotenoids, which can come from certain ingredients or from the use of commercial pigments [45]. Some of these liposoluble pigments can be deposited on chicken skin and intramuscular fat, enhancing the yellow color of fresh chicken meat. In this study, no color differences were observed between diets in fresh meat (Table 7), as the pigment contribution of the fat sources to the diets was minimum. This was due to the lower amount of fat source (6%) compared to other ingredients, such as corn, and due to the added commercial pigments (Table 2), and the type of pigments that they supplied. For instance, regarding the fat source, PO contains 500–700 mg/kg of carotenoids, the main ones being α - and β -carotene, which have a low pigmentation capacity [49], whereas oils from olives (ROPO and OPAO) are rich in chlorophyll pigments (generally in the range from 10 to 30 mg/kg) and have low content in carotenoids (usually less than 10 mg/kg, most of which are lutein and β -carotene) [50,51]. On the other hand, corn was one of the main ingredients (34–35%) used to formulate the diets, and it has around 10 mg/kg of lutein and 8 mg/kg of zeaxanthin [52]. Additionally, two different commercial pigments were added to the diets, with one of them being a natural extract of marigold flower (Indukern, El Prat del Llobregat, Spain). This pigment was added at 0.1 g/kg and had a total of 40 g/kg of carotenoids, of which 32 g/kg was lutein, and 2 g/kg was zeaxanthin, both of which provide a yellow color. The other commercial pigment was added at 0.05 g/kg and contained canthaxanthin at 10 g/kg (Industrial Tecnica Pecuaria, S.A., Barcelona, Spain), which intensifies the red color. Unlike fresh meat, diet significantly affected L^* and b^* in refrigerated meat, being higher for ROPO (Table 7). However, following the criteria applied by Pogorzelska et al. [48] to evaluate color differences between meats, the color difference between OPAO and PO refrigerated meats would only be slightly noticeable by the human eye ($AE_D = 1.28$) diets, whereas they would be noticeable between OPAO and ROPO diets ($AE_D = 1.72$).

4.5. Sensory Acceptance of Dark Chicken Meat

The results of this study showed that the use of OPAO at 6% in broiler diets did not affect the sensory acceptance of dark chicken meat, which is coherent with the lack of differences found between diets in the oxidative parameters. Many studies in the literature have focused attention on the relation between TBA values and sensory acceptance since the development of lipid oxidation in meat can cause oxidative rancidity and lead to a loss of meat sensory acceptance. For instance, Gray et al. [53] reported that an untrained taste panel detected off-odors and flavors in cooked meat when TBA values were in the range of 600–2000 $\mu\text{g MDA/kg}$. These authors also revealed that a trained taste panel detected oxidative rancidity when TBA values were between 500 and 1000 $\mu\text{g MDA/kg}$ [53]. In this study, even if the TBA values (Figure 1) and the volatile compound levels (Table 6) significantly increased after the refrigeration, the sensory acceptance was not influenced by refrigeration or the diet used.

5. Conclusions

In conclusion, the addition of 6% of OPAO to broiler diets resulted in meat with a similar FA profile and T and T3 composition to the meat obtained with the use of 6% of ROPO. The use of both fat sources instead of PO led to meat richer in MUFAs and to some changes in the T and T3 profile. Additionally, the LHP content, the oxidative stability, the TBA values, the volatile compound concentrations, and the overall acceptance of fresh or refrigerated chicken meat were not affected by the fat source used in the diet. Moreover, the refrigeration conditions used in this study (O_2/CO_2 ; 70/30; 3–4 °C) were adequate to prevent the loss of redness and overall acceptance of meat from chicken fed either of the three fats (PO, ROPO, or OPAO). Thus, based on these findings, the OPAO used in this study is a suitable fat for broiler feed under the conditions used in this study. However, even if the OPAO used showed the typical quality found in the market, the composition of such by-products can vary significantly, and using them as feed ingredients may result in a varying effect on the quality of animal food products. Additionally, although different

AOs may have a similar composition, the impact of using AOs in animal feed may differ depending on the species and age of the animals. Therefore, further studies are necessary to establish realistic recommendations regarding the composition that OPAO and other AOs should have to be adequate feed fats.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani13081343/s1>, Method for the determination of fatty acid composition of experimental diets; Method for the determination of tocopherol and tocotrienol content of experimental diets; Method for the determination of lipid class composition of experimental diets; Detailed descriptions of the following methods applied to dark chicken meat: determination of the fatty acid composition, determination of the tocopherol and tocotrienol content, ferrous oxidation-xylene orange assay, determination of the 2-thiobarbituric acid value, and determination of the volatile compound content. Table S1. Complete fatty acid profile of the experimental fat sources; Table S2. Complete fatty acid profile of the experimental diets; Table S3. Complete fatty acid profile of fresh dark chicken meat with skin coming from the three experimental diets.

Author Contributions: Conceptualization, F.G., M.R., S.V., A.C.B., and A.T.; methodology, P.A., F.G., S.V., A.C.B., and A.T.; validation, P.A., F.G., S.V., and A.T.; formal analysis, P.A.; investigation, P.A., F.G., S.V., M.V., and A.T.; resources, F.G., A.C.B., and M.V.; data curation, P.A., and A.T.; writing—original draft preparation, P.A.; writing—review and editing, F.G., M.R., S.V., A.C.B., M.V., and A.T.; visualization, P.A., F.G., A.C.B., and A.T.; supervision, F.G. and A.T.; project administration, F.G., and A.C.B.; funding acquisition, F.G., M.R., and A.C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study has been supported by the grant AGL2015-64431-C2-2-R funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”; the grant RYC-2017-23601 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ESF Investing in your future”; by Spanish Ministry of Universities through the FPU program (FPU18/01010), the University of Barcelona through the pre-doctoral program APIF (APIF_18_19_10).

Institutional Review Board Statement: All animal housing and husbandry were in accordance with the European Union Guidelines (2010/63/EU), and all management practices and procedures were approved by the Animal Ethics Committee (CEEAH) of the Universitat Autònoma de Barcelona (code number: 10167; approval date: 19 March 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the panelists who participated in sensory acceptance tests.

Data Availability Statement: The data is contained within the article and Supplementary Materials to the article.

Acknowledgments: The authors acknowledge the staff at Nial farm facilities and bonÀrea Agrupa (Guissona, Spain) for all support, and the colleagues from Universitat Autònoma de Barcelona for their collaboration in this study. The authors are also grateful to RIOSA S.A. for providing the olive pomace acid oil. Additionally, the authors would like to acknowledge all the participants of the sensory acceptance test. The Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB) is recognized as a Maria de Maeztu Unit of Excellence (grant CEX2021-001234-M) funded by MICIN/AEI/FEDER, EU.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The co-author (Marçal Verdú) is the head/responsible of Research on Animal Nutrition and Production of the bonÀrea Agrupa company. Marçal Verdú was contacted by the core team of the research project (researchers from the Universitat de Barcelona and Universitat Autònoma de Barcelona) and bonÀrea Agrupa was interested in the potential results of the project proposed by the core team. Thus, bonÀrea Agrupa let us use its facilities (Nial farm and commercial slaughterhouse) to carry out the project, but paying the company for the expenses incurred in the farm and in the slaughterhouse. Marçal Verdú facilitated the organization of the experiment within the company’s facilities and collaborated with the core team in supervising the growth of the animals at the Nial farm and in supervising the collection of data on the productive parameters of the animals. Therefore, no financial support was obtained from bonÀrea Agrupa, and neither. Marçal Verdú nor bonÀrea Agrupa improperly influenced, interfered with, or biased this experiment. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to publish the results.

References

- International Olive Council 2020/21 Crop Year: Production down, Consumption up. Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/2020-21-crop-year-production-down-consumption-up/> (accessed on 15 February 2022).
- Khdair, A.; Abu-Rumman, G. Sustainable Environmental Management and Valorization Options for Olive Mill Byproducts in the Middle East and North Africa (MENA) Region. *Processes* **2020**, *8*, 671. <https://doi.org/10.3390/PR8060671>.
- Difonzo, G.; Troilo, M.; Squeo, G.; Pasqualone, A.; Caponio, F. Functional Compounds from Olive Pomace to Obtain High-Added Value Foods—A Review. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 15–26. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10478>.
- Varona, E.; Tres, A.; Rafecas, M.; Vichi, S.; Barroeta, A.C.; Guardiola, F. Composition and Nutritional Value of Acid Oils and Fatty Acid Distillates Used in Animal Feeding. *Animals* **2021**, *11*, 196. <https://doi.org/10.3390/ani11010196>.
- Verge-Mérida, G.; Solà-Oriol, D.; Tres, A.; Verdú, M.; Farré, G.; Garcés-Narro, C.; Barroeta, A.C. Olive Pomace Oil and Acid Oil as Alternative Fat Sources in Growing-Finishing Broiler Chicken Diets. *Poult. Sci.* **2022**, *101*, 102079. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102079>.
- Verge-Mérida, G.; Barroeta, A.C.; Ferrer, C.; Serrano, T.; Guardiola, F.; Soler, M.D.; Sala, R. Olive Pomace and Soybean-Sunflower Acid Oils as Alternative Fat Sources in European Seabass (*Dicentrarchus Labrax*) Diets: Effects on Performance, Digestibility and Flesh Fatty Acid Composition and Quality Parameters. *Animals* **2022**, *12*, 1198. <https://doi.org/10.3390/ani12091198>.
- Verge-Mérida, G.; Barroeta, A.C.; Guardiola, F.; Verdú, M.; Balart, M.; Font-i-Furnols, M.; Solà-Oriol, D. Crude and Acid Oils from Olive Pomace as Alternative Fat Sources in Growing-Finishing Pigs. *Animal* **2021**, *15*, 100389. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100389>.
- Albendea, P.; Tres, A.; Rafecas, M.; Vichi, S.; Sala, R.; Guardiola, F. Effect of Feeding Acid Oils on European Seabass Fillet Lipid Composition, Oxidative Stability, Color, and Sensory Acceptance. *Aquac. Nutr.* **2023**, *2023*, 6415693. <https://doi.org/10.1155/2023/6415693>.
- Varona, E.; Tres, A.; Rafecas, M.; Vichi, S.; Barroeta, A.C.; Guardiola, F. Methods to Determine the Quality of Acid Oils and Fatty Acid Distillates Used in Animal Feeding. *MethodsX* **2021**, *8*, 101334. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101334>.
- EU Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. *Off. J. Eur. Union.* **2010**, *276*, 33–79.
- FEDNA. *Necesidades Nutricionales en Avicultura*, 2nd ed.; Santomá, G., Mateos, G.G., Eds.; Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal: Madrid, Spain, 2018; ISBN 9788409065295.
- Bou, R.; Guardiola, F.; Tres, A.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Effect of Dietary Fish Oil, α -Tocopheryl Acetate, and Zinc Supplementation on the Composition and Consumer Acceptability of Chicken Meat. *Poult. Sci.* **2004**, *83*, 282–292. <https://doi.org/10.1093/ps/83.2.282>.
- Aleman, M.; Nuchi, C.D.; Bou, R.; Tres, A.; Polo, J.; Guardiola, F.; Codony, R. Effectiveness of Antioxidants in Preventing Oxidation of Palm Oil Enriched with Heme Iron: A Model for Iron Fortification in Baked Products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, *112*, 761–769. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900220>.
- Grau, A.; Codony, R.; Rafecas, M.; Barroeta, A.G.; Guardiola, F. Lipid Hydroperoxide Determination in Dark Chicken Meat through a Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Method. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4136–4143. <https://doi.org/10.1021/jf991054z>.
- Tres, A.; Nuchi, C.D.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Assessing Rabbit and Chicken Tissue Susceptibility to Oxidation through the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 563–573. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800230>.
- Grau, A.; Guardiola, F.; Boatella, J.; Barroeta, A.; Codony, R. Measurement of 2-Thiobarbituric Acid Values in Dark Chicken Meat through Derivative Spectrophotometry: Influence of Various Parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1155–1159. <https://doi.org/10.1021/jf990518q>.
- Botsoglou, N.A.; Fletouris, D.J.; Papageorgiou, G.E.; Vassilopoulos, V.N.; Mantis, A.J.; Trakatellis, A.G. Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1931–1937. <https://doi.org/10.1021/jf00045a019>.
- FEDNA. Normas FEDNA de Control de Calidad de Ingredientes para Piensos-Especificación Técnica de Materia Prima, Grasas y Aceites. Available online: www.fundacionfedna.org/sites/%0Adefault/files/8_Grasas_y_aceites.pdf (accessed on 2 April 2023).
- Varona, E.; Tres, A.; Rafecas, M.; Vichi, S.; Sala, R.; Guardiola, F. Oxidative Quality of Acid Oils and Fatty Acid Distillates Used in Animal Feeding. *Animals* **2021**, *11*, 2559. <https://doi.org/10.3390/ani11092559>.
- Cort, W.M.; Vicente, T.S.; Waysek, E.H.; Williams, B.D. Vitamin E Content of Feedstuffs Determined by High-Performance Liquid Chromatographic Fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 1330–1333. <https://doi.org/10.1021/jf00120a045>.
- Ai, Y.; Jane, J.L. Macronutrients in Corn and Human Nutrition. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 581–598. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12192>.
- Kan, A. Characterization of the Fatty Acid and Mineral Compositions of Selected Cereal Cultivars from Turkey. *Rec. Nat. Prod.* **2015**, *1*, 124–134.
- de Oliveira, C.O.; Roll, A.A.P.; Medeiros Gonçalves, F.M.; Lopes, D.C.N.; Xavier, E.G. Olive Pomace for the Feeding of Commercial Poultry: Effects on Performance, Meat and Eggs Quality, Haematological Parameters, Microbiota and Immunity. *World's Poult. Sci. J.* **2021**, *77*, 363–376. <https://doi.org/10.1080/00439339.2021.1894409>.
- Wood, J.D.; Enser, M. Manipulating the Fatty Acid Composition of Meat to Improve Nutritional Value and Meat Quality. In *New Aspects of Meat Quality. From Genes to Ethics*; Purslow, P.P., Ed.; Elsevier Science: Sawston, UK, 2017; ISBN 9780081005934.
- Grashorn, M.A. Functionality of Poultry Meat. *J. Appl. Poult. Res.* **2007**, *16*, 99–106. <https://doi.org/10.1093/japr/16.1.99>.

26. Bou, R.; Codony, R.; Tres, A.; Decker, E.A.; Guardiola, F. Dietary Strategies to Improve Nutritional Value, Oxidative Stability, and Sensory Properties of Poultry Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 800–822. <https://doi.org/10.1080/10408390902911108>.
27. Zaki, E.F.; El Faham, A.I.; Nematallah, G.M. Fatty Acids Profile and Quality Characteristics of Broiler Chicken Meat Fed Different Dietary Oil Sources with Some Additives. *Int. J. Health Anim. Sci. Food Saf.* **2018**, *5*, 40–50.
28. Crespo, N.; Esteve-García, E. Dietary Fatty Acid Profile Modifies Abdominal Fat Deposition in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* **2001**, *80*, 71–78. <https://doi.org/10.1093/ps/80.1.71>.
29. O'Neill, L.M.; Galvin, K.; Morrissey, P.A.; Buckley, D.J. Comparison of Effects of Dietary Olive Oil, Tallow and Vitamin E on the Quality of Broiler Meat and Meat Products. *Br. Poult. Sci.* **1998**, *39*, 365–371. <https://doi.org/10.1080/00071669888917>.
30. Kang, K.R.; Cherian, G.; Sim, J.S. Tocopherols, Retinol and Carotenes in Chicken Egg and Tissues as Influenced by Dietary Palm Oil. *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 592–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15792.x>.
31. Qi, J.; Wang, H.H.; Zhou, G.H.; Xu, X.L.; Li, X.; Bai, Y.; Yu, X. Evaluation of the Taste-Active and Volatile Compounds in Stewed Meat from the Chinese Yellow-Feather Chicken Breed. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20*, S2579–S2595. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1375514>.
32. Addeen, A.; Benjakul, S.; Maqsood, S. Haemoglobin-Mediated Lipid Oxidation in Washed Chicken Mince. *Indian J. Sci. Technol.* **2016**, *9*, 1–8. <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i2/71829>.
33. Ercolini, D.; Russo, F.; Nasi, A.; Ferranti, P.; Villani, F. Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential in Vitro and in Beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1990–2001. <https://doi.org/10.1128/AEM.02762-08>.
34. Casaburi, A.; Piombino, P.; Nychas, G.J.; Villani, F.; Ercolini, D. Bacterial Populations and the Volatilome Associated to Meat Spoilage. *Food Microbiol.* **2015**, *45*, 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002>.
35. Zhang, C.; Zhang, H.; Liu, M.; Zhao, X.; Luo, H. Effect of Breed on the Volatile Compound Precursors and Odor Profile Attributes of Lamb Meat. *Foods* **2020**, *9*, 1178. <https://doi.org/10.3390/foods9091178>.
36. Qi, J.; Liu, D.Y.; Zhou, G.H.; Xu, X.L. Characteristic Flavor of Traditional Soup Made by Stewing Chinese Yellow-Feather Chickens. *J. Food Sci.* **2017**, *82*, 2031–2040. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13801>.
37. Chen, D.W.; Balagiannis, D.P.; Parker, J.K. Use of Egg Yolk Phospholipids to Generate Chicken Meat Odorants. *Food Chem.* **2019**, *286*, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.184>.
38. Botsoglou, N.A.; Christaki, E.; Fletouris, D.J.; Florou-Paneri, P.; Spais, A.B. The Effect of Dietary Oregano Essential Oil on Lipid Oxidation in Raw and Cooked Chicken during Refrigerated Storage. *Meat Sci.* **2002**, *62*, 259–265. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00256-X).
39. Ryu, Y.C.; Rhee, M.S.; Lee, M.H.; Lee, S.K.; Kim, B.C. Effects of Packaging Methods on the Meat Quality of α -Tocopherol Supplemented Broiler Chicks during Refrigerated Storage. *Food Sci. Biotechnol.* **2006**, *15*, 248–253.
40. Tománková, J.; Borilová, G.; Steinhauserová, I.; Las, L.G. Volatile Organic Compounds as Biomarkers of the Freshness of Poultry Meat Packaged in a Modified Atmosphere. *Czech J. Food Sci.* **2012**, *30*, 395–403. <https://doi.org/10.17221/408/2011-cjfs>.
41. Arvanitoyannis, I.S.; Stratakis, A.C. Application of Modified Atmosphere Packaging and Active/Smart Technologies to Red Meat and Poultry: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 1423–1446. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0803-z>.
42. Narciso-Gaytán, C.; Shin, D.; Sams, A.R.; Bailey, C.A.; Miller, R.K.; Smith, S.B.; Leyva-Ovalle, O.R.; Sánchez-Plata, M.X. Soybean, Palm Kernel, and Animal-Vegetable Oils and Vitamin E Supplementation Effect on Lipid Oxidation Stability of Sous Vide Chicken Meat. *Poult. Sci.* **2010**, *89*, 721–728. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00241>.
43. Grau, A.; Guardiola, F.; Grimpa, S.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Oxidative Stability of Dark Chicken Meat through Frozen Storage: Influence of Dietary Fat and α -Tocopherol and Ascorbic Acid Supplementation. *Poult. Sci.* **2001**, *80*, 1630–1642. <https://doi.org/10.1093/ps/80.11.1630>.
44. Lauridsen, C.; Buckley, D.J.; Morrissey, P.A. Influence of Dietary Fat and Vitamin E Supplementation on α -Tocopherol Levels and Fatty Acid Profiles in Chicken Muscle Membranal Fractions and on Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Meat Sci.* **1997**, *46*, 9–22. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00010-7).
45. Lebre, B.; Čandek-Potokar, M. Review: Pork Quality Attributes from Farm to Fork. Part I. Carcass and Fresh Meat. *Animal* **2022**, *16*, 100402. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100402>.
46. Zhang, H.; Wu, J.; Guo, X. Effects of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Spice Extracts on Raw Chicken Meat Quality. *Food Sci. Hum. Wellness* **2016**, *5*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.11.003>.
47. Faustman, C.; Sun, Q.; Mancini, R.; Suman, S.P. Myoglobin and Lipid Oxidation Interactions: Mechanistic Bases and Control. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025>.
48. Pogorzelska, E.; Godziszewska, J.; Brodowska, M.; Wierzbicka, A. Antioxidant Potential of Haematococcus Pluvialis Extract Rich in Astaxanthin on Colour and Oxidative Stability of Raw Ground Pork Meat during Refrigerated Storage. *Meat Sci.* **2018**, *135*, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.09.002>.
49. Chiu, M.C.; de Moraes Coutinho, C.; Gonçalves, L.A.G. Carotenoids Concentration of Palm Oil Using Membrane Technology. *Desalination* **2009**, *245*, 783–786. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.03.002>.
50. Criado, M.N.; Romero, M.P.; Motilva, M.J. Effect of the Technological and Agronomical Factors on Pigment Transfer during Olive Oil Extraction. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5681–5688. <https://doi.org/10.1021/jf070303d>.
51. Boskou, D. Olive Oil. In *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*; Gunstone, F.D., Ed.; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK, 2011; pp. 244–277.

52. Grashorn, M. Feed Additives for Influencing Chicken Meat and Egg Yolk Color. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color*; Carle, R., Schweiggert, R.M., Eds.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2016; ISBN 9780081003923.
53. Gray, J.I.; Gomma, E.A.; Buckley, D.J. Oxidative Quality and Shelf Life of Meats. *Meat Sci.* **1996**, *43*, 111–123. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(96\)00059-9](https://doi.org/10.1016/0309-1740(96)00059-9).

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

6 DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS



6.1 Composición de los aceites ácidos y de las otras fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos

Una de las características de los aceites ácidos (AO, *Acid oil*) es la variabilidad que muestran en su composición química, por lo que es importante llevar a cabo una caracterización adecuada de la misma. Uno de los parámetros más ampliamente utilizados para evaluar la calidad de las grasas y aceites es la suma de la fracción de humedad más materia volátil, la fracción de impurezas insolubles y la fracción de materia insaponificable (MIU, *Moisture and volatile matter + Insoluble impurities + Unsaponifiable matter*), ya que, tal y como se ha comentado en el apartado 2.2, representa una fracción de compuestos que pueden causar una disminución del valor energético de la grasa. La evaluación de este parámetro es más relevante aún en el caso de los AO, puesto que, al ser subproductos procedentes de la etapa de neutralización de la refinación química, suelen presentar una tendencia a acumular sustancias propias del MIU (Varona et al., 2021a). Los valores obtenidos para las diferentes fracciones (M, I y U) y para el MIU total de las once fuentes lipídicas junto con la estimación de valores de la mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p) (B, *Blend of crude palm oil and olive pomace acid oil at 50/50 (w/w)*) se encuentran representados en la Figura 6.1.

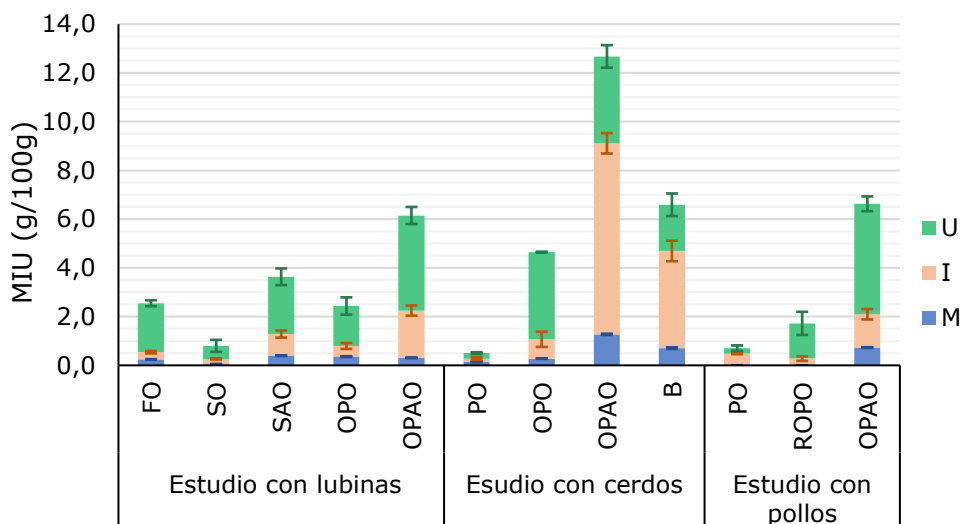


Figura 6.1 Valor de MIU de las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos.

Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de las tres determinaciones realizadas por muestra, excepto los valores de B, que han sido estimados a partir de la composición obtenida para la PO y el OPAO del estudio con cerdos. Abreviaturas: M, humedad más materia volátil; I, impurezas insolubles; U, materia insaponificable; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

Tal y como cabe esperar, los valores de MIU encontrados para los diferentes AO eran generalmente superiores a los observados en los otros tipos de fuentes lipídicas utilizadas en esta tesis. De hecho, el SAO era el único AO que mostraba un valor por debajo de 5 g/100g, que es el valor máximo de MIU recomendado por FEDNA (2002), siendo incluso inferior al MIU obtenido para uno de los aceites crudos (OPO del estudio con cerdos). En cuanto a los OPAO, los utilizados en los estudios con lubinas y con pollos mostraron valores de MIU bastante similares entre ellos y análogos también a la mediana obtenida por Varona et al. (2021a) para AO similares del mercado español. Sin embargo, el OPAO empleado en el estudio con cerdos presentó prácticamente el doble de MIU que cualquiera de los otros OPAO, siendo también superior al máximo valor de MIU observado en el estudio de Varona et al. (2021a) para este tipo de AO. Al mezclar este OPAO del estudio con cerdos con el PO de ese mismo estudio (valores estimados para B), se logró un MIU total parecido al observado para los otros dos OPAO y al de la mediana obtenida por Varona et al. (2021a). Otra peculiaridad del OPAO empleado en el estudio con cerdos es que era el único AO de los evaluados en el que la fracción de I era la

mayoritaria en el MIU. Según los resultados de Varona et al. (2021a), generalmente el factor que más contribuye al MIU en los AO, independientemente del origen botánico, es la U, tal y como ocurría en los otros AO usados en esta tesis. A pesar de que la fracción de I no era la predominante en el MIU en la mayoría de las fuentes lipídicas usadas en esta tesis, solo la PO del estudio con cerdos cumplía con las recomendaciones de FEDNA (2002) (I inferior a 0,15 g/100 g). Entre las fuentes lipídicas usadas, no solamente se observó una variabilidad en los valores de MIU en el caso de los AO, sino también entre los de los OPO del estudio con lubinas y el estudio con cerdos. El primero de ellos poseía un valor de MIU total bastante inferior (casi la mitad) que el obtenido para el segundo OPO, presentando las mayores diferencias en el contenido en U. Sin embargo, en todos los casos la proporción de U era coherente con el rango que pueden mostrar los aceites vegetales crudos según el Codex Alimentarius (1999).

El perfil de ácidos grasos (FA, *Fatty acid*) es otro aspecto en el que pueden diferir las fuentes lipídicas usadas en la elaboración de piensos. Como ya se ha comentado anteriormente (apartado 2.3.1), este parámetro es altamente relevante puesto que puede condicionar las características físico-químicas de los alimentos de origen animal, sobre todo de aquellos procedentes de animales monogástricos. La Figura 6.2 muestra el perfil de FA en términos de sumatorios de los diferentes tipos de FA (SFA, MUFA, PUFA n-3 y PUFA n-6) de las diferentes fuentes lipídicas usadas en esta tesis.

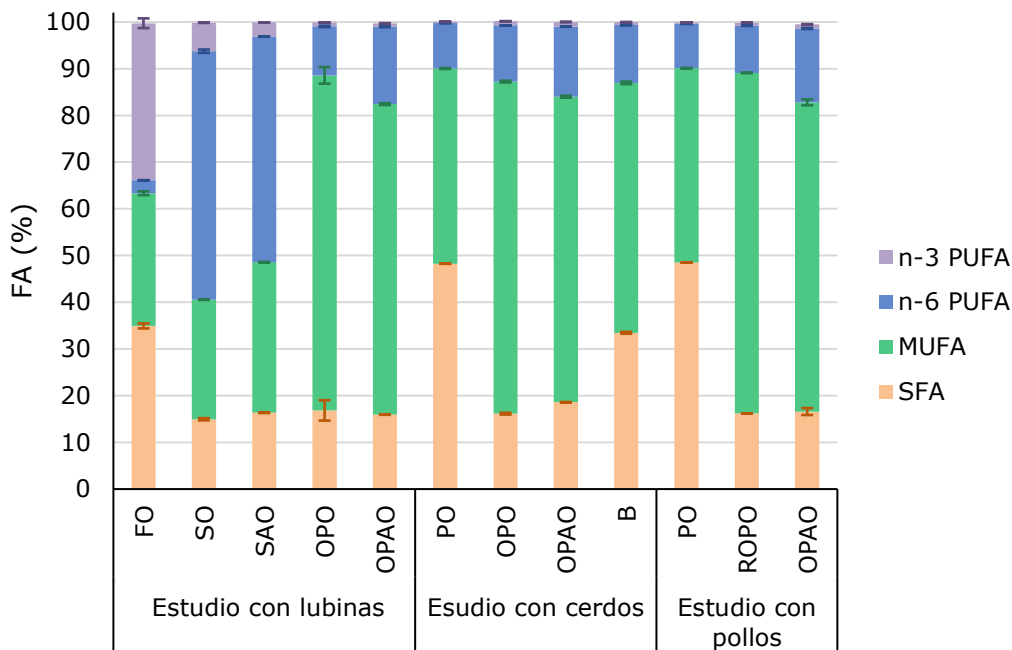


Figura 6.2 Perfil de ácidos grasos de las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos.

Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de las tres determinaciones realizadas por muestra, excepto los valores de B, que han sido estimados a partir de la composición obtenida para la PO y el OPAO del estudio con cerdos. Abreviaturas: FA, ácido graso; SFA, ácido graso saturado; MUFA, ácido graso monoinsaturado; PUFA, ácido graso poliinsaturado; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

Al contrario que en el caso del MIU, el perfil de FA era muy similar entre los OPAO empleados en los diferentes estudios y, también, bastante parecido al de los OPO y al ROPO. Las mínimas diferencias con respecto a los OPO y al ROPO residían en que los tres OPAO presentaron un porcentaje de MUFA ligeramente inferior y de PUFA n-6 levemente superior. En el caso del SAO, el perfil de FA difirió de SO en mayor medida, mostrando una mayor proporción de MUFA y un porcentaje menor de PUFA n-6 y n-3. Estas diferencias denotaban que este SAO contenía AO de girasol además de AO de soja, hecho que suele ser habitual en estos subproductos (Varona et al., 2021a), debido a la manera en la que se obtienen y gestionan en las plantas de refinación (apartado 2.1.2). Por tanto, el tipo de fuente lipídica (AO, crudo o refinado) no presentó una gran influencia sobre el perfil de FA, sino que el factor realmente determinante era el origen botánico de las mismas. El hecho de que los subproductos de la refinación de aceites y grasas, como los AO y los FA destilados, muestran una composición similar en FA a los correspondientes

aceites crudos ha sido descrito previamente por Varona et al. (2021a). Consecuentemente, las principales características de las otras fuentes lipídicas empleadas en esta tesis también eran coherentes con la información bibliográfica existente para cada una de ellas (Codex Alimentarius, 1999; Gunstone, 2008, 2011). Por ejemplo, el FO destacaba por su contenido en PUFA n-3 (sobre todo EPA + DHA); el SO por ser rico en PUFA n-6 (especialmente en ácido linoleico) y también por presentar un contenido elevado en PUFA n-3 (debido al ácido linolénico); los OPO, OPAO y ROPO por su alto nivel en MUFA (principalmente por el ácido oleico); y las dos PO se caracterizaban por poseer el contenido más elevado en SFA (sobre todo en ácido palmítico).

Las fuentes lipídicas empleadas en alimentación animal, además de proporcionar energía y FA esenciales, también aportan vitaminas liposolubles (apartado 2.2.1). Entre los compuestos liposolubles con actividad vitamínica destacan los tocoferoles (T, *Tocopherol*) y los tocotrienoles (T3, *Tocotrienol*), puesto que además poseen actividad antioxidante (apartado 2.3.2). Consecuentemente, la composición en T y T3 de una fuente lipídica puede afectar a su calidad nutricional, sobre todo en términos de estabilidad oxidativa. La composición genérica en T y T3 de las diferentes fuentes lipídicas empleadas en esta tesis se muestra en la Figura 6.3.

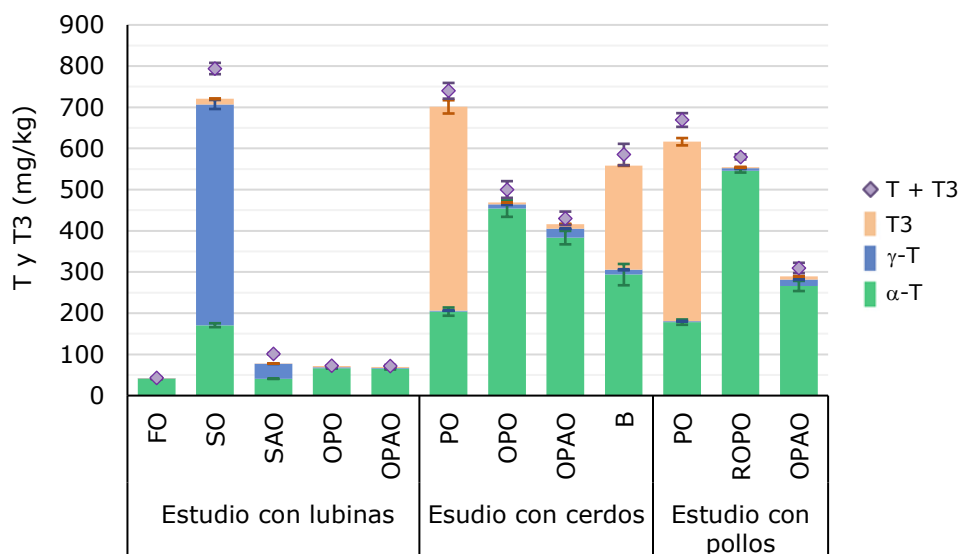


Figura 6.3 Composición en tocoferoles y tocotrienoles de las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos.

Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de las tres determinaciones realizadas por muestra, excepto los valores de B, que han sido estimados a partir de la composición obtenida para la PO y el OPAO del estudio con cerdos. Abreviaturas: T, tocoferol; T3, tocotrienol; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

Tal y como se puede observar en la gráfica de la Figura 6.3, entre las fuentes lipídicas empleadas en esta tesis existía una gran variabilidad tanto en la composición como en el contenido total de T + T3. En general, no se observó una tendencia concreta al comparar las concentraciones de T + T3 de los AO con respecto a los aceites crudos. Esto se debe a que el contenido de T + T3 presente en los AO puede depender de diversos factores, como son la concentración en el aceite crudo de partida o la eficacia del proceso de refinación. Cabe mencionar que, en los estudios realizados en esta tesis, los aceites crudos empleados no se correspondían con los aceites crudos cuya refinación generó los AO estudiados. La posible variabilidad en el contenido de T + T3 de aceites crudos de un mismo origen botánico ha sido ampliamente descrita en la literatura (Codex Alimentarius, 1999; Kiritsakis y Christie, 2000) y se podía observar en los dos OPO usados en esta tesis, entre los que existía una diferencia superior a los 400 mg/kg. Dado que ya existe una gran disparidad habitualmente en el contenido de T + T3 entre aceites crudos, es de esperar que los subproductos procedentes de la refinación también la puedan mostrar, como ocurría entre los tres OPAO usados en esta tesis. El OPAO empleado en el estudio con lubinas mostraba una concentración muy

inferior de T + T3 con respecto a los otros OPAO, que contenían niveles bastante más similares entre ellos. De hecho, la concentración de T + T3 que presentó el OPAO usado en el estudio con lubinas (126,1 mg/kg) era bastante inferior a las comúnmente encontradas por Varona et al. (2021a) en OPAO obtenidos en el mercado español (mediana = 477,1 mg/kg). Sin embargo, este contenido de T + T3 del OPAO del estudio con lubinas era prácticamente idéntico al del OPO empleado en ese mismo estudio. Igualmente, el OPAO del estudio con cerdos mostró un contenido de T + T3 ligeramente inferior al OPO usado en dicho estudio. En el caso del SAO, el contenido en T + T3 era muy inferior al del SO, pero algo superior al del OPO y al del OPAO del estudio con lubinas. En términos generales, la fuente lipídica con un contenido inferior en T + T3 era el FO, mientras que la que presentaba la mayor concentración era el SO. Según la información publicada en la bibliografía, aunque el rango de valores de T + T3 encontrados en distintos FO es muy amplio (Brjekkkan et al., 1963), generalmente suele ser inferior al de la mayoría de aceites vegetales crudos, sobre todo al del SO, ya que es uno de los más ricos en T + T3 (Codex Alimentarius, 1999).

A pesar de estas discrepancias entre fuentes lipídicas de un mismo tipo (p. ej. entre los OPO o entre los OPAO), el origen botánico de cada una se evidenciaba en la composición en T y T3. Es decir, en el caso del SO, el tocol mayoritario era γ -T, mientras que en las PO predominaban los T3 frente a los T. En los OPO, OPAO y ROPO el compuesto mayoritario era el α -T y en el SAO se observaban cantidades bastante similares de α -T y γ -T, como consecuencia de ser una mezcla de AO de soja y de girasol. Todas estas características concuerdan con la información bibliográfica existente (Codex Alimentarius, 1999; Gunstone, 2008, 2011; Varona et al., 2021a).

Un rasgo representativo de los AO es que, al proceder de la etapa de neutralización de la refinación química de aceites y grasas crudas, poseen un elevado contenido en ácidos grasos libres (FFA, *Free fatty acid*) (apartado 2.2). De hecho, tal y como muestra la Figura 6.4, la clase lipídica mayoritaria en todos los AO empleados en esta tesis eran los FFA, mientras que los triacilgliceroles (TAG, *Triacylglycerol*) eran los componentes principales en el resto de las fuentes lipídicas.

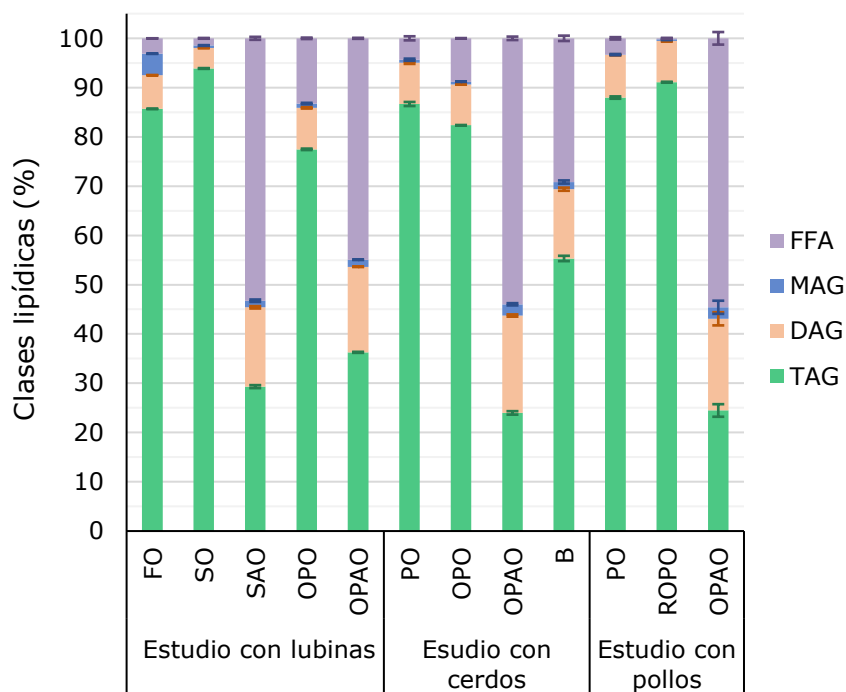


Figura 6.4 Composición en clases lipídicas de las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con lubinas, cerdos y pollos.

Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de las tres determinaciones realizadas por muestra, excepto los valores de B, que han sido estimados a partir de la composición obtenida para la PO y el OPAO del estudio con cerdos. Abreviaturas: TAG, triacilglicérol; DAG, diacilglicérol; MAG, monoacilglicérol; FFA, ácidos grasos libres; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

Entre los AO estudiados, el OPAO utilizado en el estudio con lubinas presentaba una proporción de FFA ligeramente menor al resto, pero aun así la variabilidad de este parámetro era bastante inferior a la encontrada en el MIU. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la diversidad en el contenido en FFA de los AO podría ser superior a la observada en este caso. Concretamente, los valores de FFA obtenidos por Varona et al. (2021a) en el estudio con 79 muestras de AO con diferentes orígenes botánicos adquiridos

en el mercado español se encontraban en un rango de 31,7 – 65,3%. En el caso de los valores de FFA de los OPAO y del SAO empleados en esta tesis, eran bastante similares a la mediana observada por Varona et al. (2021a).

Aunque en todos los aceites crudos la clase mayoritaria eran los TAG, existía una variabilidad tanto en la proporción de esta clase lipídica como en el contenido en FFA. Por ejemplo, el OPO empleado en el estudio con lubinas poseía un contenido de TAG algo inferior al resto y era el aceite crudo con mayor proporción de FFA. Además, la fracción de FFA era bastante superior en los dos OPO a la observada para las PO y el SO. A pesar de estas diferencias, en general los valores obtenidos concordaban con el rango de FFA (entre 0,5% y 10,0%) que cabe esperar para aceites vegetales crudos según Winkler-Moser y Mehta (2015). El valor más bajo de FFA se encontró en ROPO, como es de esperar al ser un aceite obtenido tras un proceso de refinación que logra reducir los FFA a valores inferiores al 0,5% (Gupta, 2017).

Para una completa caracterización de las diferentes fuentes lipídicas es necesario evaluar los parámetros de oxidación lipídica, tanto primaria como secundaria. En la Tabla 6.1 se muestran los valores obtenidos para el índice de peróxidos, empleado como medida de la oxidación primaria y el índice de *p*-anisidina, utilizado como medida de los aldehídos formados durante la oxidación secundaria (principalmente 2-alquenes y 2,4-dienales).

Tabla 6.1 Parámetros de oxidación primaria (índice de peróxidos) y secundaria (índice de *p*-anisidina) de las diferentes fuentes lipídicas empleadas en esta tesis.

	Fuente lipídica	Índice de peróxidos (meqO₂/kg)	Índice de <i>p</i>-anisidina
Estudio con lubinas	FO	2,70 ± 0,44	109,41 ± 8,94
	SO	1,49 ± 0,12	1,28 ± 0,15
	SAO	1,65 ± 0,08	13,56 ± 2,23
	OPO	6,02 ± 0,72	12,72 ± 1,83
	OPAO	1,68 ± 0,46	14,18 ± 0,90
Estudio con cerdos	PO	5,03 ± 0,30	3,86 ± 0,09
	OPO	6,35 ± 1,88	14,41 ± 1,03
	OPAO	2,16 ± 0,16	30,49 ± 3,68
	B	3,59 ± 0,34	17,18 ± 3,69
Estudio con pollos	PO	3,79 ± 0,01	6,85 ± 0,28
	ROPO	8,33 ± 0,11	4,42 ± 0,14
	OPAO	6,98 ± 0,19	21,31 ± 1,80

Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar de las tres determinaciones realizadas por muestra, excepto los valores de B, que han sido estimados a partir de la composición obtenida para la PO y el OPAO del estudio con cerdos. Abreviaturas: FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

En términos de índice de peróxidos cabe resaltar que todas las fuentes lipídicas empleadas en los estudios con animales cumplían con la recomendación de FEDNA de no sobrepasar los 10 meqO₂/kg (FEDNA, 2002). Entre los AO, el SAO y el OPAO empleados en el estudio con lubinas mostraban índices de peróxidos casi idénticos y muy similares al valor obtenido para el SO. El OPAO usado en el estudio con cerdos poseía un valor ligeramente superior a los dos AO usados en el estudio con lubinas. Estos tres AO presentaban valores inferiores a la mayoría de los aceites crudos, mientras que el OPAO utilizado en el estudio con pollos presentaba un índice de peróxidos bastante superior a ellos, estando también ligeramente por encima de los valores observados por Varona et al. (2021c) ($\leq 6,5$ meqO₂/kg) en AO de diferentes orígenes botánicos obtenidos en el mercado español. Debido a que en el proceso de obtención de los AO se produce una degradación de los productos de oxidación primaria, es esperable que estos subproductos muestren valores bajos de índice de peróxidos. Consecuentemente, la obtención de valores elevados de índice de peróxidos en AO habría sido indicativa de que estos subproductos han sido almacenados durante tiempos prolongados y/o en condiciones de conservación inadecuadas.

En cuanto a la oxidación secundaria, la variabilidad encontrada entre las diversas fuentes lipídicas era muy superior a la observada en el índice de peróxidos. Entre los AO, tal y como ocurría con el índice de peróxidos, el SAO y el OPAO empleados en el estudio con lubinas presentaban valores de índice de *p*-anisidina similares entre ellos y también al OPO utilizado en ese mismo estudio. Además, los valores de *p*-anisidina de estos dos AO son bastante similares al valor de la mediana (16,4) obtenido en el estudio de Varona et al. (2021c) para AO de distintos orígenes. En cuanto a los otros dos OPAO, sobre todo el OPAO del estudio con cerdos, mostraron un índice de *p*-anisidina muy superior al resto de los otros AO, siendo en el caso del OPAO empleado en el estudio con pollos ligeramente superior y en el del usado en el estudio con cerdos bastante superior al rango (9,9 – 20,5) observado por Varona et al. (2021c) para AO similares. El índice de *p*-anisidina más bajo era el observado para el SO, mientras que el más elevado era el obtenido para el FO. Aunque el valor obtenido para el FO era más elevado que el recomendado por FEDNA para el uso de este tipo de aceites en piensos para acuicultura (valor de *p*-anisidina de 15, ver apartado 2.2.1), estaba dentro de los niveles que se suelen encontrar en FO destinados a alimentación animal (Nuchi et al., 2009).

Considerando todos los parámetros de composición estudiados para los AO usados en esta tesis, en rasgos generales, los AO empleados en los estudios con lubinas y pollos son representativos de la calidad comúnmente encontrada en AO procedentes del mercado español (Varona et al., 2021a, 2021c). Sin embargo, el OPAO usado en el estudio con cerdos mostraba unos valores de la fracción I y de MIU total bastante superiores a los que serían habituales en AO del mismo origen botánico. La variabilidad de composición entre los OPAO, sobre todo en términos de contenido en I, MIU total y T + T3, se puede deber a la posible diferencia composicional del OPO de partida (apartado 2.1.3) y a las diferentes características y eficacias del proceso de refinación químico realizado. Por ejemplo, si la etapa de desgomado del OPO presenta una baja eficacia o si se lleva a cabo de manera simultánea a la neutralización, es posible que determinados compuestos normalmente eliminados durante dicha etapa acaben en las pastas jabonosas y, consecuentemente, en el OPAO (Varona et al., 2021a). Estos compuestos, que son mayoritariamente fosfolípidos, contribuirían a obtener una mayor proporción de I y de MIU total en el OPAO.

6.2 Composición lipídica del filete de pescado y de la carne

Independientemente de la especie animal con la que se trabajaba (lubinas, cerdos o pollos), tanto el filete de pescado como la carne en fresco reflejaron la composición lipídica de la dieta empleada en cada caso. A pesar de las diferencias metabólicas que podían presentar las tres especies, todas ellas eran especies de animales monogástricos, lo que hizo que mostrasen esta tendencia a reflejar la composición lipídica del pienso usado (apartado 2.3.1). Por ello, en todos los casos se apreciaba el origen botánico de los aceites vegetales o de los AO adicionados a la dieta en la composición del filete de pescado y de la carne.

Los rasgos generales del perfil de FA (sumatorios de los diferentes tipos de FA) del filete de lubina y de la carne procedente de los animales alimentados con las diferentes fuentes lipídicas se pueden observar en la Figura 6.5.

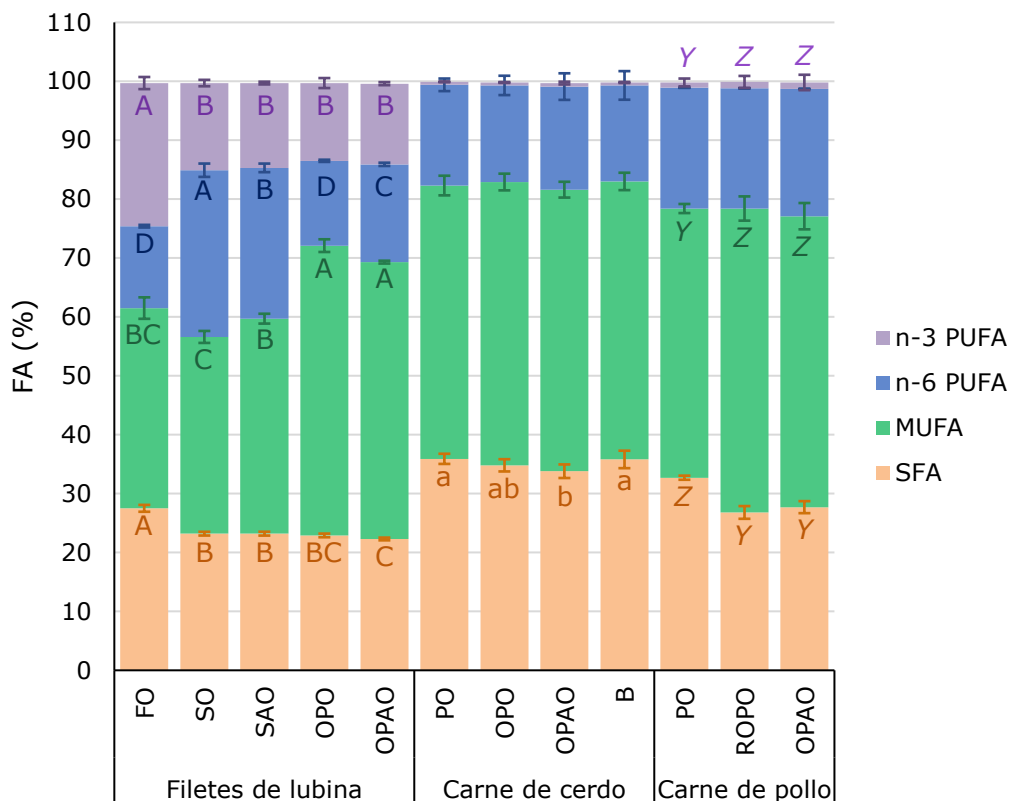


Figura 6.5 Perfil de ácidos grasos del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio. Los resultados están expresados como la media y la desviación estándar de cada tratamiento dietético ($n = 5$ para filete de lubina; $n = 8$ para carne de cerdo y carne de pollo). Las diferencias entre tratamientos dietéticos (ANOVA; $p < 0,05$) observadas con el test post hoc de Scheffé están representadas en filete de lubina ($n = 25$) por $A > B > C > D$; en carne de cerdo ($n = 32$) por $a > b$; y en carne de pollo ($n = 24$) por $Z > Y$. Abreviaturas: FA, ácido graso; SFA, ácido graso saturado; MUFA, ácido graso monoinsaturado; PUFA, ácido graso poliinsaturado; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

Independientemente de la especie animal, el uso de AO produjo un efecto en el perfil de FA del filete de pescado y de la carne similar al observado con el empleo del aceite crudo o refinado con el mismo origen botánico. La adición de OPO, OPAO o ROPO a las dietas dio lugar a filetes de lubina, carne de cerdo y de pollo ricos en MUFA, siendo el ácido oleico el FA mayoritario en todos los casos. En cuanto a la utilización del SAO en piensos para lubinas, los filetes resultantes mostraron un porcentaje superior de MUFA e inferior de PUFA n-3 a los filetes obtenidos con el uso del SO, reflejando que el SAO contenía AO de soja y de girasol.

Las mayores diferencias apreciables en el perfil de FA (Figura 6.4) eran entre las muestras procedentes de diferentes especies, sobre todo entre los filetes de lubina y la carne. En comparación con los dos tipos de carne, los filetes de lubinas mostraban un perfil de FA rico en PUFA n-3, reflejando el empleo de FO en todas las dietas. La cantidad de FO adicionada a los piensos variaba entre un 15,4% en la dieta control y un 3,9% en las que se incluían las fuentes lipídicas vegetales. Además, en peces los PUFA de cadena larga de la serie n-3 (n-3 LC-PUFA, *n-3 Long chain-Polyunsaturated fatty acid*) son esenciales para la formación de membranas celulares con una fluidez adecuada para mantener la homeostasis a bajas temperaturas (Fujisawa et al., 2010), por lo que podrían presentar una mayor tendencia a depositarlos que otras especies.

En consecuencia, el contenido de n-3 LC-PUFA (concretamente de EPA + DHA) de los filetes era dependiente de la dieta empleada, produciéndose una disminución de su contenido al sustituir el FO por una fuente de lipídica vegetal (ya fuera AO o aceite crudo), pero en todos los casos 100 g de filete contenían unos niveles suficientes de estos FA para cubrir las recomendaciones diarias para consumo humano de EPA + DHA (EFSA, 2019). Por tanto, aunque se reemplazase el FO por AO o aceites vegetales crudos en los piensos, los filetes resultantes mantenían el alto valor nutricional asociado generalmente al pescado por ser la principal fuente de n-3 LC-PUFA en la dieta humana (Weichselbaum et al., 2013; Torrissen y Onozaka, 2017). Al margen de este rasgo común, los filetes de lubina mostraron una mayor variabilidad en el perfil lipídico entre distintos tratamientos dietéticos que cualquiera de los dos tipos de carne. Esto se debe a que era el estudio en el que las fuentes lipídicas presentaban mayores diferencias en su composición en FA, puesto que procedían de tres orígenes botánicos diferentes (de la oliva, de la soja y del girasol) y, en todos los casos, los filetes mostraron características propias del origen botánico de la fuente lipídica empleada.

En cuanto a los dos tipos de carne, independientemente de la dieta empleada, la carne de cerdo presentaba un contenido de SFA superior y una proporción de PUFA inferior que la carne de pollo. Sin embargo, la cantidad de MUFA era bastante similar en ambos tipos de carne y, en todos los casos, el FA mayoritario era el ácido oleico, como suele ocurrir generalmente en carne (Wood y Enser, 2017). Hay que tener en cuenta que, aunque el porcentaje de grasa añadida a los piensos de cerdo era inferior al adicionado en las dietas de pollo, el perfil de FA obtenido para los piensos de estos dos estudios era

muy similar cuando estos contenían fuentes lipídicas con un mismo origen botánico (palma u oliva). Sin embargo, la diferente composición en FA de la dieta debida al origen botánico de la grasa adicionada dio lugar a un efecto significativo tanto en la proporción de MUFA como en la de SFA en la carne de pollo, mientras que en la carne de cerdo solo era significativo para el porcentaje de SFA. Por un lado, esto se puede deber a las diferencias en la absorción de FA y en el metabolismo lipídico entre las dos especies animales, ya que este tipo de diferencias han sido descritas incluso entre razas de una misma especie animal (Wood et al., 2008; Weichselbaum et al., 2013; Wood y Enser, 2017). Los animales son capaces de sintetizar C16:0 a partir de la glucosa procedente de la dieta y, en algunos casos, de acetato, y de generar diferentes FA mediante la acción de elongasas y desaturasas (Drackley, 2000; Nafikov y Beitz, 2007). Además, los FA pueden ser empleados para obtener energía mediante la β -oxidación (Drackley, 2000; Nafikov y Beitz, 2007). Por tanto, el depósito de FA en los tejidos animales es el resultado del balance entre la absorción lipídica, la biosíntesis de FA y la β -oxidación. Por otro lado, la tendencia a depositar diferentes FA puede variar entre tejidos de un mismo animal, dando lugar a discrepancias en la composición de FA y en el efecto de la dieta sobre esta, tal y como evidencian algunos estudios en la literatura realizados con cerdos y con pollos (Enser et al., 2000; Cortinas et al., 2004; Pascual et al., 2007; Duran-Montgé et al., 2010). Así, otro factor detrás de las diferencias observadas en el efecto de la dieta sobre la composición de FA en la carne de cerdo y pollo (Figura 6.5) es que el tipo de muestra estudiada en cada caso era diferente. Por ejemplo, en el estudio con cerdos, la carne de lomo estaba compuesta mayoritariamente por tejido muscular y presentaba un bajo contenido lipídico (estimado en \approx 1%), mientras que en el estudio con pollos las muestras poseían un mayor porcentaje de grasa (estimada en \approx 10%), debido a que incluían el tejido adiposo de la piel.

Al contrario que en el caso de los FA, los animales son incapaces de sintetizar T o T3, por lo que las concentraciones observadas en filete fresco de lubina y en carne fresca de cerdo y pollo (Figura 6.6) procedían únicamente de las dietas empleadas en cada caso.

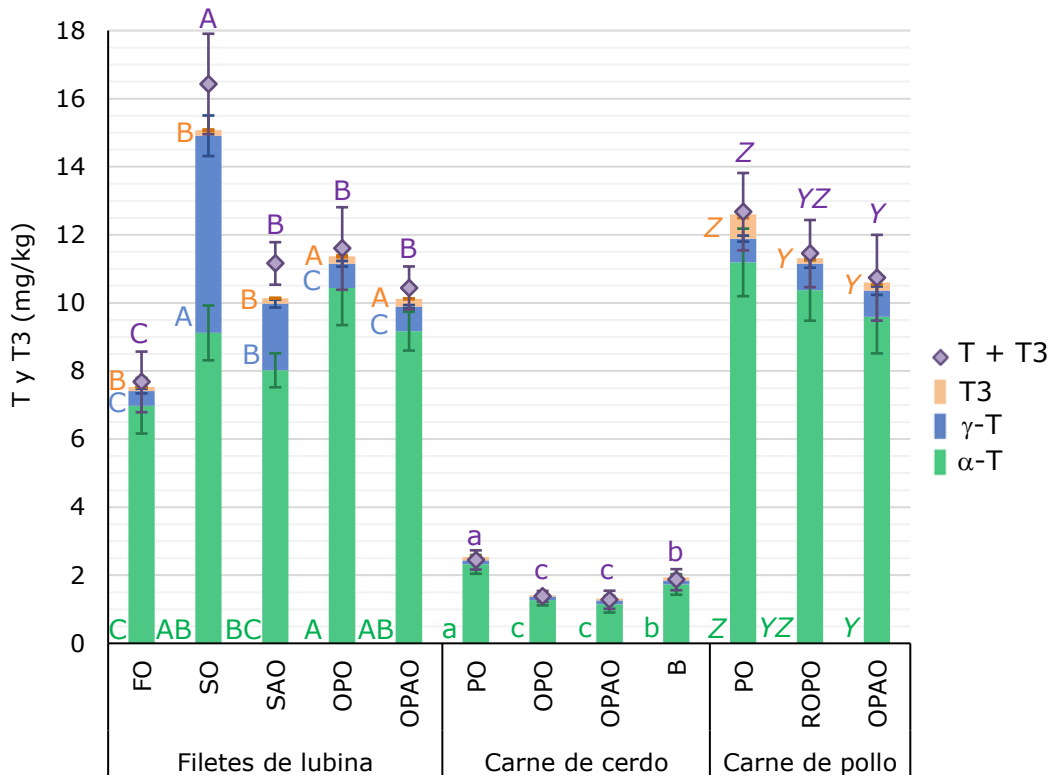


Figura 6.6 Composición en tocoferoles y tocotrienoles del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio.

Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de cada tratamiento dietético ($n = 5$ para filete de lubina; $n = 8$ para carne de cerdo y carne de pollo). Las diferencias entre tratamientos dietéticos (ANOVA; $p < 0,05$) reveladas con el test post hoc de Scheffé están representadas en filete de lubina ($n = 25$) por $A > B > C$; en carne de cerdo ($n = 32$) por $a > b > c$; y en carne de pollo ($n = 24$) por $Z > Y$. Abreviaturas: T, tocoferol; T3, tocotrienol; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

En términos del efecto de la fuente lipídica adicionada a la dieta, el contenido en T y T3 del filete y de la carne frescos estaba sobre todo influido por el origen botánico de la misma, sin observarse un efecto atribuible al hecho de ser un aceite crudo, refinado o un AO. En este sentido, el uso de OPAO en alimentación animal dio lugar a un contenido similar de T + T3 en filete de pescado y carne y a una composición en T y T3 parecida al uso de OPO en piensos de lubina y cerdo, o al empleo de ROPO en piensos de pollo. En el caso de la adición de SAO en dietas para lubinas, se obtuvieron filetes con una menor cantidad de T + T3 que en aquellos filetes procedentes de animales alimentados con SO. Esta diferencia en el contenido total, así como la variación en el perfil de T y T3 concuerda con la distinta composición

observada entre las dos fuentes lipídicas (apartado 6.1), que era debida a que SAO era una mezcla de AO con dos orígenes botánicos diferentes.

En todos los casos, el tocol mayoritario era el α -T independientemente de la especie animal y de la fuente lipídica adicionada a la dieta, siendo coherente con el hecho de que, generalmente, es la forma mayoritaria de la vitamina E en alimentos de origen animal (Sheppard et al., 1992). Además, esto concordaba con la composición de las dietas empleadas en los diferentes estudios, ya que en la formulación de todas ellas se empleó acetato de α -tocoferilo como fuente de vitamina E. La adición de acetato de α -tocoferilo a los piensos se realizó de acuerdo con los requerimientos nutricionales de cada especie, por lo que fue diferente en cada estudio (192,23 mg/kg en los piensos de lubina, 100 mg/kg en los de pollo y 15 mg/kg en los de cerdo). Los valores más bajos de α -T y, consecuentemente, de T + T3 se obtuvieron para la carne de cerdo, lo que concuerda con la menor adición de acetato de α -tocoferilo y con la menor cantidad de grasa adicionada a las dietas. Además, las muestras de carne de cerdo eran de *longissimus dorsi*, que se caracteriza por poseer una menor capacidad de depositar T y T3 que otros músculos del cerdo (O'Sullivan et al., 1997). A pesar de los bajos niveles de T y T3 encontrados en el lomo de cerdo, el efecto de la fuente lipídica era notable tanto en T + T3 como en α -T, siendo superiores cuando se empleaba la dieta con PO. Además, el elevado contenido en T3 de la PO (apartado 6.1) se reflejaba en la carne de cerdo procedente de animales alimentados con un 5% o un 2,5% de esta grasa, siendo el α -T3 cuantificable únicamente en estos dos casos. En la carne de pollo el α -T3 era cuantificable en todos los casos, pero este rasgo distintivo de la PO era más evidente que en la carne de cerdo, ya que la concentración de α -T3 en carne era superior al usar PO en la dieta que al emplear dietas con ROPO u OPAO. Al igual que en cerdo, la carne de pollo procedente de la dieta con PO poseía los niveles más elevados de α -T y de T + T3. Aunque la mayor cantidad de acetato de α -tocoferilo se empleó en las dietas para lubinas, el contenido de α -T en el filete de lubina (media de 8,74 mg/kg) era generalmente igual o inferior que al observado en la carne de pollo (media de 10,38 mg/kg). De hecho, comparando el uso de OPAO en piensos de lubina y de pollo, la concentración de α -T en filete de lubina (9,17 mg/kg) y en carne de pollo (9,59 mg/kg) era similar, aunque el pienso de lubina con OPAO poseía un nivel de α -T (217,13 mg/kg) mucho más elevado que los piensos con OPAO empleados en el estudio con pollos (96,09 mg/kg en la de crecimiento y 97,7 mg/kg en la de finalización).

Esto podría deberse a las diferencias en la eficacia de absorción o en el metabolismo del α -T entre las dos especies. Según la información bibliográfica existente, en general el pescado suele contener niveles de α -T moderados o bajos, pero pueden llegar a ser superiores a los encontrados en carne (Venugopal y Shahidi, 1996; Afonso et al., 2015; Petricorena, 2015). Este posible mayor contenido en pescado podría deberse a que los peces presentan una mayor tendencia a generar unos niveles superiores de defensas, que incluyen la expresión de enzimas antioxidantes y el depósito de sustancias antioxidantes, como el α -T, para compensar el elevado depósito de n-3 LC-PUFA en las membranas (Mourente et al., 2007; Fujisawa et al., 2010). Sin embargo, la mayor tendencia a sufrir reacciones de oxidación que presenta este tipo de FA, podría conllevar una mayor acción de estos mecanismos de defensa biológicos para mantener la integridad de las membranas celulares, provocando una reducción del contenido de α -T en músculo (Secci y Parisi, 2016). Por otro lado, las muestras de pollo estaban compuestas, además de por piel y tejido adiposo, por músculos oxidativos (también conocidos como fibras musculares rojas o *dark muscles*), que presentan una mayor capacidad de depositar α -T que los no oxidativos (Jensen et al., 1998). Sin embargo, en los filetes de lubina predominaba el denominado músculo alto glucolítico y anaeróbico (denominadas también como fibras musculares blancas o *white muscle*), que constituye el 90 – 95% de todo el músculo en la mayoría de las especies de peces (Kiessling et al., 2006) y que presenta en general una menor tendencia a depositar α -T que los músculos oxidativos.

Aunque en ciertas especies de peces se ha visto que un factor que puede influir en los requerimientos nutricionales de α -T es el contenido de PUFA de la dieta (Mai et al., 2022), existe una controversia acerca del posible efecto de la proporción de este tipo de FA en la cantidad de α -T depositada en los tejidos de estos animales (Hamre, 2011). Considerando los resultados obtenidos en la composición de los filetes de lubina en esta tesis doctoral, el nivel de α -T encontrado en ellos era independiente de su composición en FA, reflejando la concentración de este tocol presente en la dieta usada en cada caso. Así, aunque en el estudio con lubinas fue donde se adicionó un mayor contenido de acetato de α -tocoferilo a los piensos, también fue el estudio donde la fuente lipídica empleada en cada dieta produjo una mayor variabilidad en el contenido de T y T3 de los alimentos de origen animal evaluados. Este mayor efecto de la fuente lipídica puede deberse tanto a las grandes diferencias observadas en la composición de T y T3 entre el FO, el SO, el SAO y los dos aceites con origen de oliva (OPAO y OPO) (apartado 6.1), como a la mayor

proporción de fuentes lipídica empleada en la elaboración de las dietas en comparación con la usada en los otros dos estudios (apartado 4).

El perfil de FA (Figura 6.5) y el contenido en T y T3 (Figura 6.6) de los filetes de lubina, la carne de pollo y de cerdo muestran que la composición lipídica de estos alimentos reflejaba la de la correspondiente dieta, estando ambos afectados sobre todo por el origen botánico de la fuente lipídica adicionada en cada caso y por la cantidad de acetato de α -tocoferilo empleada en la formulación de las dietas. Por tanto, en ninguno de los tres estudios se apreció un efecto en la composición lipídica de los alimentos de origen animal que estuviera asociado al uso de AO.

6.3 Oxidación lipídica del filete de pescado y de la carne

Por un lado, la oxidación lipídica primaria del filete de lubina y de la carne de pollo y de cerdo fue evaluada con el método del naranja de xilenol (FOX, *Ferrous oxidation-Xylenol orange method*) tras 30 minutos de incubación, encontrando en la mayoría de los casos un contenido de hidroperóxidos lipídicos (LHP, *Lipid hydroperoxide*) menor que el límite de cuantificación [0,04 mmol de hidroperóxido de cumeno (CHP, *Cumene hydroperoxide*)/kg]. De hecho, solo se obtuvieron niveles de LHP cuantificables en el filete de lubina tras la refrigeración y en la carne de cerdo refrigerada procedente de OPAO. En los filetes de lubina refrigerados, el contenido de LHP era más elevado cuando se usó el 100% del FO que cuando se sustituyó parcialmente por OPO (apartado 5.1). La sustitución del FO por los AO resultó en la obtención de niveles similares de LHP que los observados cuando el FO se reemplazó por los aceites crudos.

Por otro lado, la estabilidad oxidativa se evaluó aplicando el método de FOX con la determinación del valor final de LHP una vez que la formación de LHP en el medio de reacción era estable (tras 96 h de incubación en los filetes de lubina y en la carne de pollo y tras 72 h en la carne de cerdo) (ver apartado 4.6). Los resultados del valor final de LHP se muestran representados en la Figura 6.7.

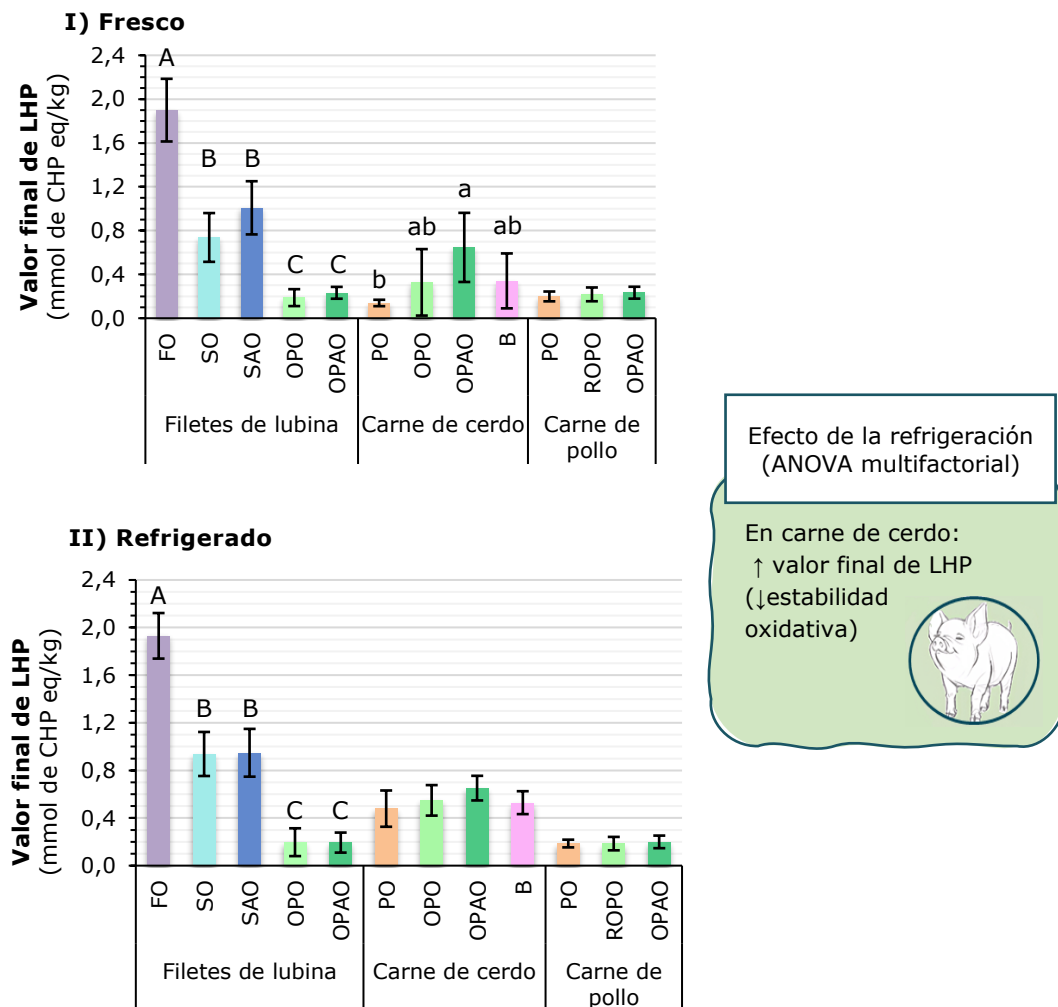


Figura 6.7 Estabilidad oxidativa o valor final de hidroperóxidos lipídicos de los filetes de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco (I) y tras la refrigeración en condiciones comerciales (II).

Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de cada tratamiento dietético ($n = 5$ para filete de lubina; $n = 8$ para carne de cerdo y carne de pollo). Las diferencias entre tratamientos dietéticos (ANOVA; $p < 0,05$) reveladas con el test post hoc de Scheffé están representadas en filete de lubina fresco ($n = 25$) y refrigerado ($n = 25$) por $A > B$; y en carne de cerdo fresca ($n = 32$) por $a > b$. Abreviaturas: LHP, hidroperóxido lipídico; CHP, hidroperóxido de cumeno; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre el valor final de LHP con el uso de AO y del correspondiente aceite crudo o refinado. Un valor final de LHP mayor indica una menor estabilidad oxidativa, por lo que la menor estabilidad se observó en el caso de los filetes de lubina procedentes de la dieta FO. En ese estudio fue donde se apreció una mayor variabilidad en función de la fuente lipídica (p. ej. entre FO y OPO) adicionada a la dieta debido a la variada tipología de estas. Sin embargo, ciertas diferencias en esta composición no se vieron reflejadas en la estabilidad oxidativa. Por ejemplo, aunque los filetes procedentes de la dieta con SO presentaban el mayor contenido de T + T3, la mejora en la estabilidad oxidativa al usar el SO con respecto al uso del 100% de FO era similar a la obtenida cuando se empleó el SAO. La sustitución parcial del FO en las dietas de lubina por el OPO o el OPAO dio lugar a la mayor estabilidad oxidativa en filete, con valores finales de LHP similares ($\approx 0,20$ mmol de CHP/kg) a los obtenidos en la carne de pollo procedente de las dietas con OPAO y ROPO. Esto puede deberse a que, a pesar del mayor contenido en n-3 LC-PUFA de los filetes de pescado, el contenido en α -T observado en filete de lubina y carne de pollo procedente de OPO, OPAO y ROPO era similar. En la carne de pollo, la estabilidad oxidativa observada con el uso del OPAO en las dietas era similar también a la de la carne procedente de piensos con PO, aunque este último tipo de carne mostraba un contenido superior en α -T. En el estudio con cerdos, la carne obtenida con la adición de un 5% de OPAO a las dietas únicamente presentaba diferencias en términos de estabilidad oxidativa con respecto a PO, siendo inferior en el caso de OPAO. Sin embargo, estas diferencias entre el impacto de las dietas con PO y OPAO en la estabilidad oxidativa de la carne de cerdo desaparecieron tras la refrigeración.

En cuanto a la oxidación secundaria, en los resultados del índice del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, *2-Thiobarbituric acid*) del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo en fresco, representados en la Figura 6.8 I, solo se encontró una dependencia de la fuente lipídica empleada en el caso de los filetes de lubina, observando valores superiores con el uso de la dieta con un 100% de FO. Así, *el uso de AO en los piensos produjo un valor de TBA en filete de lubina, carne de cerdo y carne de pollo frescos similar al obtenido con el uso de aceites crudos o refinado de un origen botánico similar.*

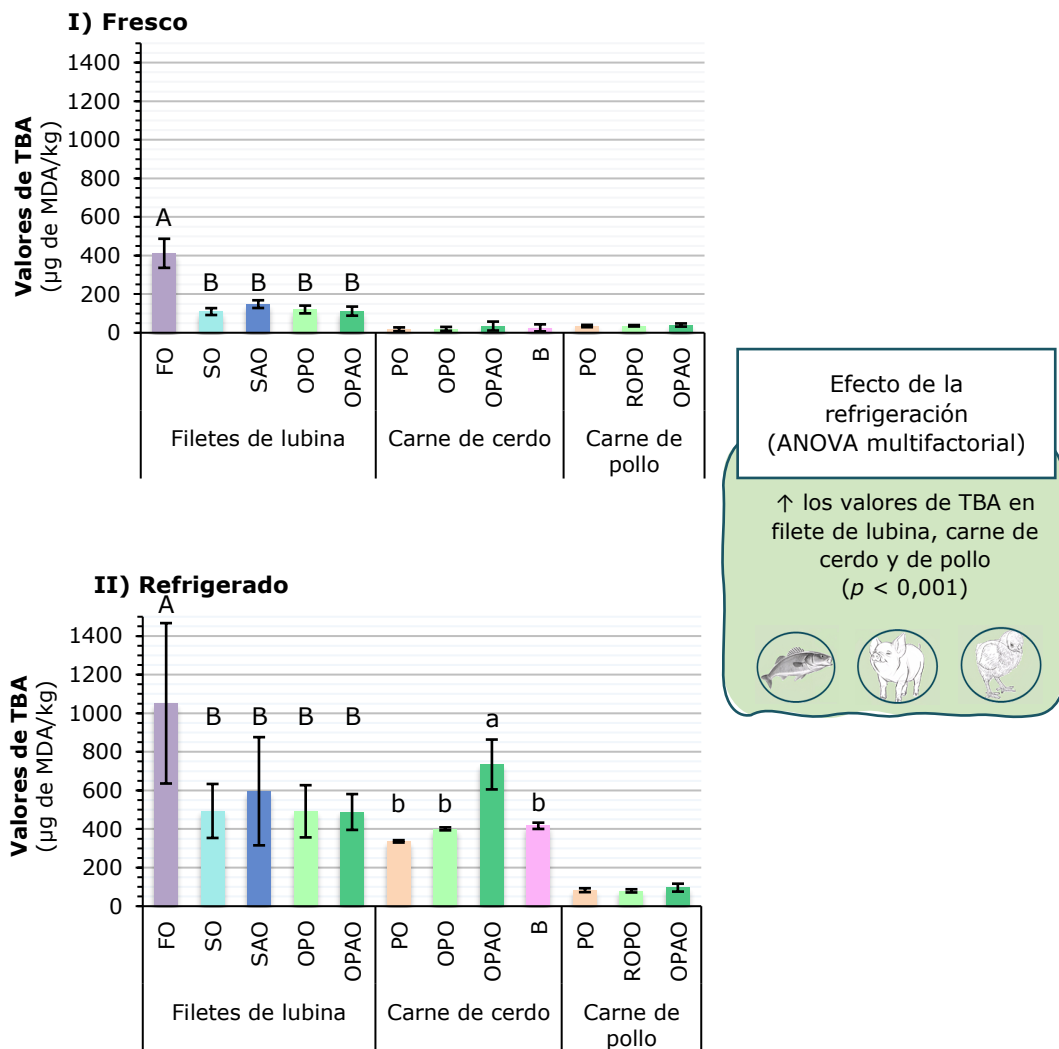


Figura 6.8 Valores del índice del ácido 2-tiobarbitúrico del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco (I) y tras la refrigeración en condiciones comerciales (II). Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de cada tratamiento dietético ($n = 5$ para filete de lubina; $n = 8$ para carne de cerdo y carne de pollo). Las diferencias significativas entre tratamientos dietéticos (ANOVA; $p < 0,05$) observadas con el test post hoc de Scheffé se encuentran indicadas como $A > B$ para filetes de lubina frescos ($n = 25$) y refrigerados ($n = 25$) y como $a > b$ para carne de cerdo refrigerada ($n = 32$). Abreviaturas: TBA, índice del ácido 2-tiobarbitúrico; MDA, malondialdehído; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

Tras la refrigeración (Figura 6.8 II), el efecto de la dieta sobre el índice de TBA de los filetes de lubina era el mismo que el observado en los filetes frescos, mientras que en el caso de la carne de pollo seguía sin estar afectado por la dieta empleada. En el estudio con cerdos, el índice de TBA de la carne refrigerada sí que dependía de la dieta usada, siendo el único caso en el que la adición de un AO produjo un efecto diferente a su correspondiente aceite crudo o refinado. Concretamente, el uso de un 5% de OPAO en las dietas supuso la obtención de un índice de TBA más elevado en la carne refrigerada en las condiciones de almacenamiento estudiadas (Figura 6.8). Sin embargo, el uso de este OPAO en un 2,5% junto con un 2,5% de la PO en piensos de cerdo, no supuso ningún efecto en el índice de TBA en comparación con el empleo del OPO o de la PO.

Los resultados obtenidos para el índice de TBA en los diferentes alimentos de origen animal en fresco revelaron que la oxidación secundaria era más elevada en el filete de lubina que en la carne. Tanto estas diferencias genéricas como las encontradas en los filetes de lubina procedentes de la dieta con 100% de FO, reflejaban la mayor tendencia a la oxidación que presentan los n-3 LC-PUFA. Sin embargo, la mayor proporción de PUFA observada en los filetes procedentes de SO y SAO con respecto a aquellos obtenidos con OPO y OPAO no supuso diferencias en los valores de TBA ni en fresco ni tras la refrigeración (Figura 6.8), aunque los primeros (SO y SAO) mostraron una menor estabilidad oxidativa que los segundos (OPO y OPAO) (Figura 6.7). En cuanto a la carne fresca, el índice de TBA de carne de cerdo y de pollo fue similar, siendo ligeramente inferior en la de cerdo. Aunque el índice de TBA aumentó en todos los casos tras la refrigeración en las condiciones comerciales específicas para cada escenario estudiado, el incremento fue proporcionalmente más pronunciado en la carne de cerdo que en el filete de lubina y que en la carne de pollo (Tabla 6.2). De hecho, según los valores de TBA (Figura 6.8), la oxidación lipídica estaba más avanzada en la carne de cerdo refrigerada procedente de la dieta con un 5% de OPAO que en el filete de lubina refrigerado obtenido al adicionar este tipo de AO al pienso en un 11,55%.

Tabla 6.2 Valor relativo del índice de TBA obtenido en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo tras la refrigeración en condiciones comerciales con respecto al obtenido en las correspondientes muestras frescas.

	Fuente lipídica	Ratio¹
Filetes de lubina	FO	2,6
	SO	4,5
	SAO	4,0
	OPO	4,1
	OPAO	4,4
	PO	18,8
Carne de cerdo	OPO	20,0
	OPAO	21,2
	B	16,4
	PO	2,4
Carne de pollo	ROPO	2,2
	OPAO	2,4

¹Ratio entre el índice de TBA en filete o carne refrigerados y el índice de TBA en filete o carne frescos.

En cuanto a los compuestos volátiles, las diferencias en la composición química y en el grado de oxidación entre los filetes de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo conllevaron la identificación de distintos compuestos volátiles en cada caso (Figura 6.9). Por ejemplo, el (Z)-4-heptenal, el 1-penten-3-ol y el (Z)-2-penten-1-ol fueron identificados únicamente en los filetes de lubina, siendo el 1-penten-3-ol uno de los compuestos mayoritarios en este tipo de muestra. En carne de cerdo, se identificaron dos cetonas (2-heptanona y 3-octanona) que no se observaron ni en los filetes de lubina ni en la carne de pollo. Aunque existiese una mayor similitud en el perfil de FA entre los dos tipos de carne con respecto al filete de lubina, solo existían tres compuestos (1-pentanol, 1-hexanol y 1-octen-3-ona) comunes a ambos tipos de carne que no se encontraron en el filete de lubina. En cambio, había cinco compuestos (propanal, pentanal, heptanal, octanal y la 2-octanona) que se identificaron tanto en los filetes de lubina como en la carne de cerdo, pero no en la de pollo. El menor número de compuestos volátiles identificados en la carne de pollo era coherente con el menor desarrollo de oxidación lipídica observada en este caso.

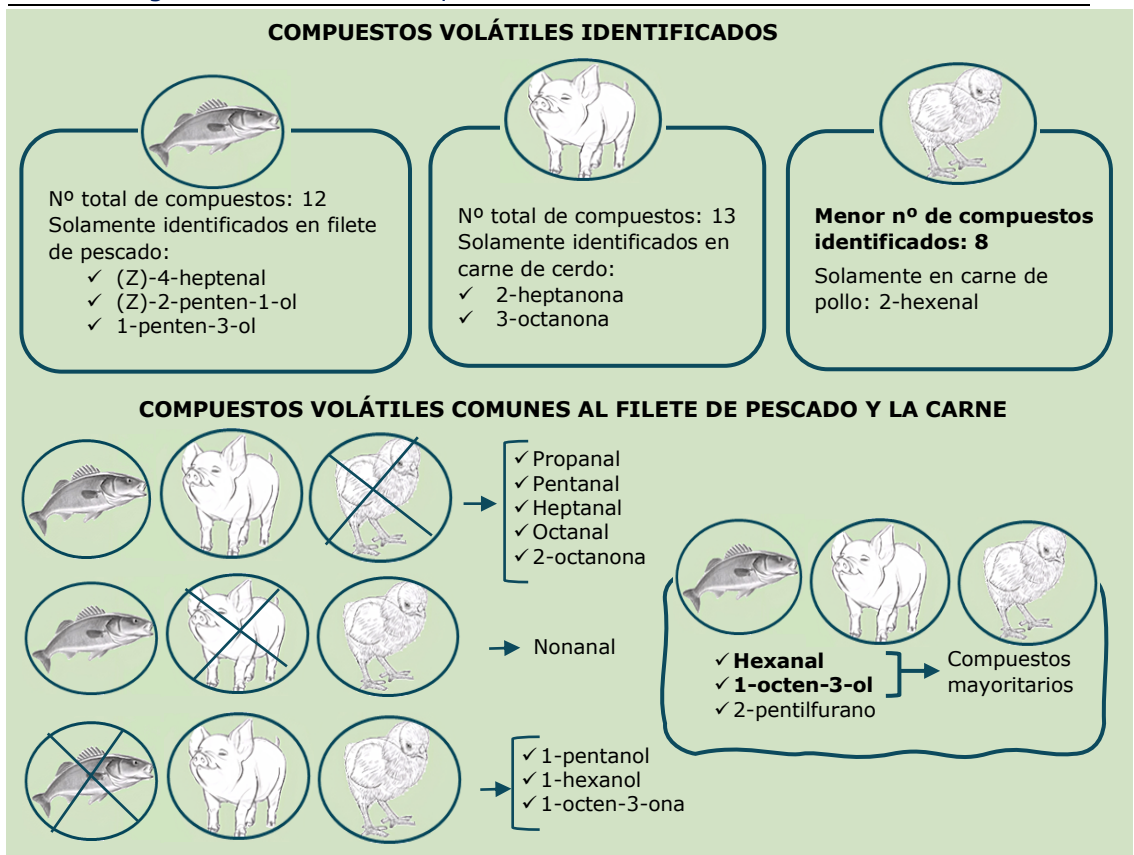
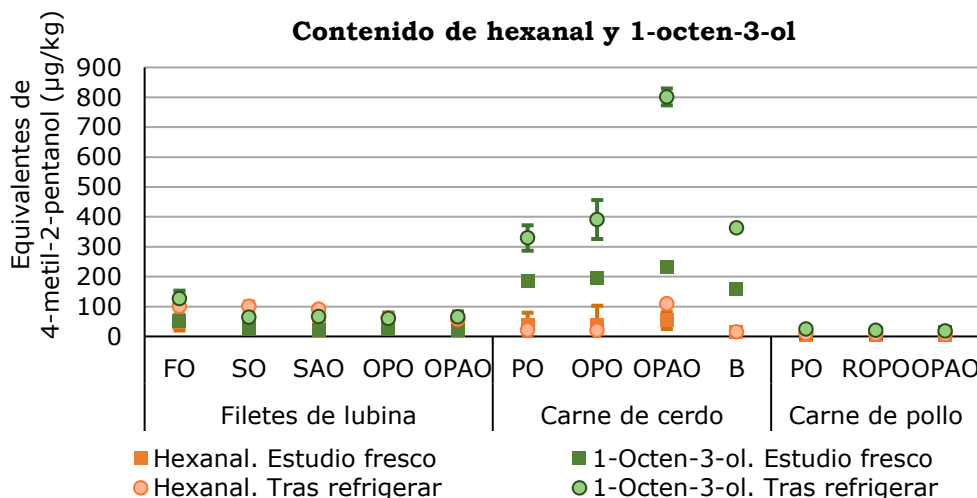


Figura 6.9 Resumen de los compuestos volátiles identificados en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio.

A pesar de estas diferencias, en los tres casos destacaban como compuestos principales el 1-octen-3-ol y el hexanal (Figura 6.9), ambos relacionados con la oxidación de PUFA n-6. Estos resultados pueden ser sorprendentes en los filetes de lubina, ya que presentaban contenidos relativamente elevados de EPA y DHA, que son el tipo de FA con mayor tendencia a oxidarse. Además, aunque en filete de lubina existía una mayor concentración de compuestos volátiles procedentes de la degradación de PUFA n-3, como el propanal (Shahidi, 2001), que en la carne, tampoco se observó una correlación entre los compuestos volátiles identificados y el diferente perfil de FA obtenido en función del tipo de fuente lipídica empleada en la dieta. La mayor formación de compuestos volátiles procedentes de PUFA n-6 en comparación con los procedentes de PUFA n-3 en filete de lubina se puede deber a que, tal y como han revelado diversos estudios, el EPA y el DHA podrían mostrar una mayor estabilidad oxidativa cuando forman parte de sistemas biológicos que cuando son evaluados *in vitro*, puesto que en el primer

escenario mencionado están eficazmente protegidos por los diferentes mecanismos antioxidantes (Kazuo, 2019).

La concentración de 1-octen-3-ol y hexanal en los filetes de lubina y carne de cerdo y de pollo tanto en fresco como tras la refrigeración se muestra en la Figura 6.10.



Resumen de los test estadísticos

Efecto de la dieta
(ANOVA; test post hoc de Scheffé)

En filete fresco y refrigerado
FO valor más alto de 1-octen-3-ol

En carne refrigerada:
OPAO valor más alto de ambos compuestos

Efecto de la refrigeración
(ANOVA multifactorial)

- ✓ Hexanal: ↑ en filete de lubina ($p < 0,001$) y en carne de pollo ($p = 0,002$)
- ✓ 1-octen-3-ol: ↑ en todos los casos ($p < 0,001$)

Figura 6.10 Concentración de hexanal y 1-octen-3-ol del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco y tras la refrigeración en condiciones comerciales.

Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de cada tratamiento dietético ($n = 5$ para filete de lubina; $n = 8$ para carne de cerdo y carne de pollo). Abreviaturas: FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

Dentro de cada estudio, el 1-octen-3-ol reveló las mismas diferencias que el índice de TBA, obteniendo valores más elevados de ambos en los filetes frescos y refrigerados de lubina procedentes de la dieta con 100% de FO y en carne de cerdo refrigerada procedente de OPAO. De hecho, el único caso en el que el uso de un AO en las dietas supuso un contenido más elevado tanto de este alcohol como del hexanal fue en la carne refrigerada de cerdo.

Los niveles de hexanal y 1-octen-3-ol aumentaron tras la refrigeración del filete de lubina y de la carne de pollo en las condiciones de almacenamiento aplicadas, pero en la carne de cerdo este incremento solo se observó para el 1-octen-3-ol. Al igual que ocurre con los valores de TBA, en la carne de cerdo se produjo un aumento de la concentración del 1-octen-3-ol tras la refrigeración mucho más pronunciado que el observado en los filetes de lubina. Por tanto, el estudio del 1-octen-3-ol proporciona la misma información relativa al efecto de la dieta y de la refrigeración que los valores de TBA en el filete de lubina y en los dos tipos de carne. Esto corrobora la correlación del contenido de este alcohol en filete de lubina, carne de cerdo y de pollo con la oxidación lipídica y que, entre los compuestos volátiles identificados, es el indicador óptimo de oxidación lipídica en estos casos. Sin embargo, el compuesto volátil más ampliamente empleado como indicador de la oxidación lipídica es el hexanal (Jimenez-Alvarez et al., 2008; Ma et al., 2020), aunque en pescado diversos autores han sugerido otros aldehídos (propanal y heptanal) como mejores indicadores (Augustin et al., 2006; Ross y Smith, 2006). Esto enfatiza la importancia de evaluar todos los compuestos volátiles existentes en este tipo de alimentos, en vez de focalizar la atención en un compuesto determinado.

Tal y como se ha comentado, los diferentes parámetros de oxidación secundaria muestran que durante la refrigeración en condiciones comerciales se produce un avance de las reacciones de oxidación lipídica en todos los casos, pero este avance es mayor en la carne de cerdo, sobre todo en la procedente de OPAO (Tabla 6.2). Esto concuerda con la menor estabilidad oxidativa observada en carne de cerdo fresca y refrigerada procedente de la dieta OPAO en comparación con los filetes de lubina frescos y refrigerados procedentes de la dieta con OPAO (Figura 6.7). Sin embargo, según la composición en FA de los filetes de lubina y los dos tipos de carne y a pesar de las diferentes condiciones de refrigeración empleadas en cada caso, cabría esperar que el desarrollo de reacciones de oxidación lipídica fuese superior en los filetes de lubina debido a su elevada proporción de n-3 LC-PUFA. Además, entre los dos tipos de carne

(de cerdo y de pollo), aunque la composición en FA era similar, cabría esperar una mayor oxidación lipídica tras la refrigeración en la carne de pollo, ya que esta última suele ser más propensa a sufrir reacciones de oxidación lipídica (Chan et al., 1994). Asimismo, las muestras de pollo contenían, además de tejido adiposo y piel, tejido muscular compuesto esencialmente por fibras musculares rojas (oxidativas) propias de las patas de estos animales. Este tipo de fibras musculares se caracterizan por poseer una mayor proporción de lípidos, de hemoproteínas y de hierro inorgánico que las fibras musculares blancas (glucolíticas) (Liu y Xiong, 1996), como las que forman parte del lomo de cerdo.

Por tanto, el factor determinante del mayor aumento proporcional de la oxidación tras la refrigeración en la carne de cerdo en comparación con los filetes de lubina y la carne de pollo (Tabla 6.2) es la ínfima concentración de α -T observada en este tipo de muestra con respecto a los otros dos (Figura 6.6). De hecho, el estudio con cerdos es el único caso en el que tanto el contenido de α -T como la estabilidad oxidativa (Figura 6.7) disminuyen significativamente tras la refrigeración en condiciones comerciales. Esto da a entender que la cantidad de α -T en el lomo de cerdo y, por tanto, de las dietas, era insuficiente para prevenir eficazmente las reacciones de oxidación lipídica durante este periodo de refrigeración comercial. Teniendo en cuenta las recomendaciones nutricionales para cerdo, la cantidad de acetato de α -tocoferilo adicionada en los piensos del estudio era equivalente a la mínima necesaria para garantizar un crecimiento animal óptimo (15 – 40 mg/kg) (Jensen et al., 1998; FEDNA, 2013). Sin embargo, en los piensos para pollo se adicionó una cantidad de este compuesto muy superior (100 mg/kg) a la recomendada (15 – 20 mg/kg) (Jensen et al., 1998; FEDNA, 2018). A pesar de la baja capacidad de depositar α -T que posee el músculo *longissimus dorsi* en cerdo, existen estudios que demuestran que es posible obtener concentraciones bastante más elevadas en este músculo que las observadas en este estudio, aunque la información sobre el límite que es posible alcanzar es controvertida (Jensen et al., 1998; Ghidurus et al., 2017). En la revisión bibliográfica realizada por Jensen et al. (1998), se recoge un valor de 11,1 mg/kg de α -T en *longissimus dorsi* al suplementar la dieta con 700 mg/kg de acetato de α -tocoferilo, mientras que, según la información publicada por Ghidurus et al. (2017) el máximo nivel que se puede alcanzar de α -T en tejidos de cerdo, según estimaciones con modelos matemáticos, es de 6,4 mg/kg. También se ha demostrado que en la mayoría de casos un incremento en el contenido de α -T en *longissimus dorsi* produce una reducción de la oxidación

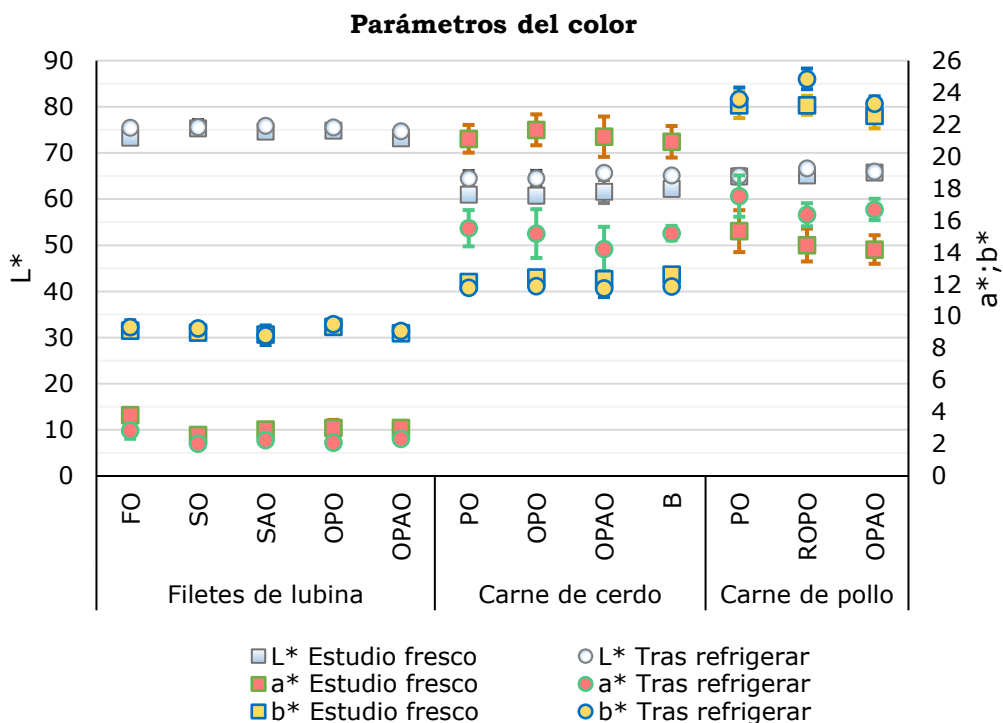
lipídica (Jensen et al., 1998). Consecuentemente, una mayor suplementación de las dietas de cerdo con acetato de α -tocoferilo hubiera conllevado un aumento en la concentración de α -T en el lomo de cerdo, mejorando con ello la estabilidad oxidativa y previniendo de manera más efectiva el desarrollo de reacciones de oxidación lipídica durante la refrigeración.

En resumen, el único caso en el que se observó un efecto negativo del uso de AO con respecto al empleo del correspondiente aceite crudo o refinado en alimentación animal fue en la mayor oxidación lipídica observada en la carne de cerdo refrigerada procedente del uso de un 5% del OPAO en la dieta. Este OPAO presentaba una calidad inferior, debido a la elevada proporción de I y de MIU total, a la de los otros AO empleados en esta tesis y a la encontrada habitualmente en AO similares en el mercado nacional, lo que podría haber influido en este comportamiento diferente. Sin embargo, es posible que el empleo de una cantidad superior de acetato de α -tocoferilo en los piensos de cerdos hubiera conllevado una prevención más efectiva del desarrollo de oxidaciones lipídicas en la carne de cerdo durante la refrigeración, haciendo desaparecer las diferencias observadas con el uso de este OPAO al 5%. Aun así, en las condiciones del estudio con cerdos, el empleo de OPAO dio lugar a parámetros de oxidación lipídica similares al uso de OPO o de PO cuando se adicionó en un 2,5% en los piensos junto con otro 2,5% de PO (tratamiento dietético B). Esto implica que, desde el punto de vista de la composición lipídica y la oxidación lipídica del filete de pescado y de la carne, todos los AO estudiados en esta tesis son fuentes lipídicas adecuadas para alimentación animal, aunque las proporciones o las condiciones en las que pueden ser usadas dependen de su composición.

6.4 Color y aceptación sensorial del filete de pescado y de la carne

Tal y como se ha comentado en los antecedentes (apartado 2.3.3), tanto el color como la aceptación sensorial del filete de pescado y de la carne pueden verse afectados cuando se producen reacciones de oxidación lipídica y ambos presentan un papel fundamental para que estos productos sean atractivos para los consumidores. Por un lado, el color de los alimentos es la primera percepción que poseen los consumidores para juzgar la calidad que presentan los alimentos. Esto hace que mantener un color atractivo sea uno de los objetivos primordiales en la industria alimentaria y, por tanto, que se hayan desarrollado diferentes maneras objetivas de determinar esta propiedad. Sin embargo, existe una gran variabilidad de espacios de color y de condiciones instrumentales entre los estudios encontrados en la bibliografía. Además, como ya se ha descrito en el apartado 2.3.3, las modificaciones de color suelen asociarse a variaciones en el área superficial de los alimentos, por lo que suele estudiarse sobre la superficie de estos. Por el contrario, en esta tesis doctoral el color del filete de pescado y de la carne, al igual que las demás determinaciones analíticas, se evaluó tras la homogeneización de las muestras (apartado 4).

En términos de espacio de color, el más comúnmente empleado es el CIE $L^*a^*b^*$, en el que cada color queda definido por tres coordenadas diferentes: L^* (*Lightness*) que mide la luminosidad en una escala de 0 (más oscuro) a 100 (más luminoso), a^* (*Redness*) que determina tonalidades desde el verde ($-a^*$) hasta el rojo ($+a^*$) y b^* (*Yellowness*) que representa tonalidades desde el azul ($-b^*$) hasta el amarillo ($+b^*$). La Figura 6.11 muestra los valores de L^* , representados en el eje principal, de a^* y de b^* , representados en el eje secundario, obtenidos en los filetes de lubina, carne de cerdo y carne de pollo frescos y refrigerados.



Resumen de los test estadísticos

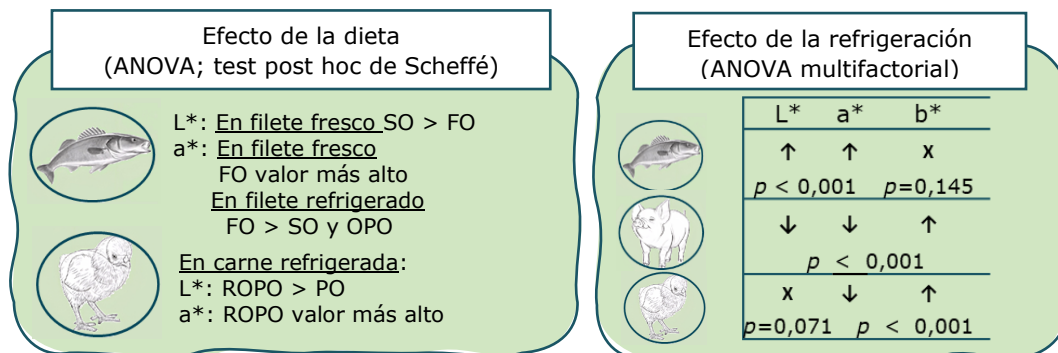


Figura 6.11. Parámetros del color medidos en el espacio CIE L*a*b* del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco y tras la refrigeración en condiciones comerciales. Los resultados están representados como la media y la desviación estándar de cada tratamiento dietético (n = 5 para filete de lubina; n = 8 para carne de cerdo y carne de pollo). Abreviaturas: L*, luminosidad; a*, coordenada rojo/verde; b*, coordenada amarillo/azul; FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

De acuerdo con los resultados de color obtenidos, la dieta afectó significativamente al color de los filetes de lubina frescos (en L^* y a^*) y refrigerados (en a^*) y de la carne de pollo refrigerada (en L^* y b^*). El único caso en el que el uso de un AO produjo una diferencia con respecto al uso de un aceite crudo o refinado de origen botánico similar fue en el tono amarillo (b^*) de la carne refrigerada de pollo, que se observó con el uso de OPAO en las dietas. Sin embargo, este valor era similar al de la carne de pollo refrigerada procedente del empleo de PO. De hecho, considerando los valores del parámetro ΔE y los intervalos de *National Bureau of Standards Units* (NBS) aplicados a color en carne por Pogorzelska et al. (2018) (ver Tabla 4.3), los cambios en el color de la carne de pollo refrigerada serían “ligeramente detectables” (“*slight*”) al usar el OPAO en vez de la PO, mientras que podrían ser “notables” (“*noticable*”) al comparar el uso del OPAO con el del ROPO. Consecuentemente, se podría considerar que el uso de los AO en dietas para animales en ningún caso ocasionó modificaciones de color que pudiesen considerarse apreciables (“*apreciable*”) por el ojo humano. Esto puede deberse a que la cantidad de pigmentos con capacidad de transferir color aportada por las diferentes fuentes lipídicas era menor que la aportada por el resto de los ingredientes, comunes a todos los piensos.

En la Figura 6.11 se puede observar que los filetes de lubina presentaban una mayor luminosidad y unas tonalidades rojas y amarillas inferiores que los dos tipos de carne. En el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ las coordenadas a^* y b^* son las componentes cromáticas y de tonalidad del color y presentan una clara dependencia con los niveles de pigmentos (Purslow et al., 2020). Concretamente en carne, especialmente si es carne roja, las coordenadas a^* y b^* están relacionadas con la mioglobina y sus estados de oxidación (apartado 2.3.3). En general, los músculos de los peces son mayoritariamente músculos blancos o glucolíticos (90 – 95%), por lo que los filetes de pescado suelen presentar un menor contenido en pigmentos que la carne, sobre todo si esta procede de animales mamíferos (Zhang et al., 2017), lo que justifica los menores valores de a^* y b^* encontrados en los filetes de lubina (Figura 6.11). Por tanto, debido a este bajo contenido en pigmentos, el color de los filetes de pescado está relacionado principalmente con la composición fibrilar del músculo. La luminosidad (L^*) es la componente acromática del color, que depende de la manera en la que se disperse la luz cerca de la superficie sobre la que se mida el color. De esta manera, si existe una elevada dispersión de la luz por partículas, estructuras o interfases entre las fibras y miofibrillas musculares, gran parte de la radiación electromagnética será reflejada a

través de la superficie y, como resultado, el alimento parecerá más luminoso (Purslow et al., 2020). Por el contrario, si cerca de la superficie la difusión es baja y la radiación electromagnética incidente puede penetrar más profundamente en el alimento, la absorción por parte de los pigmentos presentes en el alimento será mayor y se apreciará más oscuro (Purslow et al., 2020).

En el caso del filete de pescado, los músculos están compuestos mayoritariamente por fibras de gran tamaño, con una baja densidad mitocondrial (Zhang et al., 2017), lo que parece estar relacionado con una menor transmitancia de la luz y una mayor dispersión de la misma (Purslow et al., 2020). Esto justificaría la mayor luminosidad observada en el filete de lubina en comparación con la carne de pollo y de cerdo, en las que los músculos que forman parte de ellas presentan una mayor heterogeneidad en la composición fibrilar que en los músculos de peces (Zhang et al., 2017). Así, en términos de luminosidad, los dos tipos de carne presentaban valores de L^* similares, ligeramente inferiores en la carne fresca de cerdo. Sin embargo, existía una gran diferencia en las coordenadas cromáticas del color (a^* y b^*). A la hora de comparar estas coordenadas, hay que tener en cuenta la adición de pigmentos comerciales que se realizó en los piensos de pollo. Por un lado, se empleó un pigmento comercial (añadido en concentraciones de 0,05 g/kg) rico en cantaxantina (niveles de 10 g/kg en el pigmento) para potenciar la tonalidad rojiza en la piel y la carne de pollo. No obstante, los valores de a^* eran inferiores en este tipo de carne fresca que en la de cerdo. Esto se puede deber a la posible mayor concentración de mioglobina que presentan generalmente los músculos de animales mamíferos, como los cerdos, en comparación con los de aves, como el pollo (Zhang et al., 2017). En la elaboración de los piensos de pollo se empleó también un pigmento comercial (en una concentración de 0,1 g/kg de pienso), que proporcionaba 40 g/kg de carotenoides amarillos (luteína y zeaxantina), lo que justifica la mayor tonalidad amarilla en la carne fresca de pollo en comparación con la de cerdo.

En cuanto a los cambios de color observados tras la refrigeración en las condiciones comerciales correspondientes en cada estudio, la luminosidad aumentó en el filete de lubina y en la carne de cerdo, pero en carne de pollo no se vio afectada. Tal y como se ha comentado en la discusión del artículo “*Effect of feeding olive pomace acid oil on pork lipid composition, oxidative stability, color and sensory acceptance*” (apartado 5.2), un aumento de la luminosidad en la carne de cerdo puede estar relacionado con un incremento de la

proporción de oximioglobina (Lindahl et al., 2001). Según la revisión bibliográfica realizada por Mancini y Hunt (2005), el empleo de atmósferas modificadas con elevado contenido en O₂ para la conservación de la carne puede promover la oxigenación de la mioglobina, por lo que el aumento de L* que se produce durante la refrigeración de la carne de cerdo podría ser debido al tipo de atmósfera modificada empleada (O₂/CO₂, 70/30). Sin embargo, la atmósfera modificada utilizada para la conservación del filete de lubina contenía únicamente un 30% de O₂ (CO₂/N₂/O₂, 40/30/30), lo que evidencia que existen otros factores que pueden producir un incremento de la luminosidad durante la refrigeración. Por un lado, según la revisión bibliográfica realizada por Singh et al. (2022), es habitual que durante el almacenamiento del pescado se produzca un incremento de la luminosidad debido a modificaciones conformacionales en pigmentos, concretamente en la hemoglobina y la mioglobina, y a la coagulación de proteínas. Por otro lado, según la revisión bibliográfica de Purslow et al. (2020), uno de los factores que puede estar detrás de este incremento de L* es la posible disminución del pH del alimento durante el almacenamiento. Concretamente, se ha sugerido que este descenso de pH puede incrementar la densidad de proteínas en el músculo, ocasionando un aumento en la refracción de la luz entre las miofibrillas que lo conforman (Purslow et al., 2020).

Otro parámetro que mostró el mismo comportamiento durante la refrigeración en el filete de lubina y en la carne de cerdo fue el color rojo, encontrando valores de a* inferiores tras la refrigeración en ambos tipos de muestra. La pérdida de la tonalidad roja ha sido relacionada frecuentemente con modificaciones en los estados de oxidación de la mioglobina (Lindahl et al., 2001), que se pueden producir de manera simultánea a las reacciones de oxidación lipídicas. Tal y como se puede observar en la Figura 6.11, la disminución de a* con la refrigeración fue mucho más pronunciada en la carne de cerdo que en el filete de lubina. Esto es coherente con el mayor contenido de mioglobina que suelen poseer los músculos de animales mamíferos en comparación con los músculos blancos de los peces. Además, podría estar relacionado con el mayor aumento relativo del índice de TBA con la refrigeración que se observó en la carne de cerdo (Tabla 6.2). Por el contrario, el parámetro a* de la carne de pollo aumentó significativamente tras la refrigeración. Este diferente comportamiento se puede deber al empleo de pigmentos comerciales en los piensos y a la menor oxidación lipídica observada tras la refrigeración en comparación con los filetes de lubina y la carne de cerdo.

El comportamiento de b^* observado con la refrigeración fue diferente en cada uno de los estudios realizados. Por un lado, el filete de lubina mantuvo la tonalidad amarilla tras el periodo de refrigeración. Un descenso de esta tonalidad ha sido relacionado con el desarrollo de la oxidación lipídica en pescado (Singh et al., 2022). Esto podría sugerir que, a pesar del aumento del índice de TBA y del contenido en compuestos volátiles observados con la refrigeración en filete de lubina, la oxidación lipídica no estaba tan desarrollada como para producir una modificación en el color amarillo. Sin embargo, en la carne de cerdo se observó un descenso significativo de b^* , que podría estar relacionado con cambios en los estados de oxidación de la mioglobina o con una menor reflectancia interna (Lindahl et al., 2001). Al contrario que en la carne de cerdo, en la carne de pollo se produjo un incremento de b^* tras la refrigeración. Este comportamiento inverso en la carne de pollo se puede deber a los carotenoides (cantaxantina, luteína y zeaxantina) añadidos en los piensos de pollo. Por un lado, los carotenoides pueden prevenir la oxidación de la oximioglobina, mejorando la estabilidad del color (Mortensen y Skibsted, 2000), evitando que se produzca un descenso de b^* . Por otro lado, estos carotenoides podrían haber sufrido cambios conformacionales en sus estructuras moleculares durante la refrigeración que podrían haber intensificado la tonalidad amarilla en la carne de pollo.

Considerando lo anteriormente comentado sobre el efecto de la refrigeración en las tres coordenadas del espacio CIE $L^*a^*b^*$ en el filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo, el único caso en el que se observó una modificación de las tres coordenadas fue en la carne de cerdo. Por tanto, este mayor cambio de color en la carne de cerdo fue reflejado en los valores más elevados de ΔE_R calculados para comparar muestras refrigeradas y frescas de un mismo tratamiento dietético. De hecho, el ΔE_R más elevado se obtuvo para la carne procedente de cerdos alimentados con un 5% de OPAO ($\Delta E_R = 8,13$). A pesar de estas diferencias numéricas en los valores de ΔE_R , de acuerdo con los intervalos de *National Bureau of Standards Units* (NBS), en todos los casos las modificaciones de color en la carne de cerdo producidas durante la refrigeración serían “muy apreciables” por el ojo humano. Este mayor cambio de color tras la refrigeración de la carne de cerdo procedente de la dieta con un 5% de OPAO podría estar relacionado con el mayor desarrollo de oxidación lipídica observada en esta carne. Los cambios en el color de la carne de pollo tras la refrigeración, independientemente de la fuente lipídica adicionada a la dieta, son bastante inferiores a los de la carne de cerdo ($\Delta E_R = 2,23 - 2,94$) y se podrían clasificar como “apreciables” por el ojo humano

(ver Tabla 4.3). En filete de lubina, los valores de ΔE_R revelaron un cambio superior en los filetes procedentes de la dieta con 100% de FO, presentando un ΔE_R similar a los observados en el caso de la carne de pollo. Esto implica que, a pesar de ser los filetes de lubina obtenidos con la dieta FO más susceptibles a la oxidación lipídica que los dos tipos de carne, el color de los primeros era más estable, lo que es coherente con el menor contenido de pigmentos presentes en los músculos de lubina. Así mismo, este menor contenido de pigmentos dificultaría la percepción de las modificaciones del color, requiriendo una mayor variación de las coordenadas para poder observar un cambio con el ojo humano. Por ello, el criterio aplicado para estimar si los cambios de color serían perceptibles por el ojo humano es diferente ($\Delta E > 5$), tal y como ha sido previamente considerado en lubina por Costa et al. (2011) (ver Tabla 4.3). Según este criterio, las modificaciones en el color de los filetes de lubina producidas durante la refrigeración serían “no perceptibles” por el ojo humano, independientemente de la fuente lipídica empleada en la dieta.

El último parámetro estudiado en esta tesis es la aceptación sensorial de los filetes de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo en fresco y tras la refrigeración en condiciones comerciales. La puntuación media obtenida en cada uno de los test hedónicos se encuentra representada en la Figura 6.12. En ningún caso se observaron diferencias significativas en la aceptación sensorial entre las dietas empleadas o un impacto de la refrigeración. Esto implica que, incluso cuando el uso de AO produjo un mayor avance de las reacciones de oxidación lipídica (concretamente en carne de cerdo refrigerada procedente del uso del OPAO al 5% en las dietas), la aceptación sensorial por parte de consumidores habituales de estos alimentos era similar a la observada con el uso de otras fuentes lipídicas en los piensos. En todos los casos las medias obtenidas de las puntuaciones eran similares entre ellas y siempre superiores a 5, que correspondía con la calificación intermedia de aceptabilidad (“ni me gusta, ni me disgusta”) de la escala hedónica empleada (Figura 6.12).

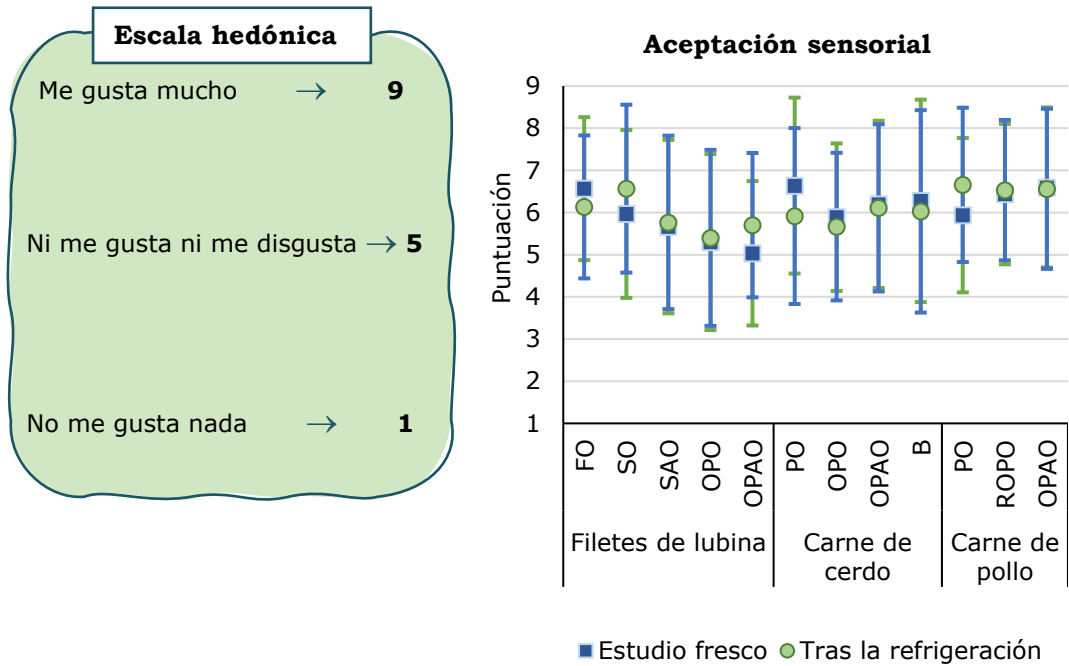


Figura 6.12 Resultados de los test hedónicos realizados para evaluar la aceptación sensorial del filete de lubina, la carne de cerdo y la carne de pollo procedente de los animales alimentados con las distintas fuentes lipídicas de estudio, en fresco y tras la refrigeración en condiciones comerciales.

Los resultados se muestran como la puntuación media y la desviación estándar obtenida para cada tratamiento dietético ($n = 30$ para el filete de lubina; $n = 36$ para la carne de cerdo y la carne de pollo). No se observó ningún efecto de la dieta empleada ni de la refrigeración en la aceptación sensorial de los filetes de pescado ni de la carne. FO, aceite de pescado; SO, aceite crudo de soja; SAO, aceite ácido de soja-girasol (55:45; p/p); OPO, aceite crudo de orujo de oliva; OPAO, aceite ácido de orujo de oliva; PO, manteca de palma; B, mezcla de PO y OPAO (50:50, p/p); ROPO, aceite refinado de orujo de oliva.

La ausencia de un efecto de la dieta en la aceptación sensorial puede ser llamativa en el filete de lubina, ya que es donde se observó una mayor diferencia en el perfil de FA en función de la fuente lipídica (p. ej. entre SO y OPO) empleada en la dieta. Tal y como se ha comentado en los antecedentes de esta tesis (apartado 2.3.3) y en el correspondiente artículo (apartado 5.1), una de las posibles consecuencias del reemplazo parcial o total de FO por fuentes lipídicas vegetales que ha sido reconocida en la bibliografía es la modificación de las características sensoriales del pescado (Turchini et al., 2009; Nasopoulou y Zabetakis, 2012; Oliva-Teles et al., 2015). Sin embargo, aunque la modificación del perfil de FA del pescado se produce siempre que se sustituye el FO en elevados porcentajes por aceites o grasas vegetales, la modificación de las propiedades organolépticas ocurre solo en algunos casos concretos. Con la información existente en la bibliografía es difícil estimar cuáles son las condiciones en las que cabe esperar una modificación de las características sensoriales. Por ejemplo, en el estudio realizado por Izquierdo et al. (2005) no se observaron diferencias en las características sensoriales del filete de dorada cuando FO fue sustituido en un 60% por aceite de linaza o de colza, pero sí cuando la sustitución se realizó en un 80%, independientemente del aceite empleado. En esta misma especie, la sustitución de un 75% de FO por una mezcla de SO y colza (50/50) en las dietas tampoco ocasionó una diferencia ni en las características sensoriales evaluadas ni en los parámetros L^* , a^* o b^* del filete de dorada (Álvarez et al., 2020). Esto podría indicar que existe un porcentaje límite de sustitución de FO por fuentes lipídicas vegetales en las dietas, por debajo del cual se puede realizar esta sustitución parcial sin que existan alteraciones en la aceptación sensorial del filete de pescado o del pescado obtenidos, a pesar de que exista una modificación en el perfil de FA. Este límite podría depender del tipo de aceite o de grasa vegetal empleada, de la especie estudiada y de la manera de evaluar la calidad sensorial (Oliva-Teles et al., 2015). Según los resultados de esta tesis, tanto para el uso de SO y SAO como de OPO y OPAO en piensos de lubina, este límite de sustitución parcial de FO sería superior al 75%.

Tal y como se ha comentado tanto en los antecedentes (apartados 2.3.2 y 2.3.3) como en los diferentes artículos que forman parte de esta tesis (apartado 5), un gran avance de la oxidación lipídica puede causar la generación de olores y sabores poco atractivos para los consumidores. Por este motivo, diversos estudios han tratado de relacionar el índice de TBA asociado a la pérdida de aceptación sensorial en carne y en filete de pescado. No obstante, es difícil estimar la pérdida de aceptación sensorial con el índice de TBA evaluado en muestras crudas de filete de pescado o de carne, puesto que durante el cocinado se pueden generar diferentes productos volátiles en función de la composición química de la muestra y del tipo de cocinado aplicado, que pueden presentar aromas más o menos detectables por los consumidores. Además, existen diferentes métodos para determinar el avance de la oxidación lipídica y la aceptación sensorial, lo que dificulta la comparativa entre los resultados obtenidos por diferentes autores. En el caso de los alimentos de origen animal estudiados en esta tesis, aunque el avance de la oxidación lipídica era más pronunciado en los filetes de lubina procedentes de la dieta con un 100% de FO y en la carne de cerdo refrigerada procedente de la dieta con un 5% de OPAO, este avance no fue tan pronunciado como para conllevar una menor aceptación sensorial de estos productos con respecto a los filetes de lubina o a la carne de cerdo refrigerada procedentes de las otras dietas.

6.5 Implicaciones de los resultados obtenidos en esta tesis y propuestas para futuros estudios en la línea de investigación tratada

La presente tesis doctoral muestra que el uso de AO con calidades similares a las habitualmente encontradas en el mercado español (apartado 6.1) en alimentación de animales monogástricos puede permitir la producción en condiciones comerciales de filete de pescado y carne con una composición lipídica, estabilidad oxidativa y calidad (en términos de color y aceptación sensorial) similar a la observada con el empleo de aceites (crudos o refinados) con un mismo origen botánico. Además, los resultados obtenidos en una tesis doctoral realizada en paralelo a esta han mostrado que es posible emplear estos AO en dietas para animales monogástricos sin condicionar los parámetros productivos de los animales (Verge-Mèrida et al., 2021, 2022). Esto implica que, desde el punto de vista de los parámetros evaluados en esta tesis sobre el filete de pescado y la carne, se podrían revisar las recomendaciones de FEDNA acerca del valor de MIU total y de I para los AO empleados en alimentación animal (apartado 2.2.1). Concretamente los resultados de esta tesis demuestran que AO con valores de MIU y de I superiores a los recomendados por FEDNA pueden emplearse en dietas para animales monogástricos sin que exista una repercusión en la composición lipídica, oxidación lipídica ni en la calidad del filete de pescado y la carne. Además, teniendo en cuenta el estudio realizado por Varona et al. (2021a), las recomendaciones de FEDNA existentes actualmente son muy estrictas teniendo en cuenta la composición comúnmente observada para los AO del mercado español (apartado 6.1).

Sin embargo, de la presente tesis doctoral también se puede inferir que no todos los AO pueden ser adicionados a las dietas de animales monogástricos en las mismas condiciones y que esta limitación depende de la composición que muestren estos subproductos en términos que van más allá de su composición en FA y que posiblemente incluyen la fracción MIU. Esto implica que:

- La correcta caracterización de los AO es esencial para poder evaluar si son aptos para ser empleados en alimentación animal o en qué condiciones pueden serlo.

- Las recomendaciones de FEDNA sobre los porcentajes en los que los AO pueden emplearse en dietas de cerdo y pollo de diferentes edades (apartado 2.2.2) deberían contemplar, no solo el origen botánico de los mismos, sino ciertos parámetros composicionales, como el MIU.

Para realmente poder aumentar la confianza en los AO como fuentes de energía en alimentación animal se requiere realizar más estudios científicos que permitan determinar con mayor certeza en qué escenarios es posible su uso sin que pueda repercutir en la calidad del filete de pescado y de la carne.

Por un lado, sería necesario investigar cuales son los parámetros composicionales de los AO que realmente presentan una influencia en su calidad como fuentes lipídicas en alimentación animal y establecer el valor límite de dichos parámetros a partir del que se detectan modificaciones en la calidad del filete de pescado y de la carne cuando son producidos en condiciones comerciales. Uno de los retos para abordar estos estudios es la posibilidad de disponer de varios AO de origen botánico similar, con valores totales de MIU similares pero que variasen en las distintas fracciones del MIU (y/o compuestos dentro de ellas).

Los resultados del estudio realizado con cerdos muestran que, aunque un AO presente una calidad notablemente inferior a la habitualmente encontrada en el mercado, es posible usarlo en alimentación animal sin que exista un efecto negativo en la calidad de la carne cuando se adiciona formando parte de una mezcla con una grasa cruda (apartado 5.2). Por tanto, sería interesante enfocar diversos estudios a determinar la máxima proporción en la que pueden ser adicionados estos AO de menor calidad en piensos de diferentes especies sin observar un efecto en la calidad del filete de pescado y de la carne ni en los parámetros productivos de los animales.

Además, tal y como se ha comentado en la discusión general de resultados, uno de los factores que podría haber hecho notable el efecto negativo del uso de un AO de calidad inferior en piensos de cerdo, es la menor cantidad de acetato de α -tocoferilo adicionada en estos (apartado 6.3). Consecuentemente, sería interesante investigar si una mayor concentración de α -T en los piensos es capaz de prevenir este efecto negativo sobre los parámetros de oxidación lipídica del filete de pescado o de la carne, sin reducir la proporción de AO añadida a dichos piensos.

La información obtenida con estos estudios planteados para un futuro permitiría tanto actualizar las recomendaciones de FEDNA con propuestas más realistas como establecer un marco fiable para el uso de estos subproductos como fuentes lipídicas en alimentación animal, tanto desde el punto de vista de los productores de pescado y carne como desde el punto de vista de los consumidores.

7 CONCLUSIONS



Conclusions regarding lipid composition of fish fillet and meat

1. The FA profile of fish fillet and meat is influenced by the botanical origin of the lipid source added to the diet, regardless of whether it is an AO or not. Although the partial replacement of FO by AO or crude oils in seabass diets decreases n-3 LC-PUFA levels in fish fillets, the recommended human daily intake can still be covered with 100 g of fish fillet.
2. The T and T3 content of fish fillet and meat is affected by the botanical origin of the lipid source and the α -tocopheryl acetate level added to the diets, with no differences between AO and crude or refined oils with the same botanical origin. The partial replacement of FO by AO or crude oils in seabass diets increases the total T + T3 content in fish fillets.

Conclusions regarding lipid oxidation of fish fillet and meat

3. The use of AO instead of crude or refined oils with the same botanical origin does not affect lipid oxidation in fresh fish fillet and meat. Instead, lipid oxidation is mainly influenced by their FA profile. After refrigeration under commercial conditions, the OPAO used in the study performed with pigs, which has a lower quality than that commonly found in the market, increases the development of lipid oxidation in pork when it is added at 5% to diets. This is the only scenario in which the use of AO shows a different effect than the use of crude or refined oil.
4. During the refrigeration under commercial conditions of fish fillet and meat, the levels of secondary oxidation products increase in all cases. However, the oxidative stability and the α -T and total T + T3 levels are only affected after refrigeration in pork, all of them decreasing with the increase of lipid oxidation.

Conclusions regarding color and sensory acceptance of fish fillet and meat

5. In general, the use of AO instead of crude or refined oils with the same botanical origin in diets does not affect the color of fish fillet and meat. There are only differences between OPAO and ROPO in the yellowness of refrigerated chicken meat, which can be considered "*no appreciable*" by the consumer.
6. During refrigeration under commercial conditions, some modifications in the color parameters of the fish fillet and meat occur but a more pronounced change is observed in the case of pork, which can be categorized as "*very appreciable*" by the consumer.

7. The sensory acceptance of fish fillet and meat is not influenced by the use of AO instead of crude or refined oil, even if the botanical origin is different. The refrigeration under commercial conditions commonly used for each case, does not affect the sensory acceptance of fish fillet and meat.

General conclusion

8. The AO with similar quality to that commonly found in the market, are adequate lipid sources to replace the ones frequently added to seabass, pig, and chicken feeds in the same conditions usually used for the commercial production of fish fillet and meat. However, for AO with a lower quality, as it is the case of the OPAO used in the study with pigs, its use in feeds would be recommendable in lower proportions than the usual ones, mixed with an oil or fat with a higher quality, as a crude oil.

8 REFERENCIAS



Lista de publicaciones científicas derivadas de esta tesis doctoral

Albendea, P., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Sala, R., Guardiola, F., 2023. Effect of feeding acid oils on European seabass fillet lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance. *Aquaculture Nutrition*. 2023, 6415693.

<https://doi.org/10.1155/2023/6415693>

Albendea, P.; Tres, A.; Rafecas, M.; Vichi, S.; Barroeta A.C.; Solà-Oriol, D.; Verdú, M.; Guardiola, F., 2023. Effect of feeding olive pomace acid oil on pork lipid composition, oxidative stability, color and sensory acceptance. *Animal*. 2023, 100879.

<https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100879>

Albendea, P., Guardiola, F., Rafecas, M., Vichi, S., Barroeta, A.C., Verdú, M., Tres, A., 2023. Effect of feeding olive pomace acid oil on dark chicken meat lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance. *Animals* 13, 1343.

<https://doi.org/10.3390/ani13081343>

Lista de referencias, excluyendo aquellas únicamente citadas en las publicaciones

- Abidi, S.L., 2001. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*. 935, 173-201. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)00946-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00946-3)
- Afonso, C., Bandarra, N.M., Nunes, L., Cardoso, C., 2015. Tocopherols in seafood and aquaculture products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56, 128-140. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.694920>
- Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Brody, A.L., Li, Z., Qazi, I.M., Pavase, T.R., Lv, L., 2017. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*. 82, 163-178. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009>
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J., 2004. Agrochemical characterisation of «alperujo», a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*. 91, 195-200. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(03\)00177-9](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00177-9)
- Aleman, M., Nuchi, C.D., Bou, R., Tres, A., Polo, J., Guardiola, F., Codony, R., 2010. Effectiveness of antioxidants in preventing oxidation of palm oil enriched with heme iron: A model for iron fortification in baked products. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112, 761-769. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900220>
- Alfaia, C.M., Lopes, P.A., Madeira, M.S., Pestana, J.M., Coelho, D., Toldrá, F., Prates, J.A.M., 2019. Current feeding strategies to improve pork intramuscular fat content and its nutritional quality, en: *Advances in Food and Nutrition Research*. Ed.: Toldrá, F. Academic Press, London, UK, pp. 53-94.
- Alonso, V., Najes, L.M., Provincial, L., Guillén, E., Gil, M., Roncalés, P., Beltrán, J.A., 2012. Influence of dietary fat on pork eating quality. *Meat Science*. 92, 366-373. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.004>
- Álvarez, A., Fontanillas, R., Hernández-Contreras, A., Hernández, M.D., 2020. Partial replacement of fish oil with vegetal oils in commercial diets: The effect on the quality of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Animal Feed Science and Technology*. 265, 114504. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114504>
- Amaral, A.B., Silva, M.V. da, Lannes, S.C. da S., 2018. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors – A review. *Food Science and Technology*. 38, 1-15. <https://doi.org/10.1590/fst.32518>
- Antonopoulos, K., Valet, N., Spiratos, D., Siragakis, G., 2006. Olive oil and pomace olive oil processing. *Grasas y Aceites*. 57, 56-67. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.22>
- AOAC International, 2019. AOAC Official Method 2003.05. Crude fat in feeds, cereal grains, and forages, en: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, Rockville, USA, pp. 41-43.
- Artman, N.R., 1964. Interactions of fats and fatty acids as energy sources for the chick. *Poultry Science*. 43, 994-1004. <https://doi.org/10.3382/ps.0430994>
- Augustin, M.A., Sanguansri, L., Bode, O., 2006. Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *Journal of Food Science*. 71, E25-E32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08893.x>
- Baéza, E., Guillier, L., Petracci, M., 2022. Review: Production factors affecting poultry carcass and meat quality attributes. *Animal*. 16, 100331. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100331>
- Bahurmiz, O.M., Ng, W.K., 2007. Effects of dietary palm oil source on growth, tissue fatty acid composition and nutrient digestibility of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp.,

- raised from stocking to marketable size. *Aquaculture*. 262, 382-392.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.023>
- Baltic, M.Z., Boskovic, M., 2015. When man met meat: Meat in human nutrition from ancient times till today. *Procedia Food Science*. 5, 6-9.
<https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.002>
- Bekhit, A.E.-D.A., Hopkins, D.L., Fahri, F.T., Ponnampalam, E.N., 2013. Oxidative processes in muscle systems and fresh meat: Sources, markers, and remedies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12, 565-597.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12027>
- Bhosle, B.M., Subramanian, R., 2005. New approaches in deacidification of edible oils: A review. *Journal of Food Engineering*. 69, 481-494.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.09.003>
- Bornstein, S., Lipstein, B., 1961. By-products of refining of soybean oil as fat supplements in practical broiler rations. *World's Poultry Science Journal*. 17, 167-178.
<https://doi.org/10.1079/wps19610010>
- Borsatti, L., Vieira, S.L., Stefanello, C., Kindlein, L., Oviedo-Rondón, E.O., Angel, C.R., 2018. Apparent metabolizable energy of by-products from the soybean oil industry for broilers: acidulated soapstock, glycerin, lecithin, and their mixture. *Poultry Science*. 97, 124-130. <https://doi.org/10.3382/ps/pex269>
- Bou, R., Guardiola, F., Grau, A., Grimpa, S., Manich, A., Barroeta, A., Codony, R., 2001. Processing and Products: Influence of dietary fat source, α -tocopherol, and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat. *Poultry Science*. 80, 800-807. <https://doi.org/10.1093/ps/80.6.800>
- Bou, R., Guardiola, F., Tres, A., Barroeta, A.C., Codony, R., 2004. Effect of dietary fish oil, α -tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poultry Science*. 83, 282-292.
<https://doi.org/10.1093/ps/83.2.282>
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E.A., Guardiola, F., 2009. Dietary strategies to improve nutritional value, oxidative stability, and sensory properties of poultry products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49, 800-822.
<https://doi.org/10.1080/10408390902911108>
- Bouletis, A.D., Arvanitoyannis, I.S., Hadjichristodoulou, C., 2017. Application of modified atmosphere packaging on aquacultured fish and fish products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57, 2263-2285.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.862202>
- Bowzer, J., Jackson, C., Trushenski, J., 2016. Hybrid striped bass feeds based on fish oil, beef tallow, and eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid supplements: Insight regarding fish oil sparing and demand for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Animal Science*. 94, 978-988. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9199>
- Brigelius-Flohé, R., Traber, M.G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 13, 1145-1155.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.13.10.1145>
- Brink, E.J., Haddeman, E., de Fouw, N.J., Weststrate, J.A., 1995. Positional distribution of stearic acid and oleic acid in a triacylglycerol and dietary calcium concentration determines the apparent absorption of these fatty acids in rats. *The Journal of Nutrition*. 125, 2379-2387. <https://doi.org/10.1093/jn/125.9.2379>
- Brjekkan, O.R., Lambertsen, G., Myklestad, H., 1963. Alpha-tocopherol in some marine organisms and fish oils, Reports on Technological Research concerning Norwegian Fish Industry, Vol IV, N° 8. Bergen, Norway.
- Bureau, D.P., Gibson, J., El-mowafi, A., 2002. Review : Use of animal fats in aquaculture

- feeds, en: Avances en Nutrición Acuícola. VI Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancun, Mexico, pp. 487-504.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., Tolasa, S., 2007. Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. Food Control. 18, 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.005>
- Cameron, N.D., Enser, M., Nute, G.R., Whittington, F.M., Penman, J.C., Fiske, A.C., Perry, A.M., Wood, J.D., 2000. Genotype with nutrition interaction on fatty acid composition of intramuscular fat and the relationship with flavour of pig meat. Meat Science. 55, 187-195. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(99\)00142-4](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(99)00142-4)
- Cava, R., Ruiz, J., Ventanas, J., Antequera, T., 1999. Oxidative and lipolytic changes during ripening of Iberian hams as affected by feeding regime: extensive feeding and alpha-tocopheryl acetate supplementation. Meat Science. 52, 165-172. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(98\)00164-8](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00164-8)
- Chan, K.M., Decker, E.A., Feustman, C., 1994. Endogenous skeletal muscle antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 34, 403-426. <https://doi.org/10.1080/10408399409527669>
- Chang, C.Y., Ke, D.S., Chen, J.Y., 2009. Essential fatty acids and human brain. Acta neurologica Taiwanica. 18, 231-41.
- Chew, S.C., Nyam, K.L., 2020. Refining of edible oils, en: Lipids and Edible Oils. Properties, Processing and Applications. Ed.: Galanakis, C.M. Academic Press, London, UK, pp. 213-241.
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, F.A.M., 2007. Review on the immunology of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 117, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.02.005>
- Cho, C.Y., Kaushik, S.J., 1990. Nutritional energetics in fish: Energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), en: World Review of Nutrition and Dietetics. pp. 132-172.
- Cho, J.H., Kim, I.H., 2011. Fish meal - nutritive value. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 95, 685-692. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01109.x>
- Choe, E., Min, D.B., 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 5, 169-186. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>
- CIE, 2004. Colorimetry, 3.^a ed, Publication CIE 15:2004. CIE, Vienna, Austria.
- Clodoveo, M.L., Camposeo, S., Amirante, R., Dugo, G., Cicero, N., Boskou, D., 2015. Research and innovative approaches to obtain virgin olive oils with a higher level of bioactive constituents, en: Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. Ed.: Boskou, D. AOCS Press, Urbana, USA, pp. 179-215.
- Čmolík, J., Pokorný, J., 2000. Physical refining of edible oils. European Journal of Lipid Science and Technology. 102, 472-486. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200008\)102:7<472::aid-ejlt472>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200008)102:7<472::aid-ejlt472>3.0.co;2-z)
- Codex Alimentarius, 1999. Standard for named vegetable oils (CXS 210-1999). Adopted in 1999; Revised in 2001, 2003, 2009, 2017, 2019; Amended in 2005, 2011, 2013, 2015, 2019, en: Codex Alimentarius, International food standards. Rome, Italy.
- Coffey, D., Dawson, K., Ferket, P., Connolly, A., 2016. Review of the feed industry from a historical perspective and implications for its future. Journal of Applied Animal Nutrition. 4, 1-11. <https://doi.org/10.1017/jan.2015.11>
- Cooksey, K., 2014. Modified atmosphere packaging of meat, poultry and fish, en: Innovations in Food Packaging. Ed.: Jung H. Han. Academic Press, London, UK, pp. 475-493.

- Cortinas, L., Villaverde, C., Galobart, J., Baucells, M.D., Codony, R., Barroeta, A.C., 2004. Fatty acid content in chicken thigh and breast as affected by dietary polyunsaturation level. *Poultry Science*. 83, 1155-1164. <https://doi.org/10.1093/ps/83.7.1155>
- Costa, C., D'Andrea, S., Russo, R., Antonucci, F., Pallottino, F., Menesatti, P., 2011. Application of non-invasive techniques to differentiate sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) quality cultured under different conditions. *Aquaculture International*. 19, 765-778. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9393-9>
- Crespo, N., Esteve-Garcia, E., 2001. Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poultry Science*. 80, 71-78. <https://doi.org/10.1093/ps/80.1.71>
- Cutter, C.N., 2006. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science*. 74, 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.023>
- DeWitt, C., Oliveira, A., 2016. Modified atmosphere systems and shelf life extension of fish and fishery products. *Foods*. 5, 48. <https://doi.org/10.3390/foods5030048>
- Difonzo, G., Troilo, M., Squeo, G., Pasqualone, A., Caponio, F., 2021. Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101, 15-26. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10478>
- Dolz, S., 1996. Utilizacion de grasas y subproductos lipidicos en monogastricos. FEDNA. [http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/NUTRICION/TEORICOS/08f - Metabolismo - Material de lectura IV..pdf](http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/NUTRICION/TEORICOS/08f-Metabolismo-Material de lectura IV..pdf) (accedido 6.4.23).
- Doppenberg, J., van der Aar, P.J., 2017. Facts about fats. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Drackley, J.K., 2000. Lipid metabolism, en: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. Ed.: D'Mello, J.P. CAB International, Wallingford, UK, pp. 267-268.
- Dumont, M.J., Narine, S.S., 2007. Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization. *Food Research International*. 40, 957-974. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.06.006>
- Duran-Montgé, P., Realini, C.E., Barroeta, A.C., Lizardo, R.G., Esteve-Garcia, E., 2010. De novo fatty acid synthesis and balance of fatty acids of pigs fed different fat sources. *Livestock Science*. 132, 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.05.017>
- Economic Research Service. U.S. Department of Agriculture, 2021. Oil crops data: Yearbook tables. <https://www.ers.usda.gov/data-products/oil-crops-yearbook/> (accedido 6.4.23).
- EFSA, 2019. Dietary reference values for nutrients. Summary report. EFSA Supporting Publication 2017:e15121. <http://doi.wiley.com/10.2903/sp.efsa.2017.e15121> (accedido 6.4.23).
- El-Naggar, K., Mohamed, R., El-Katcha, M.I., Abdo, S.E., Soltan, M.A., 2021. Plant Ingredient diet supplemented with lecithin as fish meal and fish oil alternative affects growth performance, serum biochemical, lipid metabolism and growth-related gene expression in Nile tilapia. *Aquaculture Research*. 52, 6308-6321. <https://doi.org/10.1111/are.15494>
- Elguera, M.A., Vergara, V.J., Vega-Vilca, J.F., 2019. Acidulated soybean oil in diets for rainbow trout alevins (*Oncorhynchus mykiss*) on its performance under commercial conditions. *Peruvian Agricultural Research*. 1, 7-10. <https://doi.org/10.51431/par.v1i1.476>
- Emery, J.A., Norambuena, F., Trushenski, J., Turchini, G.M., 2016. Uncoupling EPA and

- DHA in fish nutrition: dietary demand is limited in atlantic salmon and effectively met by DHA alone. *Lipids*. 51, 399-412. <https://doi.org/10.1007/s11745-016-4136-y>
- Enser, M., Richardson, R.I., Wood, J.D., Gill, B.P., Sheard, P.R., 2000. Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Science*. 55, 201-212. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(99\)00144-8](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(99)00144-8)
- Erickson, M.C., 2008. Lipid oxidation of muscle foods, en: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Eds.: Akoh, C.C., Min, D.B. CRC Press, New York, USA, pp. 321-364.
- Estévez, M., 2015. Oxidative damage to poultry: from farm to fork. *Poultry Science*. 94, 1368-1378. <https://doi.org/10.3382/ps/pev094>
- Estévez, M., 2017. What's new in meat oxidation?, en: *New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics*. Ed.: Peter P. Purslow. Elsevier Ltd, Amsterdam, The Netherlands, pp. 91-109.
- EU, 2001. Regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies (31/5/2001). *Official Journal of the European Communities*. L 147, 1-69.
- EU, 2009. Commission Regulation (EC) N° 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of European Union*. L135/3, 3-11.
- EU, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 276, 33-79.
- EU, 2017. Commission Regulation (EU) 2017/1017 of 15 June 2017 amending Regulation (EU) No 68/2013 on the Catalogue of feed materials. *Official Journal of the European Union*. 48-119.
- FAO, 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO food and nutrition paper*. 91, 1-166.
- FAO, 2020. Fishery and aquaculture statistics 2018, *FAO yearbook*. Rome, Italy.
- FAO, 2021. World food and agriculture: Statistical yearbook 2021. *FAO*, Rome, Italy.
- Farhoosh, R., 2021. Critical kinetic parameters and rate constants representing lipid peroxidation as affected by temperature. *Food Chemistry*. 340, 128137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128137>
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., Suman, S.P., 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*. 86, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025>
- FEDIOL, 2020. FEDIOL code of practice on vegetable oil and fat refining for food purposes (Ref. 19SAF341). *Codes of Practice*. <https://doi.org/ref.19saf341>
- FEDNA, 2002. Normas FEDNA de control de calidad de ingredientes para piensos- Especificación técnica de materia prima, grasas y aceites. *Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal*. https://www.fundacionfedna.org/sites/default/files/8_Grasas_y_aceites.pdf (accedido 6.4.23).
- FEDNA, 2013. Necesidades nutricionales para ganado porcino, 2ª edición. *Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal*, Madrid, Spain.
- FEDNA, 2015a. Grasas de origen animal. Tablas de ingredientes para piensos. http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/grasas-de-origen-

- animal-actualizado-nov-2015 (accedido 6.4.23).
- FEDNA, 2015b. Aceites y oleínas de origen vegetal. Tablas de ingredientes para piensos. http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/aceites-y-oleinas-de-origen-vegetal (accedido 6.4.23).
- FEDNA, 2018. Necesidades nutricionales en avicultura, 2.^a ed, Normas FEDNA. Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal, Madrid, Spain.
- Feed Energy Company, 2014. Utilization of Fatty Acids in Swine Diets. Feed Energy Topic: Swine Diets Utilization. <https://www.feedenergy.com/wp-content/uploads/2018/04/utilization-of-fatty-acids-in-swine-diets-41ebcf89.pdf> (accedido 6.4.23).
- Fiume, M.M., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A., Heldreth, B., 2018. Safety assessment of tocopherols and tocotrienols as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 37, 61S-94S. <https://doi.org/10.1177/1091581818794455>
- Floros, J.D., Matsos, K.I., 2005. Introduction to modified atmosphere packaging, en: *Innovations in Food Packaging*. Ed.: Han, J.H. Academic Press, London, UK, pp. 159-172.
- Font i Furnols, M., Guerrero, L., 2014. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Science*. 98, 361-371. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.025>
- Fontanel, D., 2013. Introduction, en: *Unsaponifiable Matter in Plant Seed Oils*. Springer, London, UK, pp. 1-11.
- Frankel, E.N., 1987. Secondary products of lipid oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 44, 73-85. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90045-4)
- Fujisawa, A., Dunlap, W.C., Yamamoto, Y., 2010. Vitamin E protection in the biochemical adaptation of marine organisms to cold-water environments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 157, 145-158. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.04.011>
- Gallmann, P., 2003. *Minimal processing technologies in the food industry*, LWT - Food Science and Technology. CRC Press, Cambridge, UK.
- García-Zapateiro, L.A., Delgado, M.A., Franco, J.M., Valencia, C., Ruiz-Méndez, M.V., Garcés, R., Gallegos, C., 2010. Oleins as a source of estolides for biolubricant applications. *Grasas y Aceites*. 61, 171-174. <https://doi.org/10.3989/gya.075209>
- García-Zapateiro, L.A., Franco, J.M., Valencia, C., Delgado, M.A., Gallegos, C., Ruiz-Méndez, M.V., 2013. Chemical, thermal and viscous characterization of high-oleic sunflower and olive pomace acid oils and derived estolides. *Grasas y Aceites*. 64, 497-508. <https://doi.org/10.3989/gya.012513>
- Genc, E., Yilmaz, E., Akyurt, I., 2005. Effects of dietary fish oil, soy-acid oil, and yellow grease on growth and hepatic lipidosis of hybrid tilapia fry. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. 57, 90-96.
- Ghidurus, M., Ilie, L., Varga, M., Mihalache, M., 2017. Review on dietary tocopherol accumulation on pork tissues and its membrane antioxidant role against lipid oxidation. *AgroLife Scientific Journal*. 6, 112-119.
- Gill, A.O., Gill, C.O., 2005. Preservative packaging for fresh meats, poultry, and fin fish, en: *Innovations in Food Packaging*. Ed.: Han, J.H. Academic Press, London, UK, pp. 204-226.
- González, E., Tejada, J.F., 2007. Effects of dietary incorporation of different antioxidant extracts and free-range rearing on fatty acid composition and lipid oxidation of Iberian pig meat. *Animal*. 1, 1060-1067.

<https://doi.org/10.1017/s1751731107000195>

- Grashorn, M., 2016. Feed additives for influencing chicken meat and egg yolk color, en: Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. Eds.: Carle, R., Schweiggert, R.M. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 283-302.
- Grau, A., Codony, R., Rafecas, M., Barroeta, A.G., Guardiola, F., 2000a. Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xyleneol orange method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 4136-4143. <https://doi.org/10.1021/jf991054z>
- Grau, A., Guardiola, F., Boatella, J., Barroeta, A., Codony, R., 2000b. 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. <https://doi.org/10.1021/jf990518q>
- Gray, J.I., Gomas, E.A., Buckley, D.J., 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*. 43, 111-123. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(96\)00059-9](https://doi.org/10.1016/0309-1740(96)00059-9)
- Greyt, W. De, 2013. Edible oil refining: current and future technologies, en: Edible Oil Processing. Eds.: Hamm, W., Hamilton, R.J., Calliauw, G. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 127-151.
- Gu, X., Li, D., 2003. Fat nutrition and metabolism in piglets: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 109, 151-170. [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(03\)00171-8](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(03)00171-8)
- Gunstone, F.D., 2008. Oils and fats in the food industry, Food industry Briefing Series. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Gunstone, F.D., 2011. Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses, 2.^a ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Gupta, M.K., 2017. Practical guide to vegetable oil processing, 2.^a ed. Academic Press and AOCS Press, London, UK.
- Guyon, C., Meynier, A., de Lamballerie, M., 2016. Protein and lipid oxidation in meat: A review with emphasis on high-pressure treatments. *Trends in Food Science and Technology*. 50, 131-143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.026>
- Haag, M., 2003. Essential fatty acids and the brain. *The Canadian Journal of Psychiatry*. 48, 195-203.
- Hamre, K., 2011. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. *Aquaculture Nutrition*. 17, 98-115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00806.x>
- Han, J.H., 2014. Edible films and coatings: A review, en: Innovations in Food Packaging. Ed.: Han, J.H. Academic Press, London, UK, pp. 213-255.
- Haris Omar, S., 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*. 78, 133-154. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18>
- Heinrich Böll Foundation, Friends of the Earth Europe, German Federation for the Environment and Nature Conservation, 2021. Meat atlas 2021. Facts and figures about the animals we eat. https://friendsoftheearth.eu/wp-content/uploads/2021/09/MeatAtlas2021_final_web.pdf (accedido 6.4.23).
- Hematyar, N., Rustad, T., Sampels, S., Kastrup Dalsgaard, T., 2019. Relationship between lipid and protein oxidation in fish. *Aquaculture Research*. 50, 1393-1403. <https://doi.org/10.1111/are.14012>
- Huang, J., Yang, D., Wang, T., 2007. Effects of replacing soy-oil with soy-lecithin on growth performance, nutrient utilization and serum parameters of broilers fed corn-based diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 20, 1880-1886.

- <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.1880>
- Iglesias, E.G., Cabezas, L.G., Nuevo, J.L.F., 2006. Tecnología de envasado en atmosferas protectoras. Informe de vigilancia tecnológica.
<https://www.madrid.org/bvirtual/BVCM001697.pdf> (accedido 6.4.23).
- IOC, 2022. Production of olive oil. Statistics. <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/12/IOC-Olive-Oil-Dashboard-2.html#production-1> (accedido 6.4.23).
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., Rosenlund, G., 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition*. 9, 397-407.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00270.x>
- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G., Ginés, R., 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*. 250, 431-444.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.001>
- Jafari, F., Agh, N., Noori, F., Tokmachi, A., Gisbert, E., 2018. Effects of dietary soybean lecithin on growth performance, blood chemistry and immunity in juvenile stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 80, 487-496.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.023>
- James, S.J., James, C., 2014. Chilling and freezing of foods, en: *Food Processing*. Eds.: Clark, S., Jung, S., Lamsal, B. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 79-105.
- Jensen, C., Lauridsen, C., Bertelsen, G., 1998. Dietary vitamin E: Quality and storage stability of pork and poultry. *Trends in Food Science and Technology*. 9, 62-72.
[https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(98\)00004-1](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(98)00004-1)
- Jimenez-Moya, B., Martin, D., Soler-Rivas, C., Barroeta, A.C., Tres, A., Sala, R., 2021. Acid versus crude oils for broiler chicken diets: In vitro lipid digestion and bioaccessibility. *Animal Feed Science and Technology*. 276, 114926.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114926>
- Jimenez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Golay, P., Cotting, C., Destailats, F., Dionisi, F., Keely, B., 2008. Profiles of volatile compounds in milk containing fish oil analyzed by HS-SPME-GC/MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 110, 277-283.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200700148>
- Kaale, L.D., Eikevik, T.M., Rustad, T., Kolsaker, K., 2011. Superchilling of food: A review. *Journal of Food Engineering*. 107, 141-146.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.004>
- Kan, A., 2015. Characterization of the fatty acid and mineral compositions of selected cereal cultivars from Turkey. *Records of Natural Products*. 1, 124-134.
- Kaushik, S.J., 2002. European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, en: *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. Eds.: Webster, C.D., Lim, C. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 28-39.
- Kazuo, M., 2019. Prevention of Fish Oil Oxidation. *Journal of Oleo Science*. 68, 1-11.
<https://doi.org/10.5650/jos.ess18144>
- Kerr, B.J., Kellner, T.A., Shurson, G.C., 2015. Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6, 30.
<https://doi.org/10.1186/s40104-015-0028-x>
- Khdaif, A., Abu-Rumman, G., 2020. Sustainable environmental management and valorization options for olive mill byproducts in the Middle East and North Africa (MENA) region. *Processes*. 8, 671. <https://doi.org/10.3390/pr8060671>

- Kiessling, A., Ruohonen, K., Bjørnevik, M., 2006. Muscle fibre growth and quality in fish. *Archiv für Tierzucht/Archives of Animal Breeding*. 49, 137-146.
- Kiritsakis, A., Christie, W.W., 2000. Analysis of edible oils, en: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. Eds.: Harwood, J., Aparicio, R. Springer, Boston, USA, pp. 129-158.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., 2009. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*. 26, 475-482. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.008>
- Kouba, M., Mourot, J., 2011. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie*. 93, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.027>
- Kovari, K., Denise, J., Kemeny, Z., Recseg, K., 2000. Physical refining of sunflower oil. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*. 7, 305-308. <https://doi.org/10.1051/ocl.2000.0305>
- Ladikos, D., Lougovois, V., 1990. Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chemistry*. 35, 295-314. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90019-z](https://doi.org/10.1016/0308-8146(90)90019-z)
- Lauridsen, C., Bruun Christensen, T., Halekoh, U., Krogh Jensen, S., 2007. Alternative fat sources to animal fat for pigs. *Lipid Technology*. 19, 156-159. <https://doi.org/10.1002/lite.200700051>
- Lauridsen, C., 2020. Effects of dietary fatty acids on gut health and function of pigs pre- and post-weaning. *Journal of Animal Science*. 98, 1-43. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa086>
- Lebret, B., 2008. Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. *Animal*. 2, 1548-1558. <https://doi.org/10.1017/s1751731108002796>
- Lebret, B., Čandek-Potokar, M., 2022. Review: Pork quality attributes from farm to fork. Part I. Carcass and fresh meat. *Animal*. 16, 100402. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100402>
- Lee, J.H., Fukumoto, M., Nishida, H., Ikeda, I., Sugano, M., 1989. The interrelated effects of n-6/n-3 and polyunsaturated/saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. *The Journal of Nutrition*. 119, 1893-1899. <https://doi.org/10.1093/jn/119.12.1893>
- Lee, S.A., Whenham, N., Bedford, M.R., 2019. Review on docosahexaenoic acid in poultry and swine nutrition: Consequence of enriched animal products on performance and health characteristics. *Animal Nutrition*. 5, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.09.001>
- Leygonie, C., Britz, T.J., Hoffman, L.C., 2012. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Science*. 91, 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.013>
- Lim, C.E., 2003. Agricultural Research Service U.S. Department of agriculture. Nutrient requirements of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) and gilt-head sea bream (*Sparus Aurata*). <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=157340> (accedido 6.4.23).
- Lim, K.C., Yusoff, F.M., Shariff, M., Kamarudin, M.S., 2018. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*. 10, 738-773. <https://doi.org/10.1111/raq.12200>
- Lindahl, G., Lundström, K., Tornberg, E., 2001. Contribution of pigment content,

- myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. *Meat Science*. 59, 141-151. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(01\)00064-x](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(01)00064-x)
- Lisiak, D., Grześkowiak, E., Borzuta, K., Raj, S., Janiszewski, P., Skiba, G., 2013. Effects of supplementary vegetable and animal fats on the slaughter values of fatteners, meat quality, and fatty acid profile in pigs. *Czech Journal of Animal Science*. 58, 497-511. <https://doi.org/10.17221/7045-cjas>
- List, G.R., 2015. Soybean lecithin: Food, industrial uses, and other applications, en: *Polar Lipids. Biology, Chemistry, and Technology*. Eds.: Ahmad, M.U., Xu, X. AOCS Press, Urbana, USA, pp. 1-33.
- Liu, G., Xiong, Y.L., 1996. Contribution of lipid and protein oxidation to rheological differences between chicken white and red muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 779-784. <https://doi.org/10.1021/jf9506242>
- López-Ferrer, S., Baucells, M., Barroeta, A., Grashorn, M., 1999. n-3 enrichment of chicken meat using fish oil: Alternative substitution with rapeseed and linseed oils. *Poultry Science*. 78, 356-365. <https://doi.org/10.1093/ps/78.3.356>
- Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M., 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55, 83-95. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000453>
- Lund, M.N., 2021. Reactions of plant polyphenols in foods: Impact of molecular structure. *Trends in Food Science & Technology*. 112, 241-251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.056>
- Ma, R., Liu, X., Tian, H., Han, B., Li, Y., Tang, C., Zhu, K., Li, C., Meng, Y., 2020. Odor-active volatile compounds profile of triploid rainbow trout with different marketable sizes. *Aquaculture Reports*. 17, 100312. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100312>
- Mai, K., Waagbø, R., Zhou, X.Q., Ai, Q.H., Feng, L., 2022. Vitamins, en: *Fish Nutrition*. Eds.: Hardy, R.W., Kaushik, S.J. Accademic Press, London, UK, pp. 57-179.
- Malapert, A., Reboul, E., Loonis, M., Dangles, O., Tomao, V., 2017. Direct and rapid profiling of biophenols in olive pomace by UHPLC-DAD-MS. *Food Analytical Methods*. 11, 1001-1010. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1064-2>
- Mancini, R.A., Hunt, M.C., 2005. Current research in meat color. *Meat Science*. 71, 100-121. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.003>
- Marsh, K., Bugusu, B., 2007. Food packaging-roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science*. 72, R39-R55. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>
- Masniyom, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2002. Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82, 873-880. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1108>
- Mateos, G.G., Rebollar, P., Medel, P., 1996. Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal: grasas puras y mezclas. *FEDNA*. 1-18.
- Mateos, G.G., Saldaña, B., Guzmán, P., Frikha, M., Vahid, M., Berrocoso, J.D., 2012. Revisión 3ª Edición Tablas FEDNA: I.-Utilización de aceites resultantes de procesos industriales en piensos para animales monogástricos: Oleinas, aceites reconstituidos y lecitinas.
- Mateos, R., Sarria, B., Bravo, L., 2020. Nutritional and other health properties of olive pomace oil. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60, 3506-3521. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1698005>
- Matthäus, B., 2016. Possibilities of sustainable oil processing, en: *Breeding Oilseed Crops*

- for Sustainable Production. Opportunities and Constraints. Ed.: Gupta, S.K. Academic Press, London, UK, pp. 473-521.
- Mendoza Benavides, S.M., 2012. Effects of Acidulated Fats on Nutrient Digestibility and Performance in Nursery Pigs. North Carolina State University.
- Menge, H., Beal, R.E., 1973. The use of neutralized soybean oil soapstock for broilers. Poultry Science. 52, 219-222. <https://doi.org/10.3382/ps.0520219>
- Min, B., Ahn, D.U., 2005. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products: A review. Food Science and Biotechnology. 14, 152-163.
- Min, B., Cordray, J.C., Ahn, D.U.K., 2010. Effect of NaCl, myoglobin, Fe(II), and Fe(III) on lipid oxidation of raw and cooked chicken breast and beef loin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58, 600-605. <https://doi.org/10.1021/jf9029404>
- Mir, N.A., Rafiq, A., Kumar, F., Singh, V., Shukla, V., 2017. Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review. Journal of Food Science and Technology. 54, 2997-3009. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2789-z>
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Ginés, R., Izquierdo, M.S., 2005. Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. Aquaculture. 248, 121-134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.003>
- Moradi, M., Tajik, H., Mehdi, S., Rohani, R., 2010. Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. Journal of Chitin and Chitosan. 35-45.
- Morel, P.C.H., McIntosh, J.C., Janz, J.A.M., 2006. Alteration of the fatty acid profile of pork by dietary manipulation. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 19, 431-437. <https://doi.org/10.5713/ajas.2006.431>
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., 2000. Antioxidant activity of carotenoids in muscle foods, en: Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality. Eds.: Decker, E.A., Faustman, C., Lopez-Bote, C.J. John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 61-83.
- Mourente, G., Bell, J.G., 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. Comparative Biochemistry and Physiology -B Biochem. Mol. Biol. 145, 389-399. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.08.012>
- Mourente, G., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2007. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? Fish Physiology and Biochemistry. 33, 269-280. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9139-4>
- Mu, H., 2004. The digestion of dietary triacylglycerols. Progress in Lipid Research. 43, 105-133. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(03\)00050-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(03)00050-x)
- Mu, K., Kitts, D.D., 2018. Use of soy lecithin to improve nutritional quality of poultry meats and its effect on stability and sensory attributes. Journal of Nutrition & Food Sciences. 08, 1-9. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000714>
- Nafikov, R.A., Beitz, D.C., 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. The Journal of Nutrition. 137, 702-705. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.702>
- Nagargoje, S., Dhumal, M., Nikam, M., Khose, K., 2016. Effect of crude soy lecithin with or without lipase on performance and carcass traits, meat keeping quality and economics of broiler chicken. International Journal of Livestock Research. 6, 46. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20161218124154>

- Namdar, D., Amrani, A., Getzov, N., Milevski, I., 2015. Olive oil storage during the fifth and sixth millennia B.C. at Ein Zippori, Northern Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*. 62, 65-74. <https://doi.org/10.1080/07929978.2014.960733>
- Nasopoulou, C., Zabetakis, I., 2012. Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT - Food Science and Technology*. 47, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.018>
- Naz, S., Sherazi, S., Talpur, F., Kara, H., Sirajuddin, S., Khaskheli, A., 2014. Chemical characterization of canola and sunflower oil deodorizer distillates. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 64, 115-120. <https://doi.org/10.2478/pjfn-2013-0008>
- Ng, W.K., 2004. Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 233, 423-437. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.013>
- Ng, W.K., Codabaccus, B.M., Carter, C.G., Nichols, P.D., 2010. Replacing dietary fish oil with palm fatty acid distillate improves fatty acid digestibility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, maintained at optimal or elevated water temperature. *Aquaculture*. 309, 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.035>
- Nguyen, M.T., Van de Walle, D., Petit, C., Beheydt, B., Depypere, F., Dewettinck, K., 2014. Mapping the chemical variability of vegetable lecithins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 91, 1093-1101. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2455-9>
- NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washintong DC, USA.
- Nuchi, C., Guardiola, F., Bou, R., Bondloli, P., Della Bella, L., Codony, R., 2009. Assessment of the levels of degradation in fat co- and byproducts for feed uses and their relationships with some lipid composition parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1952-1959. <https://doi.org/10.1021/jf803369h>
- O'Sullivan, M.G., Kerry, J.P., Buckley, D.J., Lynch, P.B., Morrissey, P.A., 1997. The distribution of dietary vitamin E in the muscles of the porcine carcass. *Meat Science*. 45, 297-305. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(96\)00121-0](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(96)00121-0)
- OECD/FAO, 2021. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2021-2030_19428846-en (accedido 6.4.23).
- Olatunde, O.O., Benjakul, S., 2018. Natural preservatives for extending the shelf-life of seafood: A revisit. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 17, 1595-1612. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12390>
- Oliva-Teles, A., Enes, P., Peres, H., 2015. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish, en: *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Ed.: Allen Davis, D. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 203-233.
- Olsen, R.E., Kiessling, A., Milley, J.E., Ross, N.W., Lall, S.P., 2005. Effect of lipid source and bile salts in diet of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., on astaxanthin blood levels. *Aquaculture*. 250, 804-812. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.013>
- Orrego, R., 2018. Fish Farming Expert. Vegetable oils in fish feed. <https://www.fishfarmingexpert.com/article/vegetable-oils-in-fish-feed/> (accedido 6.4.23).
- Pagheh, E., Agh, N., Marammazi, J.G., Nouri, F., Sepahdari, A., Gisbert, E., Torfi Mozanzadeh, M., 2019. Dietary soybean lecithin affects growth performance, fillet biochemical composition and digestive enzyme activity in Sparidentex hasta juvenile. *Journal of Applied Animal Research*. 47, 24-33. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1557663>

- Pardio, V.T., Landin, L.A., Waliszewski, K.N., Badillo, C., Perez-Gil, F., 2001. The effect of acidified soapstocks on feed conversion and broiler skin pigmentation. *Poultry Science*. 80, 1236-1239. <https://doi.org/10.1093/ps/80.8.1236>
- Partovi, M., Lotfabad, T.B., Roostaazad, R., Bahmaei, M., Tayyebi, S., 2013. Management of soybean oil refinery wastes through recycling them for producing biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* MR01. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29, 1039-1047. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1267-7>
- Pascual, J.V., Rafecas, M., Canela, M.A., Boatella, J., Bou, R., Barroeta, A.C., Codony, R., 2007. Effect of increasing amounts of a linoleic-rich dietary fat on the fat composition of four pig breeds. Part II: Fatty acid composition in muscle and fat tissues. *Food Chemistry*. 100, 1639-1648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.045>
- Patra, F., Duary, R.K., 2020. Waste from dairy processing industries and its sustainable utilization, en: *Sustainable Food Waste Management. Concepts and Innovations*. Eds.: Thakur, M., Modi, V.K., Khedkar, R., Singh, K. Springer, Singapore, pp. 127-154.
- Pawar, D.M., Marathe, A.B., 2015. Critical review on value added products from cracking of waste vegetable oil. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 6, 1063-1068.
- Peña, J.E.M., Vieira, S.L., Borsatti, L., Pontin, C., Rios, H.V., 2014. Energy utilization of by-products from the soybean oil industry by broiler chickens: acidulated soapstock, lecithin, glycerol and their mixture. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 16, 437-442. <https://doi.org/10.1590/1516-635x1604437-442>
- Peng, Y., Adhiputra, K., Padayachee, A., Channon, H., Ha, M., Warner, R.D., 2019. High oxygen modified atmosphere packaging negatively influences consumer acceptability traits of pork. *Foods*. 8, 567. <https://doi.org/10.3390/foods8110567>
- Pereira da Costa, D., Campos Miranda-Filho, K., 2019. The use of carotenoid pigments as food additives for aquatic organisms and their functional roles. *Reviews in Aquaculture*. 12, 1567-1578. <https://doi.org/10.1111/raq.12398>
- Petrakis, C., 2006. Olive oil extraction, en: *Olive Oil. Chemistry and Technology*. Ed.: Bosku, D. Academic Press and AOCS Press, London, UK, pp. 191-223.
- Petricorena, Z.C., 2015. Chemical composition of fish and fishery products, en: *Handbook of Food Chemistry*. Eds.: Cheung, P.C.K, Mehta, B.M. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 403-435.
- Pickard, M.D., da Silva Lima, R.S., Shahidi, F., 2020. By-Product Utilization, en: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Ed.: Shahidi, F. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 1-27.
- Piloto-Rodríguez, R., Melo, E.A., Tobio, I., Goyos-Pérez, L., Verhelst, S., 2014. By-products from the vegetable oil industry as a feasible source for biofuels production and pollution reduction. *Renewable Energy and Power Quality Journal*. 1, 150-154. <https://doi.org/10.24084/repqj12.267>
- Pogorzelska, E., Godziszewska, J., Brodowska, M., Wierzbicka, A., 2018. Antioxidant potential of *Haematococcus pluvialis* extract rich in astaxanthin on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigerated storage. *Meat Science*. 135, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.09.002>
- Poste, L.M., Willemot, C., Butler, G., Patterson, C., 1986. Sensory aroma scores and TBA values as indices of warmed-over flavor in pork. *Journal of Food Science*. 51, 886-888. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb11192.x>
- Prache, S., Adamiec, C., Astruc, T., Baéza-Campone, E., Bouillot, P.E., Clinquart, A., Feidt, C., Fourat, E., Gautron, J., Girard, A., Guillier, L., Kesse-Guyot, E., Lebret, B., Lefèvre, F., Le Perchec, S., Martin, B., Mirade, P.S., Pierre, F., Raullet, M., Rémond,

- D., Sans, P., Souchon, I., Donnars, C., Santé-Lhoutellier, V., 2022. Review: Quality of animal-source foods. *Animal*. 16, 100376. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100376>
- Purslow, P.P., Warner, R.D., Clarke, F.M., Hughes, J.M., 2020. Variations in meat colour due to factors other than myoglobin chemistry; a synthesis of recent findings (invited review). *Meat Science*. 159, 107941. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107941>
- Raes, K., De Smet, S., Demeyer, D., 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 113, 199-221. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.09.001>
- Ratnayake, W.M.N., Galli, C., 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 55, 8-43. <https://doi.org/10.1159/000228994>
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Rosenlund, G., Kaushik, S.J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in Turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*. 220, 737-747. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00655-5](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00655-5)
- Roccisano, D., Kumaratilake, J., Saniotis, A., Henneberg, M., 2016. Dietary fats and oils: some evolutionary and historical perspectives concerning edible lipids for human consumption. *Food and Nutrition Sciences*. 07, 689-702. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.78070>
- Rodriguez-Sanchez, R., Tres, A., Sala, R., Soler, M.D., Guardiola, F., Barroeta, A.C., 2021. Effects of free-fatty-acid content and saturation degree of the dietary oil sources on lipid-class content and fatty-acid digestibility along the gastrointestinal tract in broilers from 22 to 37 days of age. *Poultry Science*. 100, 101261. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101261>
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*. 26, 960-969. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.07.024>
- Rombenso, A.N., Trushenski, J.T., Jirsa, D., Drawbridge, M., 2015. Successful fish oil sparing in White Seabass feeds using saturated fatty acid-rich soybean oil and 22:6n-3 (DHA) supplementation. *Aquaculture*. 448, 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.041>
- Rombenso, A.N., Esmacili, M., Araujo, B., Emerenciano, M., Truong, H., Viana, M.T., Li, E., Simon, C., 2021. Comprehensive survey of scientific literature highlights importance of jointly considering protein, lipids and carbohydrates in aquafeed formulations. *Macronutrient research in aquaculture nutrition*. <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/macronutrient-research-in-aquaculture-nutrition/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs82...1/12%0Ahttps://www.aquaculturealliance.org> (accedido 6.4.23).
- Rosenvold, K., Andersen, H.J., 2003. Factors of significance for pork quality: A review. *Meat Science*. 64, 219-237. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00186-9](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00186-9)
- Ross, C.F., Smith, D.M., 2006. Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5, 18-25. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00077.x>
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., 2001. Residual effect of CO₂ on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*. 212, 413-420. <https://doi.org/10.1007/s002170000270>
- Ruiz, J., García, C., Muriel, E., Andrés, A.I., Ventanas, J., 2002. Influence of sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science*. 61, 347-354.

[https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(01\)00204-2](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(01)00204-2)

- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P.S., Flachowsky, G., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R.E., Wallace, R.J., Wester, P., Lundebye, A., Nebbia, C., Renshaw, D., Innocenti, M.L., Gropp, J., 2018. Modification of the terms of authorisation of lecithins as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal*. 16, 5334. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5334>
- Saka, A.A., Awodola-Peters, O.O., Olaniyi, T.A., Adedeji, O.Y., Bolarinwa, M.O., Yahaya, M.O., Adebisi, G.L., Popoola, M.A., 2021. Climate change and its impact on livestock: A review. *Nigerian Journal of Animal Production*. 48, 185-193.
- Sampels, S., 2013. Oxidation and antioxidants in fish and meat from farm to fork, en: *Food Industry*. Ed.: Muzzalupo, I. IntechOpen Limited, London, UK, pp. 1-15.
- Sánchez Moral, P., Ruiz Méndez, M.V., 2006. Production of pomace olive oil. *Grasas y Aceites*. 57, 47-55. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.21>
- Schaich, K.M., 1980. Free radical initiation in proteins and amino acids by ionizing and ultraviolet radiations and lipid oxidation - part III: Free radical transfer from oxidizing lipids. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 13, 189-244. <https://doi.org/10.1080/10408398009527290>
- Secci, G., Parisi, G., 2016. From farm to fork: lipid oxidation in fish products. A review. *Italian Journal of Animal Science*. 15, 124-136. <https://doi.org/10.1080/1828051x.2015.1128687>
- Selim, S., Albqmi, M., Al-Sanea, M.M., Alnusaire, T.S., Almuhayawi, M.S., AbdElgawad, H., Al Jaouni, S.K., Elkelish, A., Hussein, S., Warrad, M., El-Saadony, M.T., 2022. Valorizing the usage of olive leaves, bioactive compounds, biological activities, and food applications: A comprehensive review. *Frontiers in Nutrition*. 9, 1-27. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1008349>
- Shahidi, F., 2001. Headspace volatile aldehydes as indicators of lipid oxidation in foods, en: *Headspace Analysis of Food and Flavors: Theory and Practice*. Eds.: Rouseff, R.L., Cadwallader, K.R. Springer, New York, USA, pp. 113-123.
- Shahidi, F., de Camargo, A., 2016. Tocopherols and tocotrienols in common and emerging dietary sources: Occurrence, applications, and health benefits. *International Journal of Molecular Sciences*. 17, 1745. <https://doi.org/10.3390/ijms17101745>
- Sheppard, A.J., Pennington, J.A., Weihrauch, J.L., 1992. Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods, en: *Vegetable oils and foods. Vitamin E in health and disease*. Eds.: Packer, L., Fuchs, J. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 9-31.
- Singh, A., Mittal, A., Benjakul, S., 2022. Undesirable discoloration in edible fish muscle: Impact of indigenous pigments, chemical reactions, processing, and its prevention. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 21, 580-603. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12866>
- Sioriki, E., Nasopoulou, C., Demopoulos, C.A., Zabetakis, I., 2015. Comparison of sensory and cardioprotective properties of olive-pomace enriched and conventional gilthead sea bream (*Sparus aurata*): The effect of grilling. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 24, 782-795. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.813100>
- Skalli, A., Robin, J.H., 2004. Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture*. 240, 399-415. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.036>
- Skaltsounis, A.L., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Xynos, N., 2015. Recovery of high added value compounds from olive tree products and olive processing byproducts, en:

- Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. Ed.: Boskou, D. Academic Press and AOCS Press, London, UK, pp. 333-356.
- Sklan, D., 1979. Digestion and absorption of lipids in chicks fed triglycerides or free fatty acids: synthesis of monoglycerides in the intestine. *Poultry Science*. 58, 885-889. <https://doi.org/10.3382/ps.0580885>
- Soares, M., Lopez-Bote, C.J., 2002. Effects of dietary lecithin and fat unsaturation on nutrient utilisation in weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*. 95, 169-177. [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(01\)00324-8](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(01)00324-8)
- Soladoye, O.P., Juárez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., Estévez, M., 2015. Protein oxidation in processed meat: Mechanisms and potential implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14, 106-122. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12127>
- Subcommittee on aquaculture of FAO, 2012. Feeding the growing aquaculture sector: an analysis: for discussion and decision (COFI:AQ/VI/2012/7). Sixth Session. Cape Town, South Africa, 26-30 March 2012 - Report. <https://www.fao.org/3/mc825e/mc825e.pdf> (accedido 6.4.23).
- Suman, S.P., Nair, M.N., 2017. Current developments in fundamental and applied aspects of meat color, en: *New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics*. Ed.: Purslow, P.P. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 111-127.
- Takeuchi, T., 1997. Essential fatty acid requirements of aquatic animals with emphasis on fish larvae and fingerlings. *Reviews in Fisheries Science*. 5, 1-25. <https://doi.org/10.1080/10641269709388592>
- Talbot, G., 2016. The stability and shelf life of fats and oils, en: *The Stability and Shelf Life of Food*. Ed.: Subramaniam, P. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 461-503.
- Tay, B., Ping, Y., Yusof, M., 2009. Characteristics and properties of fatty acid distillates from palm oil. *Oil Palm Bulletin*. 59, 5-11.
- Teixeira, A., Rodrigues, S., 2021. Consumer perceptions towards healthier meat products. *Current Opinion in Food Science*. 38, 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.004>
- Thanonkaew, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Decker, E.A., 2006. The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) subjected to multiple freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*. 95, 591-599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.040>
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J., Bell, J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*. 280, 21-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>
- Tocher, D.R., Glencross, B.D., 2015. Lipids and fatty acids, en: *Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*. Eds.: Lee, C.S., Lim, C., Gatlin III, D.M., Webster, C.D. Wiley-Blackwell, Hoboken, USA, pp. 47-94.
- Torrissen, J.K., Onozaka, Y., 2017. Comparing fish to meat: Perceived qualities by food lifestyle segments. *Aquaculture Economics & Management*. 21, 44-70. <https://doi.org/10.1080/13657305.2017.1265022>
- Torstensen, B.E., Froyland, L., Lie, O., 2004. Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil: Effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities. *Aquaculture Nutrition*. 10, 175-192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00289.x>
- Torstensen, B.E., Bell, J.G., Rosenlund, G., Henderson, R.J., Graff, I.E., Tocher, D.R., Lie, Ø., Sargent, J.R., 2005. Tailoring of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 10166-10178.
<https://doi.org/10.1021/jf051308i>
- Tres, A., Nuchi, C.D., Bou, R., Codony, R., Guardiola, F., 2009. Assessing rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through the ferrous oxidation-xyleneol orange method. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 111, 563-573.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200800230>
- Trullàs, C., Fontanillas, R., Tres, A., Sala, R., 2015. Vegetable re-esterified oils in diets for rainbow trout: Effects on fatty acid digestibility. *Aquaculture*. 444, 28-35.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.018>
- Tsubone, T.M., Martins, W.K., Franco, M.S.F., Silva, M.N., Itri, R., Baptista, M.S., 2021. Cellular compartments challenged by membrane photo-oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 697, 108665.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108665>
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*. 1, 10-57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>
- Turchini, G.M., Trushenski, J.T., Glencross, B.D., 2019. Thoughts for the future of aquaculture nutrition: Realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. *North American Journal of Aquaculture*. 81, 13-39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>
- Vaisali, C., Charanyaa, S., Belur, P.D., Regupathi, I., 2015. Refining of edible oils: a critical appraisal of current and potential technologies. *International Journal of Food Science and Technology*. 50, 13-23. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12657>
- van Nieuwenhuyzen, W., Tomás, M.C., 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 110, 472-486. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800041>
- van Nieuwenhuyzen, W., 2015. Production and utilization of natural phospholipids, en: *Polar Lipids. Biology, Chemistry, and Technology*. Eds.: Ahmad, M.U., Xu, X. Academic Press and AOCS Press, Cambridge, UK, pp. 245-276.
- Vandeputte, M., Gagnaire, P.A., Allal, F., 2019. The European sea bass: a key marine fish model in the wild and in aquaculture. *Animal Genetics*. 50, 195-206.
<https://doi.org/10.1111/age.12779>
- Varona, E., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Barroeta, A.C., Guardiola, F., 2021a. Composition and nutritional value of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding. *Animals*. 11, 196. <https://doi.org/10.3390/ani11010196>
- Varona, E., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Barroeta, A.C., Guardiola, F., 2021b. Methods to determine the quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding. *MethodsX*. 8, 101334. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101334>
- Varona, E., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Sala, R., Guardiola, F., 2021c. Oxidative quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding. *Animals*. 11, 2559.
<https://doi.org/10.3390/ani11092559>
- Veberg, A., Sørheim, O., Moan, J., Iani, V., Juzenas, P., Nilsen, A.N., Wold, J.P., 2006. Measurement of lipid oxidation and porphyrins in high oxygen modified atmosphere and vacuum-packed minced turkey and pork meat by fluorescence spectra and images. *Meat Science*. 73, 511-520. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.02.001>
- Venugopal, V., Shahidi, F., 1996. Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*. 12, 175-197. <https://doi.org/10.1080/87559129609541074>
- Verge-Mèrida, G., Barroeta, A.C., Guardiola, F., Verdú, M., Balart, M., Font-i-Furnols, M., Solà-Oriol, D., 2021. Crude and acid oils from olive pomace as alternative fat sources

- in growing-finishing pigs. *Animal*. 15, 100389. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100389>
- Verge-Mérida, G., Solà-Oriol, D., Tres, A., Verdú, M., Farré, G., Garcés-Narro, C., Barroeta, A.C., 2022. Olive pomace oil and acid oil as alternative fat sources in growing-finishing broiler chicken diets. *Poultry Science*. 101, 102079. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102079>
- Verhé, R., 2004. Industrial products from lipids and proteins, en: *Renewable Bioresources Scope and Modification for Non-food Applications*. Eds.: Stevens, C.V., Verhé, R. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 208-250.
- Verhé, R., Verleyen, T., Van Hoed, V., De Greyt, W., 2006. Influence of refining of vegetable oils on minor components. *Journal of Oil Palm Research Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*. 1, 168-179.
- Vilarrasa, E., Barroeta, A.C., Tres, A., Esteve-Garcia, E., 2015a. Use of re-esterified palm oils, differing in their acylglycerol structure, in weaning-piglet diets. *Animal*. 9, 1304-1311. <https://doi.org/10.1017/s1751731115000622>
- Vilarrasa, E., Codony, R., Esteve-Garcia, E., Barroeta, A.C., 2015b. Use of re-esterified oils, differing in their degree of saturation and molecular structure, in broiler chicken diets. *Poultry Science*. 94, 1527-1538. <https://doi.org/10.3382/ps/pev073>
- Viñado, A., Castillejos, L., Rodriguez-Sanchez, R., Barroeta, A.C., 2019. Crude soybean lecithin as alternative energy source for broiler chicken diets. *Poultry Science*. 98, 5601-5612. <https://doi.org/10.3382/ps/pez318>
- Viñado, A., Castillejos, L., Barroeta, A.C., 2020. Soybean lecithin as an alternative energy source for grower and finisher broiler chickens: impact on performance, fatty acid digestibility, gut health, and abdominal fat saturation degree. *Poultry Science*. 99, 5653-5662. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.050>
- Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K., 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*. 12, 603-611. [https://doi.org/10.1016/s0959-6526\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0959-6526(03)00078-7)
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., Rissanen, T.H., 2006. Carotenoids and cardiovascular health. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83, 1265-1271. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1265>
- Waldroup, P.W., Tollett, V.E., 1972. The acceptability of acidulated cottonseed soapstock as an energy supplement for broiler diets. *Poultry Science*. 51, 1907-1914. <https://doi.org/10.3382/ps.0511907>
- Wang, T., 2011. Soybean oil, en: *Vegetable Oils in Food Technology. Composition, Properties and Uses*. Ed.: Gunstone, F.D. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, pp. 59-105.
- Weichselbaum, E., Coe, S., Buttriss, J., Stanner, S., 2013. Fish in the diet: A review. *Nutrition Bulletin*. 38, 128-177. <https://doi.org/10.1111/nbu.12021>
- Wendel, A., 2014. Lecithin, en: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Hoboken, USA, pp. 1-19.
- Winkler-Moser, J.K., Mehta, B.M., 2015. Chemical composition of fat and oil products, en: *Handbook of Food Chemistry*. Eds.: Cheung, P.C.K., Mehta, B.M. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 365-402.
- Wiseman, J., Salvador, F., 1991. The influence of free fatty acid content and degree of saturation on the apparent metabolizable energy value of fats fed to broilers. *Poultry Science*. 70, 573-582. <https://doi.org/10.3382/ps.0700573>
- Wiseman, J., Powles, J., Salvador, F., 1998. Comparison between pigs and poultry in the prediction of the dietary energy value of fats. *Animal Feed Science and Technology*.

- 71, 1-9. [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(97\)00142-9](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(97)00142-9)
- Woerfel, J.B., 1981. Processing and utilization of by-products from soy oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 58, 188-191. <https://doi.org/10.1007/bf02582333>
- Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R., Enser, M., 2004a. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*. 66, 21-32. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(03)00022-6)
- Wood, J.D., Nute, G.R., Richardson, R.I., Whittington, F.M., Southwood, O., Plastow, G., Mansbridge, R., da Costa, N., Chang, K.C., 2004b. Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science*. 67, 651-667. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.007>
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M., 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*. 78, 343-358. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>
- Wood, J.D., Enser, M., 2017. Manipulating the fatty acid composition of meat to improve nutritional value and meat quality, en: *New Aspects of Meat Quality. From Genes to Ethics*. Ed.: Purslow, P.P. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 501-535.
- World Bank, 2013. Fish to 2030: Prospects for fisheries and aquaculture. Report number 83177-GLB. Agriculture and environmental services discussion paper 03. <http://documents.worldbank.org/curated/en/2013/12/18882045/fish-2030-prospects-fisheries-aquaculture> (accedido 6.4.23).
- Xiao, S., Zhang, W.G., Lee, E.J., Ma, C.W., Ahn, D.U., 2011. Effects of diet, packaging, and irradiation on protein oxidation, lipid oxidation, and color of raw broiler thigh meat during refrigerated storage. *Poultry Science*. 90, 1348-1357. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01244>
- Xiong, Y.L., 2017. The Storage and Preservation of Meat, en: *Lawrie's Meat Science*. Ed.: Toldrá, F. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 205-230.
- Yeum, K.J., Aldini, G., Russell, R.M., Krinsky, N.I., 2010. Antioxidant/pro-oxidant actions of carotenoids, en: *Carotenoids. Volume 5: Nutrition and Health*. Eds.: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 369-374.
- Zhan, X., Sun, D.W., Zhu, Z., Wang, Q.J., 2018. Improving the quality and safety of frozen muscle foods by emerging freezing technologies: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58, 2925-2938. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1345854>
- Zhang, X., Owens, C.M., Schilling, M.W., 2017. Meat: the edible flesh from mammals only or does it include poultry, fish, and seafood? *Animal Frontiers*. 7, 12-18. <https://doi.org/10.2527/af.2017.0437>
- Zio, S., Cisse, H., Zongo, O., Guira, F., Tapsoba, F., Siourime Somda, N., Hama-Ba, F., Touloumde Songre-Ouattara, L., Zongo, C., Traore, Y., Savadogo, A., 2020. The oils refining process and contaminants in edible oils: A review. *Journal of Food Technology Research*. 7, 9-47. <https://doi.org/10.18488/journal.58.2020.71.9.47>
- Zumbado, M.E., Scheele, C.W., Kwakernaak, C., 1999. Chemical composition, digestibility, and metabolizable energy content of different fat and oil by-products. *Journal of Applied Poultry Research*. 8, 263-271. <https://doi.org/10.1093/japr/8.3.263>

9 ANEXOS



Anexo I

-Información suplementaria de la publicación científica: Efecto de la alimentación con aceites ácidos sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de los filetes de lubina-

Effect of feeding acid oils on European seabass fillet lipid composition, oxidative stability, color and sensory acceptance – Supplementary Material

Paula Albendea, Alba Tres, Magdalena Rafecas, Stefania Vichi, Roser Sala and Francesc Guardiola. *Aquaculture Nutrition*, 2023, 6415693 <https://doi.org/10.1155/2023/6415693>.

Determination of fatty acid composition of experimental diets

Lipids were extracted from 2 g of feed by using diethyl ether according to the Soxtec extraction method 2003.05 of the AOAC international [1]. After extraction, the solvent was not evaporated to dryness (up to approx. 1 mL) to prevent lipid oxidation and more diethyl ether was added to transfer the lipid extract from Soxtec vessels to two glass test tubes with screw cap (approximately half of the lipid extract to each tube). Diethyl ether was completely evaporated from tubes under a nitrogen stream at 30°C in a block heater and the lipid extract was stored at -20°C until the analyses. One tube was used for the determination of the fatty acid (FA) composition and the other to analyze the lipid class composition, as described below. For FA determination, the lipid extract was submitted to a double methylation in methanolic medium and FA methyl esters were determined by GC-FID [2] and quantified by peak area normalization.

Determination of tocopherol and tocotrienol content of experimental diets

The tocopherol (T) and tocotrienol (T3) determination was adapted from Bou et al. [3]. Briefly, 1.5 g of feed were homogenized using a high-speed homogenizer (Model PT 3100 Polytron, Kinematica, Lucerne, Switzerland) at 20,000 rpm for 30 s. After saponification, the non-saponifiable fraction was extracted with petroleum ether and filtered through a 0.45- μ m Teflon membrane. After complete evaporation of the petroleum ether under a nitrogen stream at 30°C in a block heater, the residue was redissolved in an exact volume of 99% n-hexane and injected into the HPLC system. HPLC was performed as explained by Aleman et al. [4] and a 1260 Infinity II Fluorescence

Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used with the excitation and emission wavelengths set at 290 and 320 nm, respectively. Calibration curves were prepared for each T, using a set of T standards (α -, β -, γ - and δ -T) from Calbiochem® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The content of α -, β -, γ - and δ -T3 was calculated by applying the calibration curve obtained for the corresponding T analogue.

Determination of lipid class composition of experimental diets

The lipid extraction of the feeds was performed by the Soxtec method as described above. The lipid extract was dissolved in 2 mL of tetrahydrofuran (HPLC grade from Scharlau, Sentmenat, Spain) and a 1:2 (v/v) dilution was made to obtain a lipid concentration of \approx 15 mg/mL. Then, the percentages of triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols and free FA were determined by size molecular exclusion chromatography (HPLC-RID) as described by Varona et al. [2] and quantified by peak area normalization.

Table S1. Complete fatty acid profile of fresh fillets coming from fish fed with the five experimental diets.

FA (%)	FO¹	SO¹	SAO¹	OPO¹	OPAO¹	SEM²	p³
C14:0	2.5 ^a	1.5 ^c	1.7 ^b	1.6 ^{bc}	1.6 ^{bc}	0.026	< 0.001
C16:0	19.2 ^a	16.4 ^{bc}	16.4 ^{bc}	16.6 ^b	16.0 ^c	0.130	< 0.001
C17:0	0.6 ^a	0.3 ^b	0.3 ^b	0.3 ^b	0.3 ^b	0.013	< 0.001
C18:0	4.7 ^a	4.6 ^a	4.3 ^b	4.0 ^c	3.9 ^c	0.053	< 0.001
C20:0	0.3 ^{ab}	0.3 ^{ab}	0.2 ^{ab}	0.3 ^a	0.2 ^b	0.006	0.009
C22:0	0.2 ^{ab}	0.2 ^a	0.2 ^a	0.1 ^c	0.2 ^{bc}	0.007	< 0.001
SFA	27.5 ^a	23.2 ^b	23.2 ^b	22.9 ^{bc}	22.3 ^c	0.187	< 0.001
C16:1 n-9	0.6 ^a	0.4 ^c	0.4 ^c	0.5 ^b	0.5 ^b	0.006	< 0.001
C16:1 n-7	4.0 ^a	2.3 ^c	2.5 ^{bc}	2.6 ^b	2.7 ^b	0.053	< 0.001
C18:1 n-9	25.8 ^d	27.8 ^d	30.6 ^c	43.3 ^a	40.6 ^b	0.538	< 0.001
C18:1 n-7	1.8 ^a	1.6 ^{ab}	1.4 ^{ab}	1.2 ^b	1.6 ^{ab}	0.118	0.022
C20:1 n-9	1.9 ^a	1.4 ^d	1.5 ^{cd}	1.6 ^b	1.6 ^{bc}	0.027	< 0.001
MUFA	34.0 ^{bc}	33.4 ^c	36.5 ^b	49.2 ^a	47.0 ^a	0.560	< 0.001
C18:2 n-6	11.4 ^e	26.2 ^a	23.7 ^b	12.9 ^d	15.1 ^c	0.310	< 0.001
C18:3 n-6	0.2 ^c	0.3 ^a	0.3 ^a	0.2 ^c	0.2 ^b	0.006	< 0.001
C20:2 n-6	0.7 ^c	1.0 ^a	0.9 ^b	0.5 ^d	0.5 ^d	0.018	< 0.001
C20:4 n-6	1.7 ^a	0.7 ^b	0.8 ^b	0.8 ^b	0.8 ^b	0.024	< 0.001
n-6 PUFA	13.9 ^d	28.3 ^a	25.6 ^b	14.4 ^d	16.6 ^c	0.314	< 0.001
C18:3 n-3	2.0 ^c	3.8 ^a	2.6 ^b	1.9 ^d	1.9 ^{cd}	0.028	< 0.001
C20:3 n-3	0.9 ^a	0.6 ^b	0.6 ^b	0.6 ^b	0.6 ^b	0.017	< 0.001
C20:5 n-3	5.3 ^a	2.7 ^c	3.0 ^b	2.9 ^{bc}	3.0 ^b	0.055	< 0.001
C22:6 n-3	16.1 ^a	7.7 ^b	8.2 ^b	7.9 ^b	8.1 ^b	0.293	< 0.001
n-3 PUFA	24.3 ^a	14.8 ^b	14.4 ^b	13.2 ^b	13.7 ^b	0.331	< 0.001
Total PUFA	38.2 ^b	43.0 ^a	40.0 ^b	27.6 ^d	30.3 ^c	0.483	< 0.001

Abbreviations: FO, fish oil diet; SO, crude soybean oil diet; SAO, soybean-sunflower acid oil diet; OPO, crude olive pomace oil diet; and OPAO, olive pomace acid oil diet; FA, fatty acid; SFA, saturated fatty acids (sum of C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0 and C22:0); MUFA, monounsaturated fatty acids (sum of C16:1 n-9, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7 and C20:1 n-9); PUFA, polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA: sum of C18:2 n-6, C18:3 n-6, C20:2 n-6 and C20:4 n-6; n-3 PUFA: sum of C18:3 n-3, C20:3 n-3, C20:5 n-3 and C22:6 n-3; Total PUFA: sum of n-3 PUFA and n-6 PUFA. ¹ Data were expressed as the mean of the five replicates from each dietary treatment (n = 5). ² Standard error of the mean. ³ p values obtained by ANOVA (n = 25). Values in bold were significant (p < 0.05). Differences between dietary treatments found with Scheffé's post hoc test were noted in the same row as a > b > c > d > e.

References

- [1] AOAC International, "AOAC Official Method 2003.05. Crude Fat in Feeds, Cereal Grains, and Forages", in *Official Methods of Analysis of AOAC International, Chapter 4 - Animal Feed*, pp.41–43. AOAC International, Rockville, MD, 21th edition, 2019.
- [2] E. Varona, A. Tres, M. Rafecas, S. Vichi, A. C. Barroeta, and F. Guardiola, "Methods to determine the quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding," *MethodsX*, vol. 8, article 101334, 2021, doi: 10.1016/j.mex.2021.101334.
- [3] R. Bou, F. Guardiola, A. Tres, A. C. Barroeta, and R. Codony, "Effect of dietary fish oil, α -tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat," *Poultry Science*, vol. 83, no. 2, pp. 282–292, 2004, doi: 10.1093/ps/83.2.282.
- [4] M. Aleman, C. D. Nuchi, R. Bou, A. Tres, J. Polo, F. Guardiola, and R. Codony, "Effectiveness of antioxidants in preventing oxidation of palm oil enriched with heme iron: A model for iron fortification in baked products," *European Journal Lipid Science and Technology*, vol. 112, no. 7, pp. 761–769, 2010, doi: 10.1002/ejlt.200900220.

Anexo II

-Información suplementaria de la publicación científica: Efecto de la alimentación con aceite ácido de orujo de oliva sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de carne de cerdo-

Effect of feeding olive pomace acid oil on pork lipid composition, oxidative stability, color and sensory acceptance. – Supplementary Material

Paula Albendea, Alba Tres, Magdalena Rafecas, Stefania Vichi, David Solà-Oriol, Marçal Verdú and Francesc Guardiola. Animal, Manuscript number: ANIMAL-22-61374R3, Accepted on 05 Jun 2023.

Determination of fatty acid composition of experimental diets

Lipids were extracted from 2 g of feed by using diethyl ether according to the Soxtec extraction method 2003.05 of AOAC International (2019). After extraction, the total evaporation of the solvent was avoided to prevent oxidation and more diethyl ether was added to transfer the lipid extract from Soxtec vessels to two glass test tubes with screw cap (approximately half of the lipid extract to each tube). Diethyl ether was completely evaporated from tubes under a nitrogen stream at 30°C in a block heater and the lipid extract was stored at -20°C until the analyses. One tube was used for the determination of the fatty acid composition and the other to analyse the lipid class composition, as described below. For fatty acid determination, the lipid extract was submitted to a double methylation in methanolic medium and fatty acid methyl esters were determined by GC-FID (Varona et al., 2021) and quantified by peak area normalization.

Determination of tocopherol and tocotrienol content of experimental diets

The tocopherol and tocotrienol determination was adapted from Bou et al. (2004). Briefly, 1.5 g of feed were homogenized with a PT 3100 Polytron (20 000 rpm and 30 s). After saponification, the non-saponifiable fraction was extracted with petroleum ether and filtered through a 0.45-µm Teflon membrane. After complete evaporation of the petroleum ether under a nitrogen stream at 30°C in a block heater, the residue was redissolved in an exact volume of 99% n-hexane and injected into the HPLC system. HPLC was performed as explained by Aleman et al. (2010) and a 1260 Infinity II Fluorescence Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used with the excitation and emission wavelengths set at 290 and 320 nm, respectively. Calibration curves were

prepared for each tocopherol, using a set of standards (α -, β -, γ - and δ -tocopherol) from Calbiochem® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Each tocotrienol (α -, β -, γ - and δ -tocotrienol) was quantified using the corresponding tocopherol calibration curve.

Determination of lipid class composition of experimental diets

The lipid extraction of the feeds by the Soxtec method was performed as described above. The lipid extract was dissolved in 2 mL of tetrahydrofuran (HPLC grade from Scharlau, Sentmenat, Spain) and a 1:2 dilution was made to obtain a lipid concentration of ≈ 15 mg/mL. Then, the percentages of triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols and free fatty acids were determined by size molecular exclusion chromatography (HPLC-RID) as described by Varona et al. (2021) and quantified by peak area normalization.

Table S1. Complete fatty acid profile of the experimental fat sources.

FA (%)	Fat source ¹		
	PO	OPO	OPAO
C14:0	0.9 ± 0.02	ND	0.1 ± 0.01
C16:0	42.4 ± 0.02	12.8 ± 0.15	13.5 ± 0.04
C18:0	4.6 ± 0.02	2.6 ± 0.04	3.6 ± 0.01
C20:0	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.6 ± 0.01
C22:0	ND	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.01
C24:0	ND	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.01
Saturated FA ²	48.2 ± 0.02	16.1 ± 0.19	18.6 ± 0.04
C16:1 n-7	0.1 ± 0.01	1.0 ± 0.02	0.8 ± 0.01
C18:1 n-9	40.8 ± 0.06	67.0 ± 0.11	62.2 ± 0.23
C18:1 n-7	0.8 ± 0.14	2.8 ± 0.07	2.1 ± 0.01
C20:1 n-9	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01
Monounsaturated FA ³	41.8 ± 0.09	71.1 ± 0.18	65.4 ± 0.20
C18:2 n-6	9.7 ± 0.06	12.0 ± 0.01	15.0 ± 0.05
C18:3 n-3	0.3 ± 0.01	0.9 ± 0.01	1.0 ± 0.01
Polyunsaturated FA ⁴	10.0 ± 0.06	12.8 ± 0.01	15.8 ± 0.04
<i>trans</i> C18:1	ND	ND	0.2 ± 0.02

Abbreviations: PO = crude palm oil; OPO = crude olive pomace oil; OPAO = olive pomace acid oil; FA = fatty acids; ND = not detected. ¹ Mean ± standard deviation (n = 3 determinations). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. ² Sum of C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 and C24:0. ³ Sum of C16:1 n-7; C18:1 n-9; C18:1 n-7 and C20:1 n-9. ⁴ Sum of C18:2 n-6 and C18:3 n-3.

Table S2 Ingredients, proximate composition and energy of the grower and finisher experimental diets (Verge-Mérida et al., 2021).

	Grower diets ¹	Finisher diets ¹
Ingredient composition (%)		
Corn meal	30.00	17.98
Barley	8.00	18.07
Sorghum	11.70	16.15
Wheat	10.00	10.00
Soybean meal 47%	15.95	10.96
Wheat bran	5.75	8.00
Experimental fat source ²	5.00	5.00
Silicate	2.74	2.74
Cane molasses	2.00	-
Sunflower meal 30%	5.00	7.04
Calcium carbonate	0.90	1.12
Di-calcium phosphate	0.65	0.64
Sodium chloride	0.55	0.60
Vitamin and mineral premix ³	0.61	0.61
DL-Methionine ⁴	0.17	0.13
L-Lysine sulphate ⁵	0.73	0.74
L-Tryptophan	0.02	0.02
L-Threonine	0.19	0.18
L-Valine	0.04	0.02
Proximate composition⁶ (%)		
Dry matter	88.43	87.28
Crude protein	16.05	15.53
Ether extract	6.55	6.32
Crude fiber	4.45	4.15
Ash	6.38	6.66
Energy (MJ/kg)		
Net energy	10.21	10.13
Gross energy	17.28	16.97

¹ Grower diets were used from 0 to 40 days and finisher diets from 41 to 61 days. ² The experimental fat source added was crude palm oil (PO), crude olive pomace oil (OPO), olive pomace acid oil (OPAO) or a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w) (B). ³ Provides per kg of feed: vitamin A, 5 995 IU; Vitamin D3, 1 497 IU; Vitamin E, 15 mg (α -tocopheryl acetate); Fe, 100 mg ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); I, 0.3 mg (KI); Cu, 18 mg ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); Mn, 40 mg (MnO_2); Zn, 94 mg (ZnO); Se, 0.34 mg (Na_2SeO_3). ⁴ DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMTBa), the hydroxy analogue of DL-methionine. ⁵ L-Lysine sulphate. ⁶ Proximate composition expressed on a fresh matter basis.

Table S3. Complete fatty acid profile of the grower and finisher experimental diets.

FA (%)	Grower diets ¹				Finisher diets ¹			
	PO	OPO	OPAO	B	PO	OPO	OPAO	B
C12:0	0.1 ± 0.05	ND	ND	ND	0.1 ± 0.02	ND	ND	ND
C14:0	0.5 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.5 ± 0.07	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.07	0.4 ± 0.01
C16:0	32.9 ± 1.11	13.4 ± 0.03	13.3 ± 0.38	23.7 ± 0.27	31.6 ± 0.13	13.7 ± 0.08	13.5 ± 0.01	23.9 ± 0.27
C18:0	3.8 ± 0.21	2.6 ± 0.02	3.1 ± 0.19	3.5 ± 0.01	3.9 ± 0.17	2.6 ± 0.08	3.0 ± 0.04	3.5 ± 0.06
C20:0	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.02	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.02	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01
C22:0	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01
Saturated FA ²	37.6 ± 1.13	16.8 ± 0.04	17.2 ± 0.42	28.0 ± 0.27	36.4 ± 0.22	17.1 ± 0.11	17.1 ± 0.04	28.4 ± 0.27
C16:1 n-7	0.2 ± 0.01	0.6 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.01	0.3 ± 0.01
C18:1 n-9	35.8 ± 0.46	49.8 ± 0.02	49.4 ± 0.13	41.9 ± 1.26	36.6 ± 0.20	49.8 ± 0.02	48.7 ± 0.03	41.3 ± 0.30
C18:1 n-7	0.9 ± 0.06	2.2 ± 0.26	1.6 ± 0.10	0.8 ± 1.07	0.8 ± 0.01	2.0 ± 0.02	1.7 ± 0.06	1.2 ± 0.11
C20:1 n-9	0.2 ± 0.02	0.3 ± 0.03	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01
Monounsaturated FA ³	37.0 ± 0.42	53.0 ± 0.21	51.8 ± 0.05	43.2 ± 0.19	37.7 ± 0.18	52.7 ± 0.02	51.3 ± 0.09	43.1 ± 0.19
C18:2 n-6	24.3 ± 0.52	28.8 ± 0.13	29.7 ± 0.90	27.4 ± 0.12	24.7 ± 0.28	28.6 ± 0.08	29.9 ± 0.04	27.1 ± 0.01
C18:3 n-3	0.9 ± 0.08	1.4 ± 0.01	0.9 ± 0.82	1.2 ± 0.01	1.0 ± 0.02	1.5 ± 0.02	1.5 ± 0.01	1.3 ± 0.01
Polyunsaturated FA ⁴	25.2 ± 0.52	30.2 ± 0.13	30.6 ± 1.22	28.6 ± 0.12	25.7 ± 0.28	30.0 ± 0.08	31.5 ± 0.04	28.4 ± 0.01

Abbreviations: FA = fatty acids; PO = crude palm oil; OPO = crude olive pomace oil; OP AO = olive pomace acid oil; B = diet with a blend of PO and OP AO at 50/50 (w/w); ND = not detected. ¹ Mean ± standard deviation (n = 2 determinations). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. ² Sum of C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0 and C22:0.

³ Sum of C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7 and C20:1 n-9.

Table S4. Complete fatty acid profile and tocopherol and tocotrienol concentrations of fresh pork loin coming from female and entire male pigs fed with the four experimental diets.

FA (%)	Diet ¹				Sex ²				P _{sex x diet} ⁴		
	PO		B		Female		Entire male			SEM	P _{sex} ⁴
	OPO	OPA	O	A	P	P	P	P			
C14:0	1.1	1.2	1.2	1.1	0.047	0.399	1.2	1.2	0.032	0.74	0.181
C16:0	23.7 ^a	22.7 ^{bc}	22.2 ^c	23.3 ^{ab}	0.22	< 0.001	22.8	23.1	0.151	0.105	0.438
C18:0	11.1 ^{ab}	10.9 ^{ab}	10.4 ^b	11.4 ^a	0.249	0.038	10.8	11.1	0.165	0.343	0.104
Saturated FA ⁵	35.9 ^a	34.8 ^{ab}	33.8 ^b	35.8 ^a	0.409	0.002	34.8	35.4	0.269	0.146	0.131
C16:1 n-7	2.4	2.4	2.4	2.3	0.099	0.772	2.3	2.4	0.07	0.137	0.641
C18:1 n-9	40.3	42	41.7	41.5	0.457	0.065	40.6	42.1	0.26	< 0.001	0.799
C18:1 n-7	3.1	3.1	3.1	2.8	0.093	0.058	3	3.1	0.086	0.052	0.052
C20:1 n-9	0.6	0.7	0.6	0.7	0.041	0.406	0.7	0.6	0.03	0.394	0.741
Monounsaturated FA ⁶	46.4	48.1	47.8	47.2	0.523	0.14	46.5	48.3	0.297	< 0.001	0.994
C18:2 n-6	14.6	14.1	15.1	14.2	0.591	0.663	15.6	13.4	0.304	< 0.001	0.429
C20:2 n-6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.02	0.277	0.46	0.53	0.012	< 0.001	0.932
C20:3 n-6	0.3	0.2	0.2	0.2	0.011	0.156	0.3	0.2	0.008	0.066	0.561
C20:4 n-6	1.8	1.6	1.7	1.4	0.113	0.058	1.6	1.6	0.079	0.447	0.276
n-6 Polyunsaturated FA ⁷	17.1	16.4	17.5	16.3	0.681	0.531	18	15.6	0.367	< 0.001	0.361
n-3 Polyunsaturated FA ⁷	0.5	0.5	0.6	0.5	0.047	0.122	0.6	0.5	0.034	0.2	0.361
Polyunsaturated FA ⁷	17.5	16.9	18.2	16.8	0.69	0.484	18.6	16.1	0.37	< 0.001	0.411
Unsaturated-to-saturated	1.8 ^b	1.9 ^{ab}	2.0 ^a	1.8 ^b	0.034	0.003	1.9	1.8	0.022	0.124	0.132
T and T3 (mg/kg)											
α-T	2.32 ^a	1.27 ^c	1.15 ^c	1.73 ^b	0.088	< 0.001	1.56	1.68	0.059	0.169	0.159
γ-T	0.12	0.1	0.11	0.11	0.009	0.443	0.11	0.1	0.007	0.704	0.96
T + T3 ⁹	2.45 ^a	1.38 ^c	1.28 ^c	1.87 ^b	0.09	< 0.001	1.7	1.8	0.069	0.265	0.237

Abbreviations: PO = crude palm oil; OPO = crude olive pomace oil; OPAO = olive pomace acid oil; B = diet with a blend of PO and OPAO at 50/50 (w/w); FA = fatty acids; T = tocopherol; T3 = tocotrienol; SEM = standard error of the mean. ¹ Mean of the different experimental replicates from each diet (n = 8). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. ² Mean of the different experimental replicates from each sex (n = 16). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. ³ P values obtained by ANOVA (n = 32). Values in bold were significant (P < 0.05). Differences among diets found with Scheffé's post hoc test (n = 32) were noted in the same row as a > b > c. ⁴ P values obtained by multifactor ANOVA (n = 32). Values in bold were significant (P < 0.05). ⁵ Sum of C14:0, C16:0 and C18:0. ⁶ Sum of C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7 and C20:1 n-9. ⁷ n-6 Polyunsaturated FA: sum of C18:2 n-6, C20:2 n-6 and C20:3 n-6 and C20:4 n-6; n-3 Polyunsaturated FA, was equivalent to C18:3 n-3; Polyunsaturated FA, sum of n-3 and n-6 polyunsaturated FA. ⁸ Ratio between monounsaturated + polyunsaturated FA and

Table S5. Oxidative stability, secondary oxidation and color parameters of fresh pork loin coming from female and entire male pigs fed with the four experimental diets

	Diet ¹				Sex ²						
	PO	OPO	OPAO	B	SEM	<i>P</i> _{diet} ³	Female	Entire male	SEM	<i>P</i> _{sex} ⁴	<i>P</i> _{sex × diet} ⁴
Oxidative stability											
Final LHP ⁵	0.14 ^b	0.33 ^{ab}	0.65 ^{ab}	0.34 ^b	0.089	0.004	0.41	0.32	0.065	0.337	0.843
Secondary oxidation											
TBA value ⁶	17.9	20.1	34.57	17.9	5.775	0.199	22.83	26.1	4.154	0.583	0.448
Volatile compound											
(µg/kg)											
Propanal	0.2	0.2	0.2	0.2	0.015	0.299	0.3	0.2	0.024	0.107	0.084
Pentanal	1.7	1.6	2.1	0.7	0.546	0.318	3.1	1.9	0.437	0.058	0.078
Hexanal	36.9	37.7	53	15.9	14.731	0.378	50	27.4	7.627	0.04	0.035
Heptanal	1.6	1.6	1.9	1.9	0.573	0.982	2	0.9	0.259	0.01	0.102
Octanal	1.7	1.2	1.1	1.5	0.48	0.817	1.2	0.7	0.197	0.099	0.27
1-Pentanol	10.2	12.6	11.8	7.5	2.792	0.587	53.2	53	8.731	0.987	0.978
1-Hexanol	13.6	15.2	15	13.6	2.381	0.94	34.1	33.2	4.373	0.885	0.987
1-Octen-3-ol	184	194	231	158	29.162	0.374	324.2	338.7	35.090	0.77	0.829
2-Heptanone	14	13	15	12.5	1.837	0.778	33.3	36.6	4.454	0.601	0.996
2-Octanone	3.5	3.3	3.9	3.5	0.464	0.787	10.8	9.3	1.361	0.422	0.916
3-Octanone	0.4	0.3	0.4	0.4	0.04	0.511	0.9	0.8	0.128	0.77	0.301
1-Octen-3-one	6.2	6.5	7	4.9	0.726	0.224	9.8	10.7	0.997	0.59	0.924
2-Pentylfuran	4.5	5.1	6.2	4.1	0.775	0.271	10	9.2	1.292	0.621	0.909
Color parameters											
L*	61	60.8	61.64	62.3	0.622	0.338	61.25	61.56	0.45	0.631	0.495
a*	21.1	21.7	21.24	20.9	0.365	0.525	21.56	20.91	0.247	0.074	0.409
b*	12.1	12.4	12.32	12.6	0.125	0.079	12.39	12.37	0.091	0.902	0.452

Abbreviations: PO = crude palm oil; OPO = crude olive pomace oil; OPAO = olive pomace acid oil; LHP = lipid hydroperoxide; CHP = cumene hydroperoxide; TBA = 2-thiobarbituric acid; MDA = malondialdehyde; SEM = standard error of the mean.
¹ Mean of the different experimental replicates from each diet (n = 8). ² Mean of the different experimental replicates from each sex (n = 16). ³ *P* values obtained by ANOVA (n = 32). Values in bold were significant (*P* < 0.05). Differences among diets found with Scheffé's post hoc test (n = 32) were noted in the same row as a > b. ⁴ *P* values obtained by multifactor ANOVA (n = 32). Values in bold were significant (*P* < 0.05). ⁵ Final LHP value was expressed in cumene hydroperoxide equivalents/kg of sample. TBA value was expressed in µg of malondialdehyde/kg of sample

References

Aleman, M., Nuchi, C.D., Bou, R., Tres, A., Polo, J., Guardiola, F., Codony, R., 2010. Effectiveness of antioxidants in preventing oxidation of palm oil enriched with heme iron: A model for iron fortification in baked products. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 761–769. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900220>.

AOAC International, 2019. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 21th ed. AOAC International, Rockville, MD.

Bou, R., Guardiola, F., Tres, A., Barroeta, A.C., Codony, R., 2004. Effect of dietary fish oil, α -tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poultry Science* 83, 282–292. <https://doi.org/10.1093/ps/83.2.282>.

Varona, E., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Barroeta, A.C., Guardiola, F., 2021. Methods to determine the quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding. *MethodsX* 8, 101334. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101334>

Verge-Mèrida, G., Barroeta, A.C., Guardiola, F., Verdú, M., Balart, M., Font-i-Furnols, M., Solà-Oriol, D., 2021. Crude and acid oils from olive pomace as alternative fat sources in growing-finishing pigs. *Animal* 15, 100389. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100389>.

Anexo III

-Información suplementaria de la publicación científica: Efecto de la alimentación con aceite ácido de orujo de oliva sobre la composición lipídica, la estabilidad oxidativa, el color y la aceptación sensorial de la carne de pollo-

-Effect of feeding olive pomace acid oil on dark chicken meat lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance. – Supplementary Material

Paula Albendea, Francesc Guardiola, Magdalena Rafecas, Stefania Vichi, Ana C. Barroeta, Marçal Verdú and Alba Tres. *Animals*, 2023, 13, 1343. <https://doi.org/10.3390/ani13081343>

Method for the determination of fatty acid composition of experimental diets

Lipids were extracted in duplicate from 2 g of feed by using diethyl ether according to the Soxtec extraction method 2003.05 of AOAC International [1]. After extraction, the total evaporation of the solvent was avoided to prevent oxidation and more diethyl ether was added to transfer the lipid extract from Soxtec vessels to two glass test tubes with screw cap (approximately half of the lipid extract to each tube). Diethyl ether was completely evaporated from tubes under N₂ stream at 30°C in a block heater and the lipid extract was stored at -20°C until the analyses. One tube was used for the determination of the fatty acid (FA) composition and the other to analyze the lipid class composition, as described below. For FA determination, the lipid extract was submitted to a double methylation in methanolic medium and FA methyl esters (FAMES) were determined by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) [2]. Each compound was identified by comparing its retention time with that of standards (Supelco 37 component FAME Mix, Supelco®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and the percentage of each FA was obtained by peak area normalization.

Method for the determination of tocopherol and tocotrienol content of experimental diets

The tocopherol and tocotrienol was determined in duplicate as described by Bou et al. [3]. Briefly, 1.5 g of feed was homogenized with a mixture of antioxidants in ethanol using a high-speed homogenizer (PT 3100 Polytron, Kinematica, Lucerne, Switzerland) for 30 s at 20,000 rpm and saponified with methanolic KOH. After saponification, the non-saponifiable fraction was extracted with petroleum ether and filtered through a 0.45- μ m Teflon membrane. After complete evaporation of the petroleum ether under a nitrogen stream at 30°C in a block heater, the residue was redissolved in an exact volume of 99% n-hexane and injected into the high-performance liquid chromatograph (HPLC) system. HPLC was performed as explained by Aleman et al. [4](Aleman et al., 2010) and a 1260 Infinity II Fluorescence Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used with the excitation and emission wavelengths settled to 290 and 320 nm, respectively. Calibration curves were prepared for each tocopherol, using a set of standards (α -, β -, γ - and δ -tocopherol) from Calbiochem® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Each tocotrienol (α -, β -, γ - and δ -tocotrienol) was quantified using the corresponding tocopherol calibration curve.

Method for the determination of lipid class composition of experimental diets

The lipid extraction of the feeds by the Soxtec method was performed as described above in duplicate. The lipid extract was dissolved in 2 mL of tetrahydrofuran (HPLC grade from Scharlau, Sentmenat, Spain) and a 1:2 dilution was made to obtain a lipid concentration of \approx 15 mg/mL. Then, the percentages of triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols and free fatty acids were determined by size molecular exclusion chromatography as described by Varona et al. [2] and quantified by peak area normalization.

Method for the determination of fatty acid composition of dark chicken meat

The fatty acid composition of fresh dark chicken meat was analyzed in duplicate by GC-FID after extracting the lipid fraction of 1g of sample with chloroform/methanol (2:1, v/v) mixture. To perform the extraction, first, 20mL of this solvent mixture was added to the sample and homogenized using a PT 3100 Polytron at 19,000 rpm for 20 s and filtered through Whatman No. 1 filter paper. The sample residue retained in the filter was reextracted twice with 10

mL of the same solvent mixture at 19,000 rpm for 20 s. Next steps of lipid extraction were carried out as described by Bou et al. [3]. Then, FAMES were obtained from the extracted lipid fraction by a double methylation procedure and determined by GC-FID [2]. Each compound was identified by comparing its retention time with that of standards (Supelco 37 component FAME Mix, Supelco®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization.

Method for the determination of tocopherol and tocotrienol content of dark chicken meat

For the determination of the tocopherol and tocotrienol content in fresh and refrigerated chicken meat, 2 g of sample was homogenized with a mixture of antioxidants in ethanol using a PT 3100 Polytron for 30 s at 20,000 rpm and saponified with methanolic KOH as described by Bou et al. [3]. The nonsaponifiable fraction was extracted with petroleum ether and filtered through a 0.45- μ m Teflon membrane. The solvent was completely evaporated under a nitrogen stream at 30°C in a block heater and the residue was redissolved in an exact volume of 99% n-hexane and injected into the HPLC system. HPLC separation was carried out as described by Aleman et al. [4](Aleman et al., 2010) and tocopherols and tocotrienols were detected using a 1260 Infinity II Fluorescence Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), setting the excitation and emission wavelengths at 290 and 320nm, respectively. Calibration curves were prepared for each tocopherol, using a set of standards (α -, β -, γ - and δ -tocopherol) from Calbiochem® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Each tocotrienol (α -, β -, γ - and δ -tocotrienol) was quantified using the corresponding tocopherol calibration curve.

Ferrous oxidation-Xylenol orange assay

Ferrous oxidation-Xylenol orange method was applied to each sample per triplicate to evaluate the primary oxidation and the oxidative stability of fresh and refrigerated dark chicken meat samples, as detailed by Grau et al. [5]. Briefly, 15 mL of cold methanol was added to 2 g of sample, and a PT 3100 Polytron was used for sample homogenization at 12,000 rpm for 30 s. Then, the mixture was centrifuged (1,400 g, 3 min), and the supernatant methanol extract was collected. The reaction mixture was prepared in glass cuvettes, capped with Teflon caps. The reagents were added as described by Tres et al. [6], using 940 μ L of methanol and 160 μ L of sample extract for fresh samples, and with 950 μ L of methanol and 150 μ L of sample extract for refrigerated

samples. The absorbance at 560nm was measured using a UV-3600 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) after incubation for 30 min (as a measure of the lipid hydroperoxides present in the samples from the beginning, named lipid hydroperoxide content) and for 96h (as a measure of the amount of lipid hydroperoxides formed during this time, which is considered a measure of the oxidative stability of the samples, named final lipid hydroperoxide value). Lipid hydroperoxide concentration was expressed as mmol of cumene hydroperoxide equivalents/kg of sample, with reference to a calibration curve prepared using cumene hydroperoxide as standard (technical grade, 80%, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Method for the determination of 2-thiobarbituric acid value of dark chicken meat

The 2-thiobarbituric acid value was determined in duplicate to evaluate the secondary oxidation of fresh and refrigerated chicken meat, applying the method described by Grau et al. [7] on 1.5 g of sample. Briefly, the 2-thiobarbituric acid value was measured through third derivative spectrophotometry after an acid aqueous extraction. The results were expressed as malondialdehyde concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$), using a calibration curve prepared as described by Botsoglou et al. [8] with 1,1,3,3-tetraethoxypropane (96%, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) as MDA precursor.

Method for the determination of volatile compound content of dark chicken meat

The volatile compound content was determined in fresh and refrigerated chicken meat by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) as described by Albendea et al. [9]. To perform the analysis, 1 g of sample was weighed into a 10mL screw-capped vial, and 0.5mL of a 4mg/L aqueous solution of 4-methyl-2-pentanol (97%, Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added as internal standard. Subsequently, 0.5mL of an aqueous antioxidant solution with 4% of EDTA and 0.4% of propyl gallate (both from Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 2mL of double deionized water, and three glass balls were added. The vial was immediately closed and kept in ice until all sample set was prepared. Then, the mixture was homogenized using an ultrasound bath at 4°C for 10min. Samples were kept in ice at the dark until the HS-SPME-GC-MS determination was carried out. The instrument consisted of an Agilent 6890N Network GC system with an Agilent 5975C Inert MSD

quadrupole mass spectrometer (both from Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA) and a PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) configured to perform SPME. After 10 min of sample conditioning at the extraction temperature (45°C), the fiber of divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (2 cm length, 50/30 thickness) from Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was exposed to the head space for 30 min and desorbed in the injector at 260°C for 10 min. To perform the separation of the different volatile compounds, a Supelcowax-10 capillary column (30m × 0.25mm i.d., 0.25 µm film thickness) from Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used. The oven temperature program began at 40°C (held 10 min, during fiber desorption time), 3°C/min up to 150°C, and 15°C/min up to 250°C (held for 5 min). Helium was used as gas carrier with a constant flow of 1mL/min. The temperatures of the ion source and the transfer line were 230 and 280°C, respectively, and the ionization energy was 70 eV. Data were acquired in full scan mode in selected representative samples for the identification of compounds, which was carried out by comparison of their mass spectra and retention times with those of standard compounds or with those available in mass spectrum library Wiley 6 and in the literature. Then, the quantitative assessment of all samples was carried by selected ion mode, considering m/z 44, 45, 55, 56, 57, 81, and 98, which were representative for the compounds of interest. Data were then analyzed by an Agilent MSD ChemStation. Relative amounts of volatile compounds were calculated by the internal standard method, expressing the results as µg of 4-methyl-2-pentanol equivalents/kg of sample.

Table S2. Complete fatty acid profile (%) of the experimental fat sources.

FAs	PO¹	ROPO¹	OPAO¹
C14:0	1.0 ± 0.01	ND	0.1 ± 0.01
C16:0	42.5 ± 0.05	12.7 ± 0.01	12.4 ± 0.14
C18:0	4.5 ± 0.01	2.7 ± 0.01	2.7 ± 0.89
C20:0	0.4 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.01
C22:0	ND	0.3 ± 0.01	0.5 ± 0.01
C24:0	ND	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.01
SFAs	48.5 ± 0.03	16.2 ± 0.01	16.6 ± 0.74
C16:1 n-7	0.2 ± 0.01	0.9 ± 0.01	1.0 ± 0.01
C18:1 n-9	40.6 ± 0.05	70.0 ± 0.01	63.2 ± 0.61
C18:1 n-7	0.6 ± 0.01	1.6 ± 0.01	1.7 ± 0.01
C20:1 n-9	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.01
MUFAs	41.6 ± 0.05	72.9 ± 0.02	66.2 ± 0.63
C18:2 n-6	9.5 ± 0.01	10.1 ± 0.02	15.8 ± 0.12
C18:3 n-3	0.3 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.9 ± 0.01
PUFAs	9.8 ± 0.01	10.8 ± 0.02	16.7 ± 0.13
<i>trans</i> -C18:1	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.01

Abbreviations: PO, palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; FAs, fatty acids; SFAs, saturated fatty acids (sum of C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 and C24:0); MUFAs, monounsaturated fatty acids (sum of C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7 and C20:1 n-9); PUFAs, polyunsaturated fatty acids (sum of C18:2 n-6 and C18:3 n-3); *trans*-C18:1 isomers (sum of positional isomers); ND, not detected. ¹Data were expressed as mean ± standard deviation of three determinations. The percentage of each FA was obtained by peak area normalization.

Table S3. Complete fatty acid profile (%) of the experimental diets.

FAs	Grower diets			Finisher diets		
	PO ¹	ROPO ¹	OPAO ¹	PO ¹	ROPO ¹	OPAO ¹
C12:0	0.5 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	ND	0.1 ± 0.01
C14:0	0.8 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.8 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.3 ± 0.01
C16:0	31.7 ± 0.04	13.0 ± 0.04	14.9 ± 0.02	32.6 ± 0.20	13.6 ± 0.01	16.5 ± 0.65
C18:0	3.8 ± 0.01	2.7 ± 0.01	3.2 ± 0.01	3.8 ± 0.07	2.9 ± 0.01	3.2 ± 0.07
C20:0	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.01
C22:0	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.02
C24:0	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.03
SFAs	37.6 ± 0.05	16.9 ± 0.05	19.7 ± 0.02	38.3 ± 0.12	17.6 ± 0.01	21.2 ± 0.81
C16:1 n-7	0.2 ± 0.01	0.6 ± 0.01	0.6 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.6 ± 0.02
C18:1 n-9	35.5 ± 0.04	54.7 ± 0.08	46.7 ± 0.11	35.9 ± 0.33	55.0 ± 0.01	47.8 ± 1.41
C18:1 n-7	1.1 ± 0.01	1.9 ± 0.03	1.7 ± 0.06	1.1 ± 0.02	1.8 ± 0.11	1.6 ± 0.08
C20:1 n-9	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01
MUFAs	36.9 ± 0.05	57.5 ± 0.04	49.3 ± 0.05	37.3 ± 0.32	57.3 ± 0.11	50.2 ± 1.51
C18:2 n-6	24.6 ± 0.02	24.4 ± 0.06	29.6 ± 0.03	23.6 ± 0.19	24.0 ± 0.10	27.3 ± 0.69
C18:3 n-3	0.9 ± 0.02	1.1 ± 0.02	1.3 ± 0.01	0.8 ± 0.01	1.0 ± 0.01	1.1 ± 0.01
PUFAs	25.5 ± 0.01	25.5 ± 0.09	30.8 ± 0.01	24.4 ± 0.20	25.0 ± 0.11	28.4 ± 0.70
trans-C18:1 ND		0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02	ND	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01

Abbreviations: PO, palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; FAs, fatty acids; SFAs, saturated fatty acids (sum of C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 and C24:0); MUFAs, monounsaturated fatty acids (sum of C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7 and C20:1 n-9); PUFAs, polyunsaturated fatty acids (sum of C18:2 n-6 and C18:3 n-3); *trans*-C18:1 isomers (sum of positional isomers); ND, not detected. ¹ Data were expressed as mean ± standard deviation of two determinations. The percentage of each FA was obtained by peak area normalization.

Table S4. Complete fatty acid profile (%) of fresh dark chicken meat with skin coming from the three experimental diets.

FAs	PO¹	ROPO¹	OPAO¹	SEM²	p²
C12:0	0.16 ^a	0.07 ^b	0.08 ^b	0.006	<0.001
C14:0	0.71 ^a	0.44 ^b	0.48 ^b	0.014	<0.001
C15:0	0.10 ^a	0.09 ^b	0.09 ^{ab}	0.002	0.006
C16:0	26.02 ^a	20.72 ^b	21.42 ^b	0.243	<0.001
C17:0	0.15 ^b	0.16 ^a	0.17 ^a	0.003	<0.001
C18:0	5.56	5.31	5.47	0.110	0.273
SFAs	32.70 ^a	26.78 ^b	27.73 ^b	0.311	<0.001
C14:1	0.12 ^a	0.08 ^b	0.10 ^{ab}	0.007	0.004
C16:1 n-9	0.44 ^a	0.54 ^b	0.53 ^b	0.014	<0.001
C16:1 n-7	3.78	3.41	3.50	0.120	0.097
C18:1 n-9	39.05 ^b	44.79 ^a	42.61 ^a	0.592	<0.001
C18:1 n-7	2.01 ^b	2.41 ^a	2.30 ^a	0.041	<0.001
C20:1 n-9	0.29 ^b	0.33 ^a	0.31 ^{ab}	0.007	0.001
MUFAs	45.69 ^b	51.56 ^a	49.35 ^a	0.640	<0.001
C18:2 n-6	19.14	18.96	20.13	0.332	0.046
C18:3 n-6	0.26 ^b	0.28 ^a	0.28 ^a	0.005	0.008
C20:2 n-6	0.16	0.16	0.17	0.007	0.550
C20:3 n-6	0.19	0.19	0.21	0.005	0.181
C20:4 n-6	0.71	0.71	0.78	0.027	0.170
n-6 PUFAs	20.51	20.36	21.61	0.364	0.048
C18:3 n3	0.93 ^c	1.02 ^b	1.07 ^a	0.013	<0.001
C20:5 n3	0.03	0.03	0.03	0.002	0.880
C22:6 n3	0.04	0.05	0.05	0.002	0.316
n-3 PUFAs	0.96 ^b	1.05 ^a	1.10 ^a	0.014	<0.001
Total PUFAs	21.47	21.40	22.71	0.377	0.039
trans-C18:1	0.14 ^b	0.25 ^a	0.22 ^{ab}	0.023	0.007

Abbreviations: PO, palm oil; ROPO, refined olive pomace oil; OPAO, olive pomace acid oil; FAs, fatty acids; SFAs, saturated fatty acids (sum of C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 and C18:0); MUFAs, monounsaturated fatty acids (sum of C14:1, C16:1 n-9, C16:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7 and C20:1 n-9); PUFAs, polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFAs: sum of C18:2 n-6, C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6 and C20:4 n-6; n-3 PUFAs: sum of C18:3 n-3, C20:5 n-3 and C22:6 n-3; Total PUFAs: sum of n-3 PUFAs and n-6 PUFAs); trans-C18:1 isomers (sum of positional isomers); SEM, standard error of the mean. ¹ Least-squares means of the different experimental units from each dietary treatment (n = 8). The percentage of each FA was obtained by peak area normalization. ² p values obtained by ANOVA (n = 24). Values in bold were significant (p < 0.05). Differences between diets found with Scheffé's post hoc test were noted in the same row as a > b > c. For C18:2 n-6, n-6 PUFAs and total PUFAs, Scheffé's post hoc test could not differentiate the least-squares means of the dietary treatments.

References

1. AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; 21th ed.; AOAC International: Rockville, MD, USA, **2019**; pp. 41-43.
2. Varona, E.; Tres, A.; Rafecas, M.; Vichi, S.; Barroeta, A.C.; Guardiola, F. Methods to determine the quality of acid oils and fatty acid distillates used in animal feeding. *MethodsX*. **2021**, 8, 101334, doi:10.1016/j.mex.2021.101334.
3. Bou, R.; Guardiola, F.; Tres, A.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Effect of dietary fish oil, α -tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult. Sci.* **2004**, 83, 282–292, doi:10.1093/ps/83.2.282.
4. Aleman, M.; Nuchi, C.D.; Bou, R.; Tres, A.; Polo, J.; Guardiola, F.; Codony, R. Effectiveness of antioxidants in preventing oxidation of palm oil enriched with heme iron: A model for iron fortification in baked products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, 112, 761–769, doi:10.1002/ejlt.200900220.
5. Grau, A.; Codony, R.; Rafecas, M.; Barroeta, A.G.; Guardiola, F. Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xylene orange method. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 4136–4143, doi:10.1021/jf991054z.
6. Tres, A.; Nuchi, C.D.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Assessing rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through the ferrous oxidation-xylene orange method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, 111, 563–573, doi:10.1002/ejlt.200800230.
7. Grau, A.; Guardiola, F.; Boatella, J.; Barroeta, A.; Codony, R. Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: Influence of various parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1155–1159, doi:10.1021/jf990518q.
8. Botsoglou, N.A.; Fletouris, D.J.; Papageorgiou, G.E.; Vassilopoulos, V.N.; Mantis, A.J.; Trakatellis, A.G. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1931–1937, doi:10.1021/jf00045a019.
9. Albendea, P.; Tres, A.; Rafecas, M.; Vichi, S.; Sala, R.; Guardiola, F. Effect of feeding acid oils on European seabass fillet lipid composition, oxidative stability, color, and sensory acceptance. *Aquac. Nutr.* **2023**, 2023, 6415693, doi:10.1155/2023/6415693.

Anexo IV

-Ejemplo de optimización del método del naranja de xilenol: Optimización del método del naranja de xilenol para la determinación de la estabilidad oxidativa en los filetes de lubina frescos y refrigerados-

De manera previa a la aplicación del método del naranja de xilenol (FOX, *Ferrous oxidation-Xylenol orange method*) a cada tipo de muestra, es necesario realizar pruebas para obtener el volumen de extracto óptimo y el tiempo al que la concentración de hidroperóxidos lipídicos (LHP, *Lipid hydroperoxide*) es estable para determinar el valor final de LHP como medida de la estabilidad oxidativa de la muestra.

Primera prueba de optimización del método de FOX en filete de lubina

En esta prueba se emplearon una muestra fresca y otra refrigerada de filete de lubina procedente de la dieta con un 100% de aceite de pescado (FO, *Fish oil*), denominadas como FO-F y FO-R. Cada muestra se trabajó por duplicado, obteniendo dos extractos metanólicos diferentes por muestra, nombrados como FO-F1 y FO-F2 en el caso de la muestra fresca y FO-R1 y FO-R2 en el de la muestra refrigerada. La reacción colorimétrica de estas cuatro réplicas se realizó con cuatro volúmenes de extracto metanólico diferentes (50 μL , 100 μL , 150 μL y 200 μL), empleando duplicados en cada caso, diferenciados por las letras A y B. Los resultados obtenidos en esta primera prueba se muestran en la Figura 9.1. En el caso del volumen de 50 μL uno de los duplicados de seguimiento de la reacción colorimétrica de la réplica FO-R2 mostró un comportamiento diferente al resto, por lo que no se tuvo en consideración. En las gráficas se puede observar que la absorbancia obtenida con 50 μL de extracto de muestra era un poco baja para obtener una sensibilidad óptima que permitiese ver diferencias significativas entre muestras con diferentes estabilidades oxidativas, mientras que el volumen de 100 μL de extracto de muestra ocasionaba ya una saturación de la señal en poco tiempo. En los diferentes volúmenes se observó un comportamiento similar de las muestras de filete fresco y refrigerado.

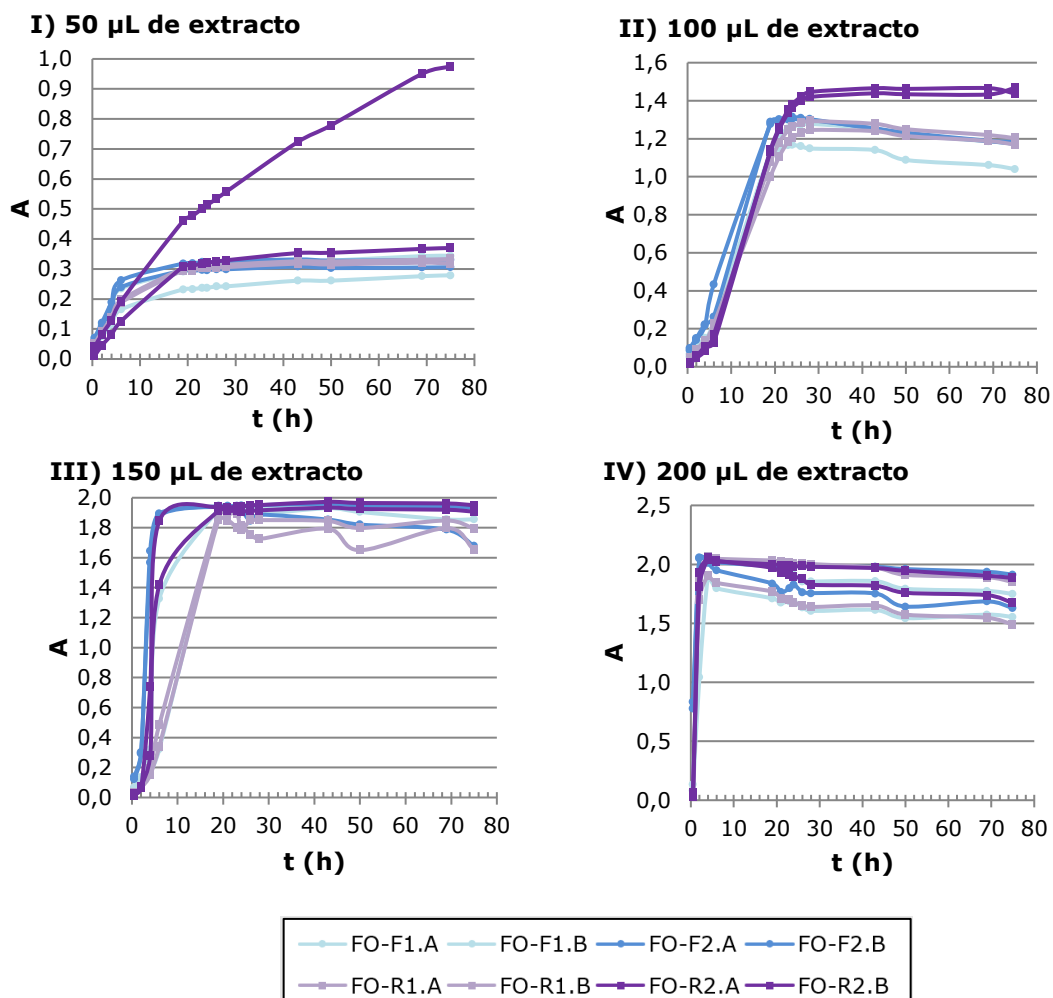


Figura 9.1 Resultados obtenidos para los cuatro volúmenes (50, 100, 150 y 200 µL) de extracto metanólico de muestra en la primera prueba de optimización del método naranja de xileno para aplicarlo a filete de lubina fresco y refrigerado. Se trabajó con una muestra de filete procedente de la dieta con 100% de aceite de pescado fresca (FO-F) y otra refrigerada (FO-R) por duplicado (FO-F1, FO-F2, FO-R1 y FO-R2, representados en colores distintos), realizando la reacción colorimétrica por duplicado para cada extracto (FO-F1.A, FO-F1.B, FO-F2.A, FO-F2.B, FO-R1.A, FO-R1.B, FO-R2.A y FO-R2.B).

Segunda prueba de optimización del método de FOX en filete de lubina

Teniendo en cuenta los resultados de la primera prueba de optimización, en la segunda se emplearon solo muestras de filete refrigerado y se evaluaron dos volúmenes diferentes (60 y 90 µL). Esta vez, además de muestras procedentes de la dieta FO, se utilizaron muestras procedentes de las dietas con el aceite ácido mezcla de soja y girasol (SAO, *Soybean-sunflower (55:45; w/w) acid oil*), con el aceite de orujo de oliva (OPO, *Crude olive pomace oil*) y con el aceite ácido de orujo de oliva (OPAO, *Olive pomace acid oil*), siguiendo

la misma sistemática que en la primera prueba: duplicados de extracto por muestra evaluada (nombrados siempre como R1 y R2) y dos cubetas por extracto para realizar la reacción colorimétrica (diferenciadas por las letras A y B). Los resultados obtenidos de esta segunda prueba se recogen en la Figura 9.2 y muestran que solo existían diferencias en la absorbancia entre los dos volúmenes en el caso de la muestra procedente de FO.

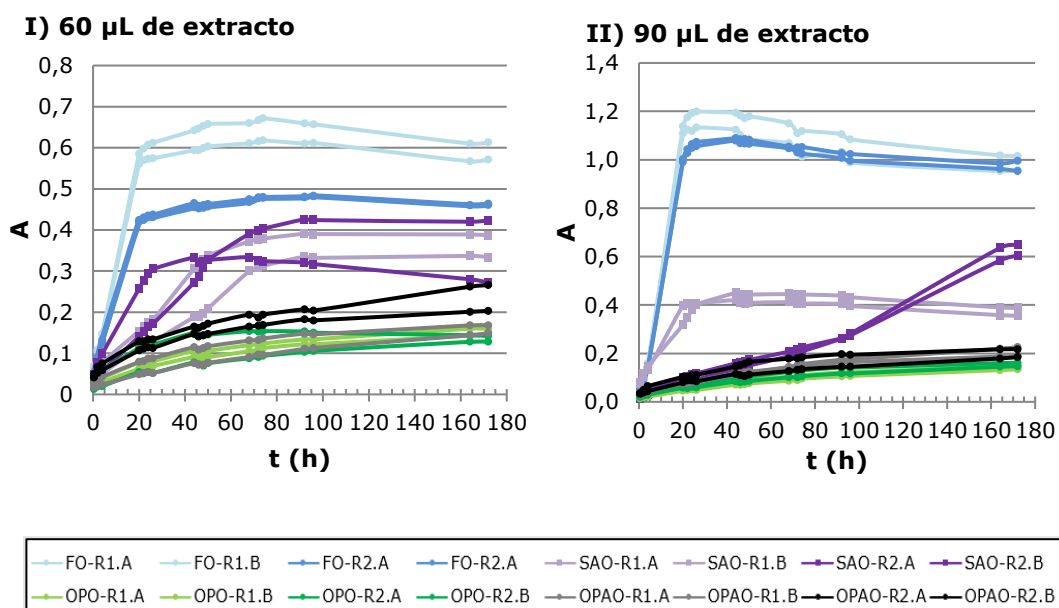


Figura 9.2 Resultados obtenidos para los cuatro volúmenes (50, 100, 150 y 200 μL) de extracto metanólico de muestra en la segunda prueba de optimización del método naranja de xilenol para aplicarlo a filete de lubina fresco y refrigerado. Se trabajó con muestras de filete refrigerado procedente de la dieta con 100% de aceite de pescado (FO-R), con aceite ácido mezcla de soja y girasol (SAO-R), con aceite crudo de orujo de oliva (OPO) y con el aceite ácido de orujo de oliva (OPAO-R) por duplicado (los duplicados de una misma muestra aparecen diferenciados por los números 1 y 2 y representados en colores distintos), realizando la reacción colorimétrica por duplicado para cada extracto (los duplicados de reacción de un mismo extracto se diferencian por las letras A y B).

Tercera prueba de optimización del método de FOX en filete de lubina

Para la última prueba de optimización se empleó un volumen de 70 μL de extracto para intentar obtener una absorbancia ligeramente más elevada que con los 60 μL de extracto y poder optimizar la sensibilidad del método. En este caso, se evaluó este único volumen (70 μL) de extracto empleando muestras frescas y refrigeradas procedentes de cada una de las dietas usadas (con 100% de FO, con aceite crudo de soja (SO, *Crude soybean oil*), SAO, OPO u OPAO). Se siguió la misma sistemática que en las pruebas anteriores, realizando por cada muestra duplicados de la extracción (diferenciados por los números 1 y

2) y, por cada extracto, duplicados de la reacción colorimétrica (diferenciados por las letras A y B). Los resultados obtenidos para las muestras frescas y refrigeradas están representados en las gráficas A y B, respectivamente, de la Figura 9.3 y muestran que con este volumen de extracto se logra una sensibilidad adecuada para poder discernir entre muestras con una diferente estabilidad oxidativa, tanto en filete de lubina fresco como refrigerado. En cuanto al tiempo de estabilización de la formación de LHP, en la Figura 9.3 se observa que a partir de las 96 horas la absorbancia se mantenía prácticamente estable en todos los tratamientos dietéticos, por lo que fue el tiempo de incubación establecido para la medida del valor final de LHP.

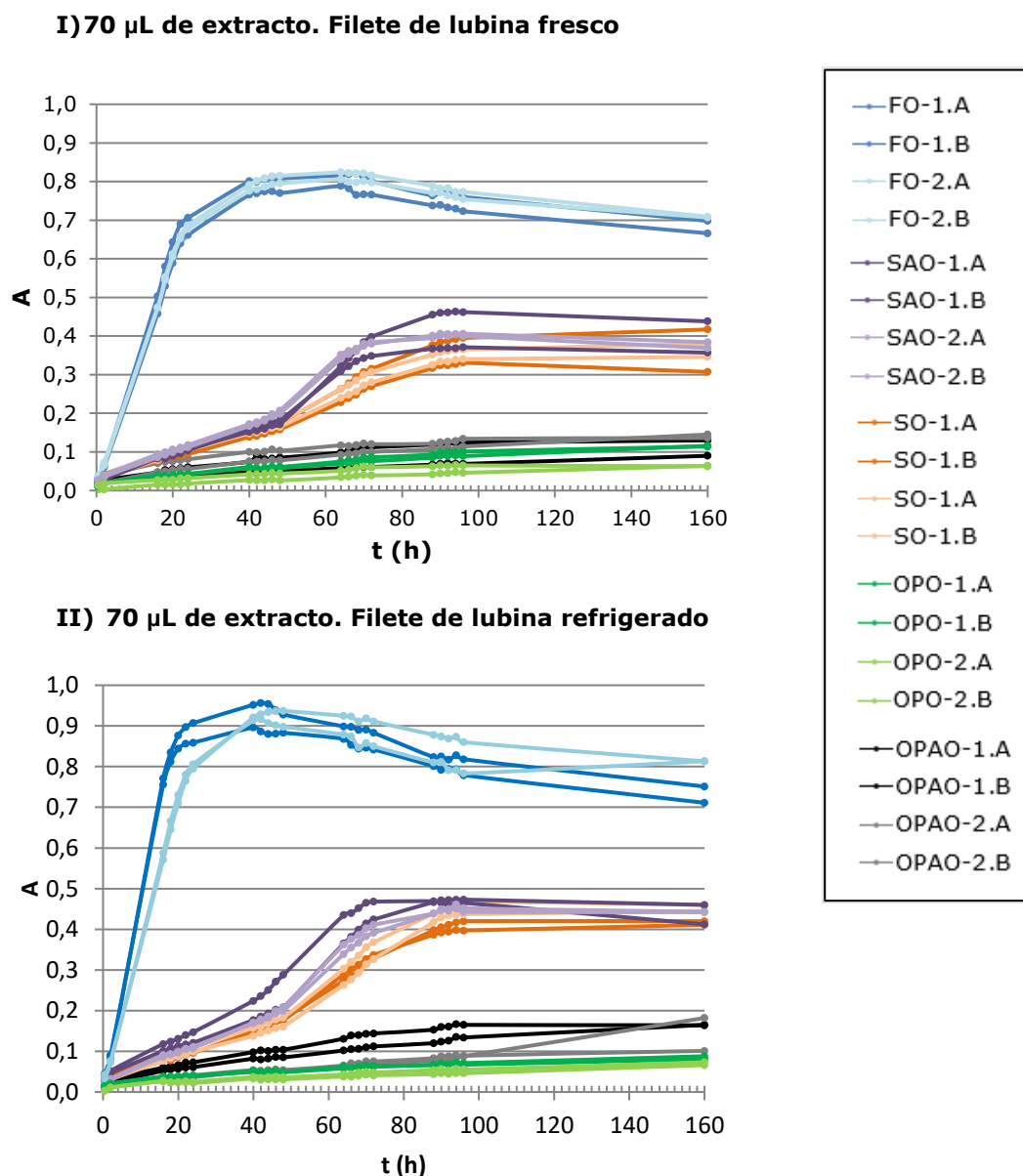


Figura 9.3 Resultados obtenidos con 70 μ L de extracto metanólico de muestra en la optimización del método naranja de xilenol para aplicarlo a filete de lubina fresco (I) y refrigerado (II). Se trabajó con muestras de filete fresco y refrigerado procedentes de las diferentes dietas: con 100% de aceite de pescado (FO), con aceite crudo de soja (SO), con aceite ácido mezcla de soja y girasol (SAO), con aceite crudo de orujo de oliva (OPO) y con el aceite ácido de orujo de oliva (OPAO) por duplicado (los duplicados de una misma muestra aparecen diferenciados por los números 1 y 2 y representados en colores distintos), realizando la reacción colorimétrica por duplicado para cada extracto (los duplicados de reacción de un mismo extracto se diferencian por las letras A y B).

Anexo V

-Ejemplo de formulario de conformidad empleado en los análisis de aceptación sensorial-

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN ANÁLISIS SENSORIAL DE CARNE DE POLLO

INVITACIÓN PARA PARTICIPAR

Está usted invitado a participar en un análisis sensorial que se llevará a cabo en el Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona. En concreto, la localización en la que se llevará a cabo el análisis será el Campus de la Alimentación de Torribera (Santa Coloma de Gramenet, Barcelona).

BASES PARA LA SELECCIÓN DE PARTICIPANTES

Usted recibe esta invitación puesto que cumple con los criterios demográficos requeridos para realizar este estudio. Firmando el presente formulario de consentimiento, será seleccionado para participar en este análisis sensorial. Cualquier persona puede participar en este estudio siempre y cuando tengan 18 años o más, siempre y cuando se cumplan los siguientes requisitos:

- Consumir con cierta regularidad carne de pollo.
- Abstenerse tanto de fumar como de tomar café durante, como mínimo, la hora antes de la fijada para la realización del análisis.
- No haber consumido otros alimentos durante, como mínimo, las dos horas previas a la cata.
- No utilizar perfumes, jabones u otros cosméticos con olores persistentes que puedan alterar la percepción de las características organolépticas de las muestras a evaluar.

Además, si se encuentra en condiciones de inferioridad fisiológica, particularmente si existe una afectación del sentido olfativo o gustativo o nota algún efecto que le impide concentrarse en la realización del análisis, deberá comunicarlo inmediatamente para que se tomen las decisiones oportunas de cara a evitar una posible desviación de los resultados obtenidos por el resto de los participantes.

PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO

El objetivo de este análisis es evaluar la aceptabilidad por parte del consumidor de la carne de pollo proveniente de animales producidos según las prácticas comerciales habituales. Los pollos empleados en este estudio han sido alimentados con dietas enriquecidas en diferentes tipos de materias grasas que cumplen las características necesarias para su uso en el campo de la alimentación animal.

EXPLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Las diferentes muestras se dispondrán en platos con códigos identificativos y, cada catador, poseerá una hoja para evaluar cada una de las muestras. Es importante que el catador pruebe las muestras por primera vez en el orden indicado, siendo posible volver a probar las distintas muestras en el orden que el participante desee. El método de evaluación a seguir consiste en calificar las distintas muestras con un número del 1 al 9 en función de las preferencias del catador, siendo 1 la calificación que denotaría peores características sensoriales y 9 la asignada para las mejores características. Siempre que el catador considere que dos muestras poseen características similares, es posible asignar una misma calificación a varias muestras. Además del espacio existente en la hoja de evaluación para asignar las calificaciones, existen otros apartados a rellenar de manera optativa que permiten al participante realizar comentarios sobre la textura, el sabor o el aspecto de las muestras.

RIESGOS POTENCIALES Y DISCONFORMIDADES

No existen otros riesgos más allá de los habituales asociados a la ingesta de productos cárnicos comerciales. Las muestras serán preparadas bajo condiciones sanitarias.

GARANTÍA DE CONFIDENCIALIDAD

Cualquier información aportada en este proyecto y que pudiese identificarse con usted será tratada de manera completamente confidencial. Los resultados finales y los datos estadísticos podrán ser publicados en revistas de carácter científico o presentados en eventos científicos, pero en todo momento se mantendrán los resultados individuales y la información aportada por los catadores en estricta confidencialidad.

USTED DE MANERA VOLUNTARIA TOMA LA DECISIÓN DE PARTICIPAR EN EL PRESENTE ESTUDIO. SU FIRMA CERTIFICA QUE HA TOMADO ESTA DECISIÓN TRAS LEER LA INFORMACIÓN RECOGIDA EN EL PRESENTE DOCUMENTO. SU FIRMA ADEMÁS CERTIFICA QUE HA TENIDO LA OPORTUNIDAD DE PLANTEAR CUALQUIER DUDA SOBRE ESTE ESTUDIO AL INVESTIGADOR Y QUE DICHAS DUDAS HAN SIDO RESUELTAS DE MANERA SATISFACTORIA.

NOMBRE:

DNI/NIE/PASAPORTE:

FIRMA

FECHA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA