



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

**GELIFICACIÓN DE PRODUCTOS AVÍCOLAS POR  
ALTA PRESIÓN ISOSTÁTICA: ACTIVIDAD SINÉRGICA DE  
LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA**

Memoria presentada para optar al grado de

Doctora en Ciencia de los Alimentos

**María del Pilar Trespalacios Sosa**

Bellaterra, 2007



María Teresa de los Reyes Pla Soler, Profesora Titular de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona,

HACE CONSTAR: Que la Licenciada en Química Farmacobiológica María del Pilar Trespacios Sosa ha realizado, bajo su dirección, el trabajo titulado “Gelificación de productos avícolas por alta presión isostática: actividad sinérgica de la transglutaminasa microbiana” que presenta para optar al grado de Doctora en Ciencias de los Alimentos.

Y para que así conste, firma el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), el 30 de mayo de 2007.

María Teresa de los Reyes Pla Soler

Esta tesis doctoral fue financiada por el  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT)  
y por el  
Plan Nacional de Investigación, Desarrollo e Innovación  
2000-2003 (AGL 2000-0357)

*Lo he comprendido al fin:  
oigo un canto, veo una flor,  
oh, que jamás se marchiten!*

*Netzahualcóyotl*

*A Joan*

*A mis hijos*

### *iii Mil gracias !!!*

*A mi directora de tesis, Dra. Reyes Pla Soler, por permitirme participar en su proyecto de investigación, por su dedicación, su apoyo, y por aceptar mis horarios y calendarios.*

*Al director del CERPTA, Dr. Buenaventura Guamis, por su gentileza, caballerosidad y por permitirme realizar mis investigaciones en este centro.*

*A los coordinadores del doctorado, Drs. Antonio Trujillo y Manuela Hernández por su motivación, apoyo y comprensión.*

*Al equipo de investigadores y profesores del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, especialmente a los Drs. Montserrat Mor-Mur, Marta Capellas, Josep Yuste, Jordi Saldo, Victoria Ferragut, Artur Roig, Santiago Mínguez, José Juan Rodríguez, María Teresa Mora y Jesús Piedrafita por compartir conmigo sus conocimientos. A los Drs. Jordi Pagán y Alberto Ibarz de la Universidad de Lleida por su participación en experimentos que forman parte de los conocimientos adquiridos durante el doctorado.*

*A Patty, Silvia, Sonia, Virginie, Joan Miquel, Víctor y Ángel por su apoyo en el laboratorio y en la planta piloto. Al personal administrativo del departamento, especialmente a Julia, Laura y Consuelo.*

*A Melissa Edwards, por su colaboración en la revisión de los manuscritos en inglés.*

*A todos y cada uno de mis compañeros y compañeras de los cursos, del laboratorio y de la planta piloto, de quienes he recibido ayuda, palabras de aliento y siempre, una sonrisa amable. Ahora forman parte de mi mundo.*

*A mis padres y a mi familia en México y en España, que recuerdan mis raíces y guían mi futuro.*

*A mis hijos Adolfo Ernesto, Jorge Alfredo, Hugo Luis y Melissa, por impulsarme a realizar este proyecto y a Anna, Helena, Eduardo y Núria, por permitirme formar parte de sus vidas. A mis nietos.*

*A mis hermanas, Lilia, Rocío y Amalia, espejos de mí misma. A Renato y Camila. A mis tíos, primos y sobrinos, especialmente a mi tía Josefina.*

*A mis hermanos Martha, Toño, Mayo, Juanita, José Manuel, Tere, Blanca Elena y sus familias.*

*A mis amigas y amigos que se encuentran en todo el mundo, pero que viven en mi corazón, especialmente a Aidé, Coco, Estela, Juanita, Lilia y Yolanda y aquellos que me han apoyado siempre.*

*A Joan, por compartir conmigo esta experiencia, por sus sabios consejos y su paciencia infinita.*

---

---

## ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>1</b>
A.	PRESENTACIÓN DEL PROYECTO .....	3
B.	JUSTIFICACIÓN.....	4
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
A.	ACTITUD DE LOS CONSUMIDORES .....	9
B.	CARNE DE POLLO .....	10
1.	<i>Antecedentes</i> .....	10
2.	<i>Producción y consumo</i> .....	10
3.	<i>Valor nutricional y composición química</i> .....	13
4.	<i>Productos cárnicos de pollo</i> .....	16
5.	<i>Pastas de carne</i> .....	17
C.	HUEVO Y OVOPRODUCTOS.....	19
1.	<i>Generalidades</i> .....	19
2.	<i>Producción y consumo</i> .....	20
3.	<i>Valor nutricional y composición química</i> .....	22
4.	<i>Propiedades funcionales</i> .....	25
D.	ALTA PRESIÓN ISOSTÁTICA .....	28
1.	<i>Antecedentes</i> .....	28
2.	<i>Principios básicos</i> .....	28
3.	<i>Efecto sobre los enlaces químicos</i> .....	29
4.	<i>Efecto sobre los sistemas biológicos</i> .....	31
5.	<i>Efecto sobre la carne</i> .....	38
6.	<i>Efecto sobre los ovoproductos</i> .....	42
7.	<i>Aplicaciones</i> .....	43
8.	<i>Equipos</i> .....	46
9.	<i>Regulación</i> .....	48
E.	TRANSGLUTAMINASA.....	49
1.	<i>Antecedentes</i> .....	49
2.	<i>Clasificación</i> .....	51
3.	<i>Estructura de la MTGasa</i> .....	52
4.	<i>Características</i> .....	53

5.	<i>Biodisponibilidad</i> .....	54
6.	<i>Alergenicidad</i> .....	55
7.	<i>Aplicaciones en el procesamiento de alimentos</i> .....	56
8.	<i>MTGasa y alta presión</i> .....	61
F.	<b>MECANISMOS DE GELIFICACIÓN</b> .....	65
1.	<i>Gelificación inducida por calor</i> .....	66
2.	<i>Gelificación inducida por alta presión</i> .....	72
3.	<i>Gelificación inducida por medios químicos</i> .....	77
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>81</b>
A.	<b>OBJETIVOS</b> .....	83
B.	<b>PLAN DE TRABAJO</b> .....	83
<b>IV.</b>	<b>ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>87</b>
1.	<i>Optimizing composition and processing conditions of pressure chicken and dried egg white gels using the response surface methodology</i> .....	89
2.	<i>Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels</i> .....	117
3.	<i>Synergistic action of of transglutaminase and high pressure on chicken meat and egg gels in absence of phosphates</i> .....	129
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>141</b>
1.	<i>Composición química y pH</i> .....	143
2.	<i>Pérdidas durante el procesamiento y capacidad de retención de agua</i> .....	143
3.	<i>Color</i> .....	145
4.	<i>Textura</i> .....	147
5.	<i>Microestructura</i> .....	150
6.	<i>Análisis térmico</i> .....	150
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>153</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>157</b>



---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN MUNDIAL Y DE LA PRODUCCIÓN TOTAL DE CARNE	11
TABLA 2. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE CARNE .....	12
TABLA 3. PREVISIONES DEL CONSUMO <i>PER CAPITA</i> ANUAL DE CARNE DE POLLO.....	13
TABLA 4. COMPOSICIÓN MEDIA DE CARNE DE POLLO, MÚSCULOS CLARO Y OSCURO.....	14
TABLA 5. PRINCIPALES PROTEÍNAS DE MÚSCULO MAGRO DE AVE .....	15
TABLA 6. EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN MUNDIAL DE HUEVOS DE 1990 A 2000.....	20
TABLA 7. PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE HUEVOS DE GALLINA EN 2005 .....	21
TABLA 8. COMPOSICIÓN DEL HUEVO ENTERO, YEMA, ALBUMEN Y ALBUMEN DESHIDRATADO .....	23
TABLA 9. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS FISIQUÍMICAS DE LAS PROTEÍNAS DEL ALBUMEN .....	24
TABLA 10. PROTEÍNAS DEL PLASMA Y DE LOS GRÁNULOS DE LA YEMA.....	25
TABLA 11. CAMBIOS DE VOLUMEN ASOCIADOS CON LA RUPTURA DE ENLACES QUÍMICOS ...	31
TABLA 12. CARACTERÍSTICAS DE LAS INTERACCIONES QUE ESTABILIZAN LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS .....	33
TABLA 13. PRODUCTOS COMERCIALIZADOS DE ORIGEN ANIMAL TRATADOS POR ALTA PRESIÓN .....	44
TABLA 14. PRODUCTOS COMERCIALIZADOS DE ORIGEN VEGETAL TRATADOS POR ALTA PRESIÓN .....	45
TABLA 15. COSTOS DE PRODUCCIÓN DE TRATAMIENTOS POR ALTA PRESIÓN.....	47
TABLA 16. PROVEEDORES DE EQUIPOS Y COMPONENTES DE ALTA PRESIÓN .....	48
TABLA 17. MASA MOLECULAR DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE TRANSGLUTAMINASA ...	50
TABLA 18. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE TRANSGLUTAMINASA COMBINADOS CON ALTA PRESIÓN .....	63

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES .....	15
FIGURA 2. EQUIPO INDUSTRIAL DE ALTA PRESIÓN .....	46
FIGURA 3. REACCIONES DE LA TRANSGLUTAMINASA .....	51
FIGURA 4. MODELO DE VAN DER WAALS DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA .....	53
FIGURA 5. ESQUEMA GENERAL DE LA GELIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	66
FIGURA 6. ESQUEMA DE LA GELIFICACIÓN TÉRMICA DE LAS PROTEÍNAS DEL ALBUMEN.....	70

---

---

## RESUMEN

La carne de pollo y los huevos constituyen excelentes materias primas para desarrollar nuevos alimentos de alto valor añadido. El objetivo principal de este trabajo fue el de aplicar los efectos de la alta presión isostática sobre las macromoléculas de estas materias primas para obtener un gel modelo, con alto contenido de proteínas, bajo en grasas, sal y fosfatos, que sirva como base para elaborar diversos alimentos. También, el de evaluar la aplicación de la alta presión y la transglutaminasa microbiana en las pastas cárnicas para mejorar las características fisicoquímicas de los geles. A la carne de pollo se le adicionó albumen como sustituto de grasa en diferentes proporciones (0 a 20%), yema de huevo (10%) y transglutaminasa (0.3%), se disminuyó el contenido de sal hasta 1% y se eliminaron los fosfatos. Las pastas cárnicas se sometieron a diferentes tratamientos: por calor a presión atmosférica (75 °C/30 min) y (20 y 40 °C/30 min), y por alta presión (400 a 500 MPa, a 40 y 60 °C/30 min) y (500, 700 y 900 MPa/40 °C/30 min). La adición de albumen (10%) a la carne de pollo repercutió favorablemente en las características de retención de agua y en las propiedades texturales de los geles obtenidos por calor y por alta presión y mostró un efecto protector frente al cambio de color de los geles. A presión atmosférica, la adición de 0.3% de transglutaminasa disminuyó notablemente las pérdidas de agua, mejoró la textura de los geles aún con un bajo contenido en NaCl (1.0%) y se obtuvo una microestructura más compacta originada por la formación de enlaces covalentes  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina. Se desarrolló actividad enzimática entre 500 y 700 MPa y se observó un efecto sinérgico de la aplicación simultánea de la transglutaminasa y de la alta presión en las características texturales y de retención de agua, cuyo incremento fue muy significativo en relación con el efecto de la enzima o de la presión aplicados en forma independiente. Se concluye que unas condiciones adecuadas para elaborar productos tipo salchicha libres de fosfatos y bajos en grasa y sal, son las siguientes: 700 MPa/40 °C/30 min con adición de 0.3% de transglutaminasa microbiana.



## **I. ANTECEDENTES**

## **A. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO**

El presente trabajo de tesis doctoral se llevó a cabo en el *Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA)*, vinculado a la *Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)*, que participa en proyectos de investigación sobre alta presión isostática aplicada a alimentos desde 1992. Forma parte del proyecto titulado: “Alta presión isostática aplicada a productos avícolas: Optimización de las propiedades funcionales mediante la formulación y el proceso” financiado por el Plan Nacional de Investigación, Desarrollo e Innovación 2000-2003 (AGL 2000-0357), con el objeto de rentabilizar materias primas de alto valor nutritivo y bajo precio como la carne de pollo y el huevo, para desarrollar geles y emulsiones mediante el uso de tratamientos de alta presión que sirvan como base para el desarrollo de nuevos productos microbiológicamente seguros, de alto valor nutritivo y óptimas características sensoriales. Para la realización de esta tesis doctoral, se contó con el apoyo de una beca proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT).

La línea de investigación sobre productos avícolas en el CERPTA se inició en 1992, con el proyecto titulado: “High hydrostatic pressure treatment; its impact on spoilage organisms, biopolymer activity, functionality and nutrient composition of food systems” (AIR-CT92-0296). Los resultados obtenidos mediante dos tesis doctorales demostraron que los tratamientos de alta presión aplicados a los productos avícolas destruyen de forma eficaz los microorganismos y que las propiedades físicas del huevo líquido tratado por alta presión no disminuyen su uso potencial, mientras que la apariencia de la carne de ave sí se modifica al ser sometida a este tratamiento.

Posteriormente, con el apoyo a grupos emergentes de la UAB en el proyecto: “*Desenvolupament de productes avícoles mitjançant alta pressió hidrostàtica*” en 1999 se inició el desarrollo de nuevos ovoproductos mediante la aplicación de altas presiones. Otras investigaciones orientadas a evaluar los parámetros físicos y químicos de los lípidos y el color de la carne de pollo y de la yema de huevo tratados por alta presión con el objeto de garantizar su

conservación y su calidad sanitaria, se desarrollaron mediante la financiación obtenida con el proyecto “Estudio de la fracción lipídica en productos avícolas tratados por alta presión isostática” (ALI98-0508-002-01), integrado en el Plan Nacional de Investigación y Desarrollo.

Los proyectos anteriores y los conocimientos aportados sirvieron como base inapreciable para el desarrollo de los estudios realizados en el presente trabajo.

## ***B. JUSTIFICACIÓN***

El incremento de la demanda de productos saludables y más nutritivos como consecuencia de consumidores cada día más informados y exigentes, contribuye a la necesidad continua de nuevos productos y a una variedad más diferenciada de los mismos (Linnemann, Meerdink, Meulenber y Jongen, 1998).

Uno de los retos actuales de la tecnología de los alimentos es el de generar productos con nuevas texturas y con características que se adecuen a las necesidades de los consumidores. Las proteínas son una de las principales clases de moléculas disponibles para conferir atributos texturales y uno de los más importantes mecanismos para desarrollar estructuras en los alimentos con propiedades mecánicas deseables es la agregación proteica en redes tridimensionales o geles (Dickinson, 1997).

Los productos avícolas son una buena fuente de proteínas de alta calidad y bajo precio. La carne de pollo es muy popular en todo el mundo debido a su aceptación por un amplio rango de grupos culturales y en las últimas décadas su popularidad se ha incrementado en muchos países. Sin embargo, es importante continuar en la línea establecida hace algunos años por la industria avícola de aumentar el valor añadido del pollo, mediante la presentación de productos elaborados que pueden ser precocinados o no y con bajo contenido en grasa (Castelló, 2002). El huevo, uno de los alimentos con mayor valor nutricional y excelentes características funcionales, puede combinarse con otras proteínas para obtener nuevos productos alimentarios.

Actualmente, existe una progresiva demanda de productos tipo gel con el objeto de cubrir las diferentes necesidades nutricionales y de diversas texturas y sabores que requieren determinados grupos de compradores (Matsumura y Mori, 1996). Tradicionalmente, la gelificación es inducida por aplicación de calor a la solución de proteína; sin embargo, los alimentos son raramente homogéneos y los tratamientos térmicos de las proteínas y otros nutrientes pueden inducir varias reacciones químicas tales como las de Maillard, las cuales pueden conducir a deterioro nutricional y sensorial en ciertos alimentos (Hayashi, Kawamura, Nakasa y Okinaka, 1989; Gerrard, 2002). Por lo tanto, hay un creciente interés en la industria hacia la aplicación de tecnologías no térmicas como la alta presión, que puedan prolongar la vida útil de los alimentos sin producir efectos perjudiciales, ya que no sólo proporciona alternativas a los métodos convencionales, sino que también ofrece oportunidades para crear nuevos ingredientes.

Muchos estudios han demostrado la utilidad de la presión para producir geles o pastas con propiedades únicas (Galazka, Dickinson y Ledward, 2000). La alta presión es una tecnología que puede usarse para obtener productos estables con mínimos efectos sobre el flavor, color y valor nutritivo o para crear nuevos sabores y texturas (Tewari, Jayas y Holley, 1999). Los procesos comerciales típicos aplican una presión entre 100 y 1 000 MPa mantenida durante tiempos que varían entre 10 y 30 min. Estas condiciones de proceso son suficientes para obtener cierta inactivación microbiana, pasteurización, extensión de la vida útil y la inducción de cambios moleculares en los alimentos (Galazka y Ledward, 1998). El uso de la alta presión como una alternativa al tratamiento térmico ha traído como consecuencia la necesidad de estudiar el comportamiento de los ingredientes macromoleculares de los alimentos, ya que el mecanismo de gelificación está aún lejos de ser comprendido. A pesar de que el efecto de esta tecnología sobre proteínas individuales continúa en investigación, el modo en que afecta las interacciones en sistemas mixtos ha sido estudiado por pocos investigadores (Galazka, Sumner y Ledward, 1996; Walkenstrom y Hermansson, 1997; Galazka, Smith, Ledward y Dickinson, 1999; Ngarize, Adams y Howell, 2005).

Por otro lado, la modificación proteica mediante enzimas es un método útil debido a la alta especificidad de este tipo de reacciones y, por lo tanto, al bajo riesgo de formar productos tóxicos. En el desarrollo de nuevos productos, las

enzimas que inducen la formación de enlaces covalentes, en particular la transglutaminasa, pueden jugar un papel muy importante en la mejora de la textura, del flavor y del valor nutricional, así como en el incremento de la vida de anaquel y en la eliminación de la alergenicidad de algunas proteínas. La moderna biotecnología permite actualmente la producción en masa de la transglutaminasa microbiana (MTGasa), haciéndola disponible a la industria alimentaria como una herramienta potencial para el desarrollo y producción de nuevos alimentos proteicos (Kuraishi, Yamazaki y Susa, 2001). No obstante, se ha observado que las proteínas globulares como la ovoalbúmina no son un buen sustrato para la enzima en su estado nativo (Ikura, Goto, Yoshikawa, Sasaki y Chiba, 1984; Traoré y Meunier, 1992), pero su modificación mediante otros métodos físicos o químicos podrían hacerla más efectiva (Dickinson, 1997).

La investigación experimental sobre el uso de la alta presión como un pretratamiento para mejorar las propiedades de gelificación de varias proteínas aisladas de la carne, los huevos, la soja o las propiedades de coagulación de la leche ha demostrado ser efectiva. Sin embargo, el comportamiento real de un alimento es complejo, especialmente en la presencia de enzimas. Se requieren más estudios para entender el potencial de esta tecnología en el control de la reología de los sistemas proteicos, así como optimizar las condiciones de operación que deberían ser usadas durante el procesamiento (Galazka *et al.*, 2000).

La utilización de métodos enzimáticos y su combinación con tratamientos físicos para la formación de heteropolímeros, son procesos que pueden llegar a tener una gran utilidad en la industria alimentaria y que permitirían el desarrollo de productos de alto valor agregado con un futuro potencial en el mercado.





## **II. INTRODUCCIÓN**

## **A. ACTITUD DE LOS CONSUMIDORES**

Las actitudes pueden ser conceptualizadas como el resultado de la combinación de atributos y características que los consumidores perciben en un producto. Las poblaciones de diferentes culturas y religiones perciben la carne de ave como más saludable y una opción más deseable que la carne roja. Además, el bajo costo, el alto valor nutricional y la alta digestibilidad han sido considerados siempre como razones importantes en la gran demanda de la carne de ave (Verbeke y Viaene, 1999).

Los consumidores esperan productos de buena calidad, derivados de animales sanos criados en un ambiente adecuado, más naturales, frescos, de buen sabor y nutritivos (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry y Buckley, 1998). La mayoría de los estudios sobre el comportamiento de los hábitos de consumo se enfocan a las carnes rojas y hay pocos estudios sobre la percepción de la carne de pollo, lo cual es sorprendente, ya que el consumo de pollo se incrementó notablemente en las últimas décadas (Kennedy, Stewart-Knox, Mitchell y Thurnham, 2004). El éxito de la carne de pollo parece estar determinado por su imagen saludable y por otros factores que también son de suma importancia como el bienestar animal y las condiciones de producción aceptables.

Las tendencias preferenciales en el consumo de los productos procesados de carne de ave son diferentes en las distintas regiones del planeta. Las relativas a los productos precocinados y de bajo contenido de grasa son muy importantes en los Estados Unidos de América (EUA), donde la seguridad y la salud son temas clave en el desarrollo de nuevos productos cárnicos. Igualmente, los cambios de sabor, textura y aroma y los aperitivos son muy apreciados tanto en la Unión Europea (UE) como en América del Norte, donde los consumidores quieren variedad y comodidad. Los grupos de productos como salchichas, porciones de pollo o “*nuggets*”, adobados y pollo frito son los más solicitados por los consumidores de todo el mundo, mientras que las bolas de pollo son importantes sólo en Asia y las hamburguesas de pollo en la UE (Mandava y Hoogenkamp, 2001).

## **B. CARNE DE POLLO**

### **1. Antecedentes**

Se cree que el pollo (*Gallus domesticus*) desciende de una especie salvaje de aves del sureste de Asia y su domesticación ocurrió probablemente antes del año 6,000 a. C. (West y Zhou, 1989). Durante siglos, la mayor parte de las actividades de los criadores de la especie se concentraron en la apariencia y exhibición, más que en la producción para alimento (Charles, 2003). A principios del siglo pasado, la mayoría de las aves se criaban para producir huevos y los animales se vendían como subproducto en los mercados locales. Después de la Primera Guerra Mundial, en el Reino Unido se criaron gallos para la producción de carne (Hewson, 1986) pero no fue hasta 1940 que se desarrolló el pollo broiler<sup>1</sup> en los EUA y la carne de pollo se produjo en grandes cantidades para uso alimentario (Barbut, 2002a). Actualmente, la industria avícola está altamente integrada y gestionada por un gran número de corporaciones.

En avicultura industrial, cuando se habla del pollo para carne, se define a un tipo de ave de ambos sexos, cuyas características principales son su rápida velocidad de crecimiento y la formación de unas notables masas musculares, principalmente en la pechuga y las patas, lo que le confiere un aspecto redondeado, muy diferente del que tienen otras razas o cruces de la misma especie, explotadas para la puesta. El corto período de crecimiento y engorde de unas 6 o 7 semanas, lo convierte en la base principal de la producción masiva de carne aviar de consumo habitual (Castelló, 2002).

### **2. Producción y consumo**

Mientras que la producción mundial total de carne se ha doblado en las últimas décadas, la de carne de ave se ha cuadruplicado y, a pesar del aumento

---

<sup>1</sup> Se entiende por "broiler" al ave joven procedente de un cruce genéticamente seleccionado para alcanzar un rápido crecimiento

de la población mundial —68% en el mismo período—, la carne de ave disponible actualmente permite un consumo *per capita* cada vez más elevado (Tabla 1).

**Tabla 1. Evolución de la población mundial y de la producción total de carne**

	1970	1980	1990	2000
POBLACIÓN MUNDIAL (millones de habitantes)	3 600	4 440	5 266	6 055
PRODUCCIÓN TOTAL DE CARNE (millones de toneladas)	104	140	168	203
PROPORCIÓN DE CARNE DE AVE (millones de toneladas)	15	26	41	66
PROPORCIÓN DE CARNE DE AVE (sobre el total, en %)	15	19	24	32
CONSUMO DE CARNE DE AVE (por persona y año, en kg)	4.4	5.8	7.8	11.0

Fuente: FAO Departamento de Desarrollo Económico y Social (2006)

Entre 1990 y 2001 la producción mundial de carne de ave aumentó alrededor de un 72%. Este notable crecimiento refleja no sólo el constante incremento de la demanda sino también el éxito de la selección, la cría, el procesado posterior y la comercialización (Windhorst, 2003). Los productores han sido capaces de ofrecer un producto de alta calidad a un precio atractivo que sintoniza con la demanda de los consumidores. Los ritmos de crecimiento difieren notablemente entre continentes o sub-continentes y el mayor incremento relativo en la producción lo muestran Asia y Sudamérica. La UE perdió parte del mercado y otras regiones han sido capaces de aumentar su volumen de producción mucho más rápidamente. Para comprender la importancia actual de la avicultura en el mundo se presentan los datos de la Tabla 2.

De acuerdo con la clasificación de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la carne de ave abarca, además de la de pollo, la de las gallinas de desvieje y la de otras especies avícolas, como el pavo, el pato, el ganso, la perdiz, el faisán, el avestruz, etc. La producción de carne de aves está fuertemente correlacionada con el avance en la producción de carne de pollo (Gillin, 2002b). La carne de pollo es la carne de ave de mayor consumo, seguida de la de pavo y pato y ha permanecido prácticamente sin

cambio en los últimos cuarenta años. En relación con el consumo total de carne de ave, el broiler es aproximadamente el 85% en todo el mundo, 61% en Francia e Italia, 81% en los Países Bajos y el Reino Unido y 90% en España (Castelló, 2002).

**Tabla 2. Producción mundial de carne**

	2005 (Millones t)	2006* (Millones t)	2007** (Millones t)	VARIACIÓN 2007/2006
CARNE DE BOVINO	64.6	66.2	66.6	0.5%
CARNE DE AVE	82.8	84.0	86.2	2.7%
CARNE DE CERDO	104.0	107.4	110.7	3.1%
CARNE DE OVINO	13.1	13.6	13.9	2.1%
PRODUCCIÓN TOTAL DE CARNE	269.7	276.6	283.0	2.3%

Fuente: FAO Dirección de Estadística, (2007a). \*Datos estimados. \*\*Predicciones para el presente año.

Los principales países productores de carne de pollo son EUA, China, Brasil, México y Tailandia (FAO Dirección de Estadística, 2007b). La producción de carne de pollo se destina a satisfacer los mercados internos y las exportaciones están concentradas en unos pocos países. En la última década, Brasil ha quintuplicado sus exportaciones y Tailandia las ha triplicado. Los EUA destinan una parte importante de sus exportaciones a Rusia y Arabia Saudita se abastece principalmente de Brasil y de Francia, siendo este último el principal país exportador de la UE. Los principales importadores son Hong Kong, Rusia, China, Japón y la UE (Windhorst, 2003).

Entre las carnes de bovino, cerdo y pollo, el consumo de carne de pollo es el que ha presentado mayor crecimiento en las últimas décadas. En el periodo de 1960 a 2001 creció un 5.2%, mientras que la de bovino y la de cerdo aumentaron un 1.7% y 3.2% respectivamente. Algunas razones para el incremento de producción y consumo, son su bajo coste de producción, la rápida velocidad de crecimiento, el elevado valor nutricional de la carne y la introducción de nuevos productos procesados (Barbut, 2002a). Su popularidad obedece, en gran parte, a que es una carne económica, apta para todas las edades, fácil de preparar y,

además, es una importante fuente de proteínas y con bajo contenido de grasa si se consume sin piel (Castelló, 2002). El consumo mundial medio de carne de pollo fue de 12.1 kg *per capita* anual (2004) y aumenta rápidamente (Tabla 3).

**Tabla 3. Previsiones del consumo *per capita* anual de carne de pollo**

	2007 (kg)	2008 (kg)	2009 (kg)	2010 (kg)	2015 (kg)
EUA	47.35	48.17	49.09	49.83	52.10
HONG KONG	41.72	42.08	42.51	42.86	44.06
AUSTRALIA	36.22	36.74	37.07	37.30	38.96
BRAZIL	35.37	35.97	36.29	36.59	38.98
CANADÁ	29.48	29.69	30.10	30.41	30.93
MÉXICO	28.37	28.84	29.46	30.04	32.39
UE	16.95	17.40	17.78	18.15	19.95
JAPÓN	14.54	14.65	14.75	14.85	15.34
RUSIA	13.19	13.60	13.87	14.07	15.21
TAILANDIA	13.14	14.18	14.52	14.83	16.22
CHINA	8.24	8.48	8.73	8.96	9.93

Fuente: FAPRI Food and Agricultural Policy Research Institute (2007)

### 3. Valor nutricional y composición química

La carne de pollo contiene proteínas de alto valor biológico, poca grasa y bajo contenido de ácidos grasos saturados y colesterol, es fuente de ácidos grasos mono y poliinsaturados y aporta vitaminas y minerales (Tabla 4).

#### **Proteínas**

Las proteínas constituyen del 18 al 20% del peso del músculo magro y el agua y la grasa representan el 75 y el 5%, respectivamente. Las proteínas musculares pueden dividirse en tres grupos principales, clasificadas como sarcoplásmicas, miofibrilares y del tejido conectivo, de acuerdo a su solubilidad en agua y sales (Tabla 5).

Las proteínas miofibrilares, también conocidas como proteínas contráctiles o citoesqueléticas, constituyen aproximadamente el 55% de las proteínas totales. Se extraen mediante soluciones tampón de intermedia o alta fuerza iónica, por lo que se les conoce como proteínas solubles en sal.

**Tabla 4. Composición media de carne de pollo, músculos claro y oscuro**

NUTRIENTES	CARNE DE POLLO*	MÚSCULO CLARO	MÚSCULO OSCURO	UNIDADES
ENERGÍA	498	477	523	kJ/100 g
ENERGÍA	119	114	125	kcal/100g
AGUA	76.38	74.86	75.99	g/100 g
PROTEÍNAS	20.59	23.20	20.08	g/100 g
LÍPIDOS TOTALES	3.42	1.65	4.31	g/100 g
CENIZAS	0.93	0.98	0.94	g/100 g
CALCIO	11	12	12	mg/100g
HIERRO	1.03	0.73	1.03	mg/100 g
MAGNESIO	23	27	23	mg/100 g
FÓSFORO	166	187	162	mg/100 g
POTASIO	226	239	222	mg/100 g
SODIO	88	68	85	mg/100 g
ZINC	2.21	0.97	12.00	mg/100 g
COBRE	0.063	0.040	0.063	mg/100 g
MANGANESO	0.021	0.018	0.021	mg/100 g
SELENIO	13.5	17.8	13.5	µg/100 g
TIAMINA (B <sub>1</sub> )	0.082	0.068	0.077	mg/100 g
RIBOFLAVINA (B <sub>2</sub> )	0.199	0.092	0.184	mg/100 g
ÁCIDO NICOTÍNICO	5.778	10.604	6.246	mg/100 g
ÁCIDO PANTOTÉNICO	1.287	0.822	1.249	mg/100 g
PIRIDOXAL (B <sub>6</sub> )	0.340	0.540	0.330	mg/100 g
CIANOCOBALAMINA (B <sub>12</sub> )	0.37	0.38	0.36	µg/100 g
VITAMINA A	57	27	72	U.I.
VITAMINA C	3.2	0.0	3.1	mg/100 g
VITAMINA E	0.031	0.22	0.21	mg/100 g
VITAMINA K	2.9	2.4	2.4	mcg/100 g

Fuente: US Department of Agriculture (2006). Valores de nutrientes y pesos en la porción comestible. \*Cuarto trasero, sin piel ni huesos

De las proteínas miofibrilares, la miosina y la actina son las dos principales que intervienen en la contracción muscular. En la carne, después del *rigor mortis*, la miosina, la actina F, la tropomiosina y la troponina forman un complejo denominado actomiosina que cuando se solubiliza durante la trituration, es el principal responsable del aumento de viscosidad de la pasta de carne (Smyth, O'Neill y Smith, 2001) (Figura 1).

Tabla 5. Principales proteínas de músculo magro de ave

MIOFIBRILARES*	11.5%	SARCOPLÁSMICAS*	5.5%	TEJIDO COLECTIVO*	2.00%
Miosina	5.5%	Mioglobina	0.2%	Colágeno	1.00%
Actina	2.5%	Hemoglobina	0.6%	Elastina	0.05%
Tropomiosina	0.6%	Citocromos	0.2%	Mitocondrial	0.95%
Troponina	0.6%	Enzimas glicolíticas	2.2%		
Proteína C	0.3%	Creatinina-cinasa	0.5%		
$\alpha$ -actinina	0.3%				
$\beta$ -actinina	0.3%				

Fuente: Asghar, Samejima y Yasui (2005). \* Datos basados en músculo con 19% de proteína.

La miosina es indispensable para desarrollar la gelificación y contribuye a las propiedades ligantes y de retención de agua en los productos cárnicos emulsionados (Asghar *et al.*, 1985). Esta proteína tiene características tanto fibrosas como globulares: consta de una cabeza globular doble unida a una región  $\alpha$ -helicoidal de dos hebras que se enrollan sobre sí mismas. La miosina de pollo contiene 43 grupos sulfhidrilo (SH), no contiene enlaces disulfuro (SS) y tiene un pl de 5.3, que refleja su elevado contenido en ácidos aspártico y glutámico (Smyth, Smith, Vega-Warner y O'Neill, 1996).

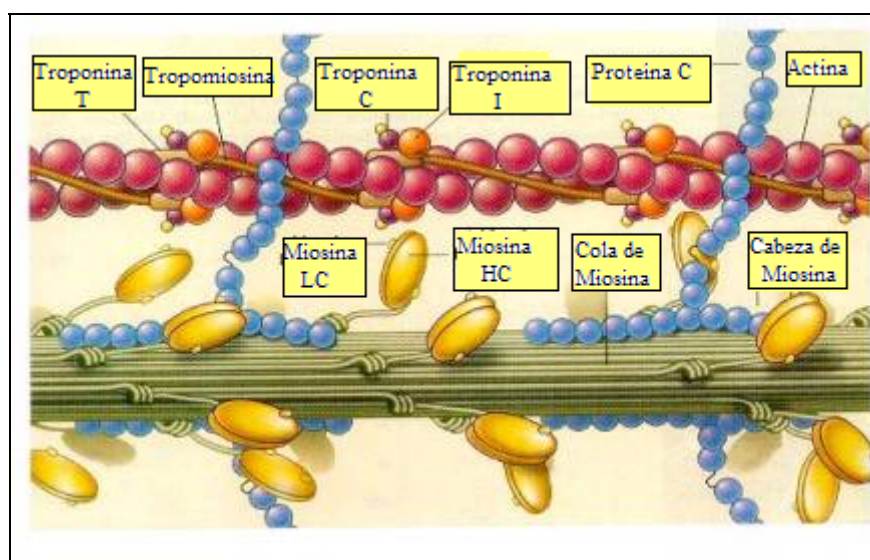


Figura 1. Esquema de las proteínas miofibrilares



La actina es la proteína mayoritaria de los filamentos delgados. En solución salina fisiológica se polimeriza en una forma filamentosa o actina F, constituida por dos hebras que se enrollan una en la otra originando una hélice de monómeros de actina G. Esta estructura se repite a lo largo del eje de la hélice que forma el centro del filamento delgado (Wang y Smith, 1994b).

#### **4. Productos cárnicos de pollo**

En los países industrializados el consumo de productos cárnicos ha ido en aumento. Los consumidores han pasado de la compra de una carne sin preparación al consumo de elaborados cárnicos con un cierto valor añadido que se adaptan mejor a sus necesidades y permiten seguir una dieta variada. La carne de pollo presenta muchas ventajas como materia prima en la producción de elaborados cárnicos: es una carne con sabor bastante neutro, muy bien aceptada por consumidores de todas las edades y grupos culturales, es una excelente fuente de proteínas de alta calidad con bajos niveles de grasa y su precio es económico. Desde el punto de vista industrial, es una materia prima fácil de utilizar en una gran variedad de procesos productivos actuales tanto en la elaboración de alimentos como en el sector de restauración.

La carne de pollo se encuentra en el mercado como carne fresca y preparados de carne o bien como productos cárnicos transformados. Los preparados de carne deben ser cocinados por el consumidor y fueron los primeros en aparecer en el mercado. Algunos preparados cárnicos pueden consumirse directamente y en ciertos países europeos como Italia, se empezaron a industrializar a principios de los años noventa.

A pesar de que muchos cortes de carne son magros, productos como las salchichas suelen tener un elevado contenido en grasa, pero mediante la reformulación puede reducirse. Los sustitutos de grasa deben contribuir con un mínimo de calorías y no afectar las características sensoriales. La reducción a menos de 10% de grasa a menudo origina productos menos firmes y secos, con el interior blando o pastoso y la formación de una piel muy elástica. La reformulación puede disminuir la unión de las partículas de carne, dar un color más oscuro, provocar la falta de sabor o acortar la vida útil del producto. Por todo

---

---

ello, ingredientes o procesos que minimicen los cambios en la textura o el sabor ofrecen un potencial en el desarrollo de productos cárnicos bajos en grasa.

## **5. Pastas de carne**

Las pastas de carne picadas, como salchichas de distintas clases, pueden describirse como sistemas multifásicos complejos constituidos por proteínas musculares solubilizadas, fibras musculares, células adiposas, gotas de grasa, agua, sal y otros ingredientes (Smyth *et al.*, 2001). El reto es producir una pasta estable que pueda ser sometida a tratamiento térmico sin que la grasa y el agua se separen (Barbut, 2002b). Existen dos teorías para explicar la estabilización de la grasa en las pastas de carne. La primera se conoce como teoría de la emulsión y se basa en la formación de una película proteica interfásica alrededor de los glóbulos de grasa, que los estabiliza durante el proceso. La segunda, denominada teoría de la captura física, postula que las partículas de grasa están físicamente atrapadas dentro de la matriz proteica viscosa antes del calentamiento y, posteriormente, dentro de la matriz del gel después del proceso térmico (Gordon y Barbut, 1992).

### ***Teoría de la emulsión***

Tradicionalmente, las pastas de carne se han considerado sistemas tipo emulsión (Schut, 1976), sin embargo, no poseen todas las propiedades de una emulsión clásica de aceite en agua, principalmente porque el tamaño de las gotas lipídicas de las pastas de carne superan el rango del tamaño coloidal observado en las emulsiones verdaderas ( $>1\mu\text{m}$ ) y porque en algunas fases del proceso la grasa está parcialmente cristalizada o se encuentra dentro de células adiposas intactas (Dickinson, 1992). Sin embargo, hay algunas características en las pastas de carne cruda que recuerdan una emulsión, por lo que este término se sigue utilizando (Smyth *et al.*, 2001).

Las proteínas miofibrilares desempeñan un papel importante en la formación de la película interfásica en las pastas de carne. Durante la emulsificación, la miosina se integra rápidamente a la interfase grasa-agua, seguida de la actomiosina, troponina, tropomiosina y actina (Galluzzo y Regenstein, 1978a; Galluzzo y Regenstein, 1978b). En los sistemas modelo, la miosina forma

emulsiones viscosas, finamente divididas que se consideran más estables que las emulsiones ligeras producidas por la actina. Las emulsiones estabilizadas por miosina consisten de glóbulos pequeños de tamaño uniforme que presentan pocos cambios durante el calentamiento; sin embargo, las estabilizadas por la actina forman glóbulos más grandes y se fusionan durante el cocinado (Tsai, Cassens y Briskey, 1972).

Durante el calentamiento de las pastas finamente trituradas para elaborar productos como salchichas tipo frankfurt o bologna ocurren numerosos cambios. En la fase de homogeneización que se realiza a una temperatura inferior a 14 °C, se forma un fluido viscoso, que puede ser bombeado y embutido en una funda. Al iniciar el calentamiento, la grasa comienza a fundir a 30 °C y las proteínas miofibrilares que participan en la película interfásica empiezan a desnaturalizarse alrededor de los 43 °C a 45 °C. Alrededor de 60 °C, la grasa se expande, el colágeno funde para ser transformado en gelatina y las proteínas, principalmente actina y miosina, comienzan a gelificar. Al final del proceso térmico, entre 70 °C y 75 °C, el producto ya no presenta fluidez, debido a la desnaturalización de las proteínas (Barbut, 2002b).

Jones y Mandigo (1982) observaron un gran número de poros en la película interfásica que rodea los glóbulos de grasa y algunas gotitas más pequeñas cerca de estos poros en los productos de carne cocinados. Estos autores admiten el beneficio de la formación de una película de proteína flexible y relativamente delgada alrededor de los glóbulos de grasa y sugieren que la formación de poros en la película es un mecanismo de liberación de la presión durante el calentamiento. Fotomicrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido indican que la grasa atraviesa la película en puntos débiles y forma apéndices esféricos estables en pastas de carne cocinadas. En las pastas estables se aprecian pequeñas bolsas uniformes de grasa y, por el contrario, en las pastas inestables se observan amplias zonas de exudación que pueden formar canales de grasa y facilitar la unión (Gordon y Barbut, 1990).

---

---

### ***Teoría de la captura física***

Durante la preparación de las pastas de carne, el picado del músculo con sal y agua, favorece la desintegración del tejido muscular, la solubilización de las proteínas y el hinchamiento de las fibras musculares, lo que provoca un aumento en la viscosidad de la mezcla que permite la estabilización de la grasa dispersa (Smyth *et al.*, 2001). Durante el tratamiento térmico, aunque la grasa de ave se funde entre 13 °C y 33 °C (Findlay y Barbut, 1990), antes de que se alcance la fuerza máxima del gel (> 60 °C) (Wu, Hamann y Foegeding, 1991; Wang y Smith, 1994a), la inmovilidad de los glóbulos de grasa se mantiene debido a la formación de una red entre la película interfásica y la matriz del gel de proteínas dentro de la fase continua, lo cual evita la coalescencia. Gordon y Barbut (1990) sugieren que las finas estructuras similares a hilos que se observan en la superficie de los glóbulos de grasa mediante microscopía electrónica de barrido, son restos de las conexiones entre la película interfásica y las proteínas de la matriz. Aunque todavía no se conoce claramente la importancia de los dos mecanismos para la estabilización de la grasa en las pastas de carne, los resultados disponibles hasta el momento actual apoyan firmemente que el modelo de captura física es el mecanismo principal en la estabilización de las pastas de carne en los productos de ave procesados (Smyth *et al.*, 2001).

## **C. HUEVO Y OVOPRODUCTOS**

### **1. Generalidades**

Los huevos son probablemente uno de los primeros ingredientes multifuncionales que se han utilizado en la historia de la tecnología de los alimentos. Debido a que sus proteínas poseen múltiples propiedades como espumantes, emulsionantes, gelificantes y ligantes, son ingredientes deseables en muchos alimentos, además de ser una excelente y económica fuente de proteínas de alta calidad y baja en calorías. Apropiado como fuente de nutrientes para la mayoría de la población, es importante en la dieta de niños, convalecientes y ancianos que tienen mayor dificultad para la digestión y absorción de nutrientes (Nys y Sauveur, 2004).

En relación con el consumo de huevos y el alto contenido de colesterol, ha habido una creciente revalorización en los últimos años. Un metaanálisis de 224 estudios en 30 años de investigación reveló una limitada relación entre el colesterol de la dieta y el colesterol del plasma (Howell, McNamara, Tosca, Smith y Gaines, 1997). En el mayor estudio epidemiológico realizado actualmente, se demostró que el consumo de un huevo diario no tiene un impacto substancial en el riesgo de padecer enfermedades coronarias (Hu *et al.*, 1999), y que personas que consumen más de cuatro huevos a la semana han presentado menores niveles de colesterol que aquellas que consumen uno o menos de un huevo por semana (Kerver, Bianchi, McNamara y Song, 2000).

## 2. Producción y consumo

De acuerdo a las estadísticas de la FAO, entre 1961 y 2000 la producción anual de huevos en el mundo se incrementó más de 3.5 veces, principalmente en los países en vías de desarrollo. El caso más llamativo es el de China, que pasó de una producción de 1.6 a 22.3 millones de toneladas (t) en ese mismo periodo con un crecimiento anual del 8%. En 2000, la producción en los países desarrollados sumó sólo el 34% del total mundial. La contribución de 10 países representó el 96.4% de la producción mundial en 2000: China, EUA, México, India, Turquía y Brasil son los países que participaron principalmente en el desarrollo de la producción (Tabla 6). Para 2015 se espera una producción de 72 millones de toneladas, un 31% más de la producción de 2000.

**Tabla 6. Evolución de la producción mundial de huevos de 1990 a 2000**

	1990 (Mt)*	1995 (Mt)*	2000 (Mt)*	ÍNDICE** (%)
ÁFRICA	1 556	1 775	1 977	127.1
AMÉRICA DEL NORTE Y CENTRAL	5 779	6 411	7 467	129.2
AMÉRICA DEL SUR	2 253	2 666	2 728	121.1
ASIA	14 507	26 384	32 382	223.2
EUROPA	11 125	9 595	9 506	85.4
OCEANÍA	246	210	267	108.6
MUNDIAL	37 554	47 033	54 328	144.7

Fuente: Gillin (2002a). \*Mt = Miles de toneladas. \*\* Índice 2000/1990

Los mayores importadores de huevo en los últimos años son: Alemania, Holanda, Japón, Hong Kong y Francia. Del total de huevos importados, la mayoría se venden en el mercado del país importador y los demás son reexportados. El más grande exportador de huevos y ovoproductos es Holanda con un 45% del mercado mundial, seguido de Bélgica y EUA. Las exportaciones están controladas principalmente por los países de Europa occidental. Fuera de EUA, sólo hay dos compradores principales: Japón para ovoproductos y Hong Kong para huevo con cáscara (Gillin, 2002a). Los principales países productores de huevo en el mundo aparecen en la Tabla 7.

**Tabla 7. Principales países productores de huevos de gallina en 2005**

ORDEN	PAÍS	PRODUCCIÓN (Mt)*
1	China	24 348
2	EUA**.	5 329
3	India	2 492
4	Japón	2 465
5	Federación Rusa***	2 054
6	México	1 906
7	Brasil	1 560
8	Francia***	1 045
9	Indonesia	876
10	Turquía	830

Fuente: FAO Dirección de Estadística (2007b). Datos estimados. \*Mt = Miles de toneladas.  
\*Cifra oficial. \*\*\*Cifra extraoficial

El consumo de huevos es principalmente como huevo fresco en cáscara y sólo cierta cantidad se procesa y consume como ovoproductos. El consumo medio anual de huevos es de 227 huevos *per capita* en los países desarrollados, de 118 en los países en vías de desarrollo y la media mundial anual es de 142. La FAO pronostica poco crecimiento en la demanda de huevo en los países desarrollados para 2015, aproximadamente del 1% o menos, debido a la saturación de oferta de alimentos y al sobreconsumo general que cambiará los patrones de consumo. Sin embargo, el crecimiento real en la demanda de huevos de mesa se presentará en los países en vías de desarrollo determinado por el incremento de los ingresos y el crecimiento de la población (Gillin, 2002a).

Los ovoproductos son los productos obtenidos a partir del huevo, de sus diferentes componentes o sus mezclas, una vez eliminadas la cáscara y las membranas y que están destinados al consumo humano; podrán estar parcialmente completados por otros productos alimenticios o aditivos; podrán hallarse en estado líquido, concentrado, desecado, cristalizado, congelado, ultracongelado o coagulado (BOE 292, 1992).

### **3. Valor nutricional y composición química**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las proteínas del huevo tienen la más alta digestibilidad, en comparación con las demás proteínas, ya que contienen el balance ideal de aminoácidos esenciales. El huevo es también una excelente fuente de ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas (excepto vitamina C) (Gutiérrez, Takahashi y Juneja, 1997) (Tabla 8).

#### ***Albumen***

El albumen es un sistema proteico de numerosas proteínas globulares, constituido principalmente por ovoalbúmina y se encuentran fibras de ovomucina incluidas en la solución acuosa. Los carbohidratos (1% del peso total) se encuentran en forma libre o combinada con proteínas y la glucosa constituye el 98% de los carbohidratos libres totales. La cantidad de lípidos en el albumen de huevo es mínima en comparación con la cantidad presente en la yema (Powrie y Nakai, 2000). Las principales proteínas y algunas de sus características fisicoquímicas más importantes se pueden observar en la Tabla 9.

La ovoalbúmina constituye más de la mitad de las proteínas presentes en el albumen y es la proteína que contribuye predominantemente a las propiedades funcionales del mismo (Mine, Noutomi y Haga, 1991). Es una fosfoglicoproteína monomérica, comprende 385 aminoácidos y casi la mitad son hidrofóbicos. Es la única proteína del albumen que contiene cuatro grupos sulfhidrilo (SH) con un enlace disulfuro (SS) (Nisbet, Saundry, Moir, Fothergill y Fothergill, 1981).

Tabla 8. Composición del huevo entero, yema, albumen y albumen deshidratado

NUTRIENTES	HUEVO ENTERO	YEMA	ALBUMEN	ALBUMEN EN POLVO	UNIDADES
ENERGÍA	598	1346	216	1598	kJ/100g
ENERGÍA	143	322	52	382	kcal/100g
AGUA	75.84	52.31	87.56	5.80	g/100 g
PROTEÍNAS	12.58	15.86	10.90	81.10	g/100 g
LÍPIDOS TOTALES	9.94	26.54	0.017	0.0	g/100 g
CARBOHIDRATOS*	0.77	3.59	0.73	7.80	g/100 g
CENIZAS	0.86	1.71	0.63	5.30	g/100 g
CALCIO	53.00	129.00	7.00	62.00	mg/100g
HIERRO	1.83	2.73	0.08	0.15	mg/100 g
MAGNESIO	12.00	5.00	11.00	88.00	mg/100 g
FÓSFORO	191.00	390.00	15.00	111.00	mg/100 g
POTASIO	134.00	109.00	163.00	1125.00	mg/100 g
SODIO	140.00	48.00	166.00	1280.00	mg/100 g
ZINC	1.11	2.30	0.03	0.10	mg/100 g
COBRE	0.102	0.077	0.023	0.11	mg/100 g
MANGANESO	0.038	0.055	0.011	0.007	mg/100 g
SELENIO	31.7	56.0	20.0	125.10	mcg/100 g
TIAMINA (B <sub>1</sub> )	0.069	0.176	0.01	0.005	mg/100 g
RIBOFLAVINA (B <sub>2</sub> )	0.478	0.528	0.439	2.53	mg/100 g
ÁCIDO NICOTÍNICO	0.07	0.024	0.105	0.87	mg/100 g
ÁCIDO PANTOTÉNICO	1.438	2.290	0.190	0.77	mg/100 g
PIRIDOXAL (B <sub>6</sub> )	0.143	0.350	0.005	0.03	mg/100 g
CIANOCOBALAMINA (B <sub>12</sub> )	1.29	1.95	0.09	0.18	µg/100 g
VITAMINA A	487	1442	0.0	0.0	U.I.
VITAMINA D	35	107	0.0	0.0	U.I.
VITAMINA E	0.97	2.58	0.0	0.0	mg/100 g
VITAMINA K	0.3	0.07	0.0	0.0	µg/100 g

Fuente: US Department of Agriculture, 2006 (2006). Valores y pesos de la porción comestible.\*Por diferencia

La ovotransferrina, también conocida como conalbúmina, contiene 15 grupos disulfuro. Está implicada en el transporte de hierro en forma soluble a las células objetivo, por lo que puede usarse como ingrediente nutricional en productos fortificados.



**Tabla 9. Principales características fisicoquímicas de las proteínas del albúmen**

PROTEÍNA	%	kDa*	p I**	T <sub>m</sub> ***	CARACTERÍSTICAS
OVOALBÚMINA	54	45	4.5	84.0	Fosfoglicoproteína
OVOTRANSFERRINA	12-13	77.7	6.0	61.0	Liga hierro y otros iones metálicos
OVOMUCOIDE	11	28	4.1	70.0	Inhibe la tripsina y serina proteinasas
LISOZIMA	3.4-3.5	14.3	10.7	75.0	Lisa la pared celular bacteriana
OVOMUCINA	1.5-3.5	220-270	4.5-5.0		Interactúa con la lisozima
OVOGLOBULINA G <sub>2</sub>	1.0	36	4.9-5.3	92.5	Interviene en la capacidad espumante
OVOGLOBULINA G <sub>3</sub>	1.0	45	4.8		Interviene en la capacidad espumante
OVOFLAVOPROTEÍNA	0.8	32	4.0		Liga a la riboflavina
OVOMACROGLOBULINA	0.5	760-900	4.5-4.7		Inhibe la hemaglutinación
CISTATINA	0.05	12	5.1		Inhibe las sulfhidril proteinasas
AVIDINA	0.05	68.3	10.0		Liga a la biotina
PROTEÍNA LIGADORA DE LA TIAMINA		38			Liga a la tiamina
GLUTAMIL AMINOPEPTIDASA		320	4.2		
GLICOPROTEÍNA		52	5.7		

Fuente: Awade (1996) y Powrie y Nakai (2000). \*Masa molecular. \*\*Punto isoeléctrico. \*\*\*Temperatura de desnaturalización

## **Yema**

La yema es un ingrediente de alto valor nutricional con características sensoriales únicas y excelente funcionalidad. A diferencia del albúmen, la yema es más rica en lípidos que en proteínas y puede considerarse una dispersión que contiene partículas uniformemente distribuidas en una solución proteica o plasma. Esas partículas incluyen figuras de mielina (56-130 nm), lipoproteínas de baja densidad (25-35 nm), gránulos (0.3-2 µm), y menor cantidad de esferas (4-150 µm) (Powrie y Nakai, 2000). Los lípidos incluyen triglicéridos, fosfolípidos, esteroides y cerebrósidos. Todos los lípidos están asociados a proteínas en forma de grandes complejos de lipoproteínas, sin embargo la proporción lípido/proteína

es 2:1 (Davis y Reeves, 2002). La composición de las proteínas de la yema y su distribución se encuentra en la Tabla 10.

**Tabla 10. Proteínas del plasma y de los gránulos de la yema**

PROTEÍNAS	CANTIDAD %	MASA MOLECULAR kDa
<b>PLASMA (78-81%)</b>		
LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)	85	16,62,71,82 y 135
LIVETINAS ( $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ )	15	80, 45 y 150
<b>GRÁNULOS (19-23%)</b>		
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) LIPOVITELINAS ( $\alpha$ y $\beta$ )	70	400
FOSVITINA	16	160 y 190
LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD	12	
PROTEÍNA LIGANTE DE COBALAMINA		39
PROTEÍNA LIGANTE DE RIBOFLAVINA		37
PROTEÍNA LIGANTE DE BIOTINA		72

Fuente: Awade (1996)

#### 4. Propiedades funcionales

##### *Propiedad gelificante*

Las propiedades reológicas del albumen, de la yema o del huevo completo cambian considerablemente cuando se calientan a determinadas temperaturas. Al calentar el albumen a 62 °C, su viscosidad y opacidad aumentan. Si la temperatura se eleva a 65 °C, se forma un gel débil aumentando su resistencia a medida que se incrementa la temperatura. En el caso de la yema, la viscosidad empieza a aumentar apreciablemente alrededor de 65 °C (Powrie y Nakai, 2000). La desnaturalización térmica de las proteínas del albumen se ha estudiado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Así, Donovan, Mapes, Davis y Garibaldi (1975) observaron que los tres principales endotermas del albumen a pH 7.0 corresponden a la desnaturalización de la ovotransferrina a 61 °C, la de la lisozima a 75 °C y la de la ovalbúmina a 84 °C.

### ***Propiedad espumante***

Las propiedades únicas como agente espumante del ovoalbumen son el resultado de la interacción de varios constituyentes proteicos. Los requerimientos para que una proteína sea un buen espumante son: una rápida absorción en la interfase agua-aire durante el batido, un rápido cambio estructural y reorganización en la interfase y la formación de una película viscoelástica cohesiva mediante la interacción intramolecular. Las proteínas funcionales en orden de importancia son las globulinas G2 y G3, ovalbúmina, ovotransferrina, lisozima y ovomucoide (Johnson y Zabik, 1981). Las interacciones electrostáticas contribuyen a las excelentes propiedades espumantes y sobretodo, a su relativamente excepcional estabilidad térmica. Al pH del albumen fresco (7 a 8), la lisozima con  $pI$  10.7 está cargada positivamente y puede interactuar por fuerzas electrostáticas con proteínas cargadas negativamente. Las interacciones hidrofóbicas son el principal tipo de interacción responsable de la estructura de las proteínas en solución (Mine, 1995). La flexibilidad de las proteínas es un factor estructural que gobierna la formación de espuma permitiendo la desnaturalización y su orientación en la superficie. Los puentes disulfuro reducen la flexibilidad de las proteínas nativas y no son un factor esencial para la formación de espumas estables de ovoalbumina (Kato, Komatsu, Fujimoto y Kobayashi, 1985).

### ***Propiedad aglutinante o ligante***

Siegel, Church y Schmidt (1979) demostraron que el albumen es un buen agente ligante para las piezas de carne. Debido a la alta concentración de proteína y a la fuerza del gel que ocasionan, el albumen deshidratado puede ser útil en la reestructuración de productos cárnicos en lugar del albumen fresco (Kato, Ibrahim, Watanabe, Honma y Kobayashi, 1990). Al evaluar la fuerza de tensión entre dos piezas de músculo de pollo, el albumen deshidratado mostró una mayor efectividad como agente ligante que el albumen fresco, el huevo entero en polvo, el plasma de diversos animales, la gelatina, el gluten de trigo, el aislado de soja y una mezcla de alginato de sodio y carbonato de sodio (Lu y Chen, 1999).

---

---

### ***Propiedad anticristalizante***

El albumen evita la formación de cristales de sacarosa mayores de 25  $\mu\text{m}$ , que es el nivel de detección de las papilas gustativas. Es una propiedad muy útil en alimentos como productos de pastelería y helados (Thébaudin y Lefevre, 1994).

### ***Propiedad emulsionante***

Durante la preparación de algunos productos, los constituyentes de la yema pueden funcionar como emulsificantes y espumantes, así como formadores de una estructura de red. Su funcionalidad parece depender de su estructura supermolecular (micelar o granular) y también de la desorganización estructural originada por tratamientos térmicos como la pasteurización o extracción de lípidos (Kiosseoglou, 2003). Existe una relación entre la estructura de las proteínas, su composición y propiedades emulsionantes (Kato *et al.*, 1990). Los factores más importantes que influyen en las propiedades de emulsificación de las proteínas parecen ser la masa molecular, secuencia y composición de los aminoácidos, solubilidad e hidrofobicidad. Además, algunos factores extrínsecos como pH, fuerza iónica, interacciones con otros componentes, método de obtención y tratamientos tecnológicos afectan las propiedades de las proteínas (Kinsella, 1979; Nakai, Hayakawa y Li-Chan, 1984).

Las proteínas constituyen la película interfacial con dos principales roles: provocar una disminución de la tensión superficial debido a la absorción de las proteínas en la interfase y formar una barrera mecánica debido a sus propiedades viscoelásticas que la protegen de la rotura. Al mismo tiempo, controlan las interacciones coloidales entre las gotas de aceite recubiertas regulando la agregación y floculación. Se considera que las lipoproteínas de baja densidad son las responsables de las propiedades emulsionantes de la yema. Estudios recientes han confirmado la contribución de la apoproteína de las lipoproteínas de baja densidad en la formación y estabilidad de las emulsiones hechas con yema de huevo (Anton, Martinet, Dalgalarrodo, Beaurnal, David-Briand y Rabesona, 2003).

## ***D. ALTA PRESIÓN ISOSTÁTICA***

### **1. Antecedentes**

A fines del siglo XIX, Regnard en 1884 con su trabajo sobre la alteración microbiana de la leche y la carne, Roger en 1885 con su estudio sobre la destrucción de ciertos microorganismos y Hite en 1899 trabajando con leche y productos basados en frutas, descubrieron la utilidad de las altas presiones en la conservación de los alimentos (Chéret, 2005). Fue necesario que transcurriera un siglo para ver resurgir el uso de la presión en la industria alimentaria. Este repunte de la actividad hace ya una quincena de años ha suscitado una fuerte atención motivando una activa investigación y el desarrollo de muchas aplicaciones. La comercialización de productos presurizados se inició en el mercado japonés en 1990 con la introducción en el mercado de una mermelada de fresas de la marca Meidi-Ya (Thakur y Nelson, 1998). En los años siguientes se diversificaron los productos presurizados así como los equipos de tratamiento y actualmente se puede encontrar una gran variedad de productos a partir de frutas y legumbres, carnes, pescados y productos del mar.

Los principales obstáculos para el desarrollo de esta tecnología fueron las dificultades técnicas en la fabricación de equipos adaptados a la industria de los alimentos y los costos asociados con las unidades de alta presión. Sin embargo, los recientes progresos en el diseño de los equipos ha asegurado el reconocimiento potencial de esta tecnología para su uso en alimentos a nivel mundial (Balci y Wilbey, 1999).

### **2. Principios básicos**

Cuando se ejerce una fuerza sobre una superficie, el efecto generado o presión, se expresa como el cociente de la intensidad de esta fuerza por unidad de superficie. En el Sistema Internacional de unidades (SI), la unidad de presión

---

---

es el pascal (Pa).  $1\text{Pa} = \text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ . En el procesado de alimentos, se utiliza el mega pascal<sup>2</sup> (MPa) como unidad habitual.

La tecnología de API se define como el tratamiento que aplica una presión entre 100 y 1 000 MPa sobre un líquido que contiene los productos que van a ser sometidos a tratamiento. Generalmente, suele utilizarse agua debido a su baja compresibilidad, de ahí que se le denomine también alta presión hidrostática. Los efectos de la presión sobre el comportamiento de los sistemas bioquímicos se rigen por el principio enunciado en 1884 por Henri Le Chatelier. La transmisión de la presión es isostática, es decir, que los cambios de presión son prácticamente uniformes y constantes, y no depende del volumen y la geometría del producto (Earnshaw, 1996). Tras la compresión, el producto recupera su forma inicial cuando se libera la presión. Algunas de las principales ventajas de esta tecnología son que el tratamiento requiere menos energía que otros sistemas de conservación y que no hay un gradiente de presión en el producto ya que la transmisión de la presión es casi instantánea, a diferencia de lo que sucede en los tratamientos térmicos.

Las temperaturas de operación dependen del tipo de sistema pero el intervalo varía generalmente entre  $-20\text{ °C}$  y  $80\text{ °C}$  (San Martín, Barbosa-Canovas y Swanson, 2002). La compresión puede incrementar la temperatura de los alimentos aproximadamente  $3\text{ °C}$  por cada 100 MPa y si el alimento contiene una gran cantidad de grasa, se alcanza una temperatura mayor ( $8\text{ °C}$  a  $9\text{ °C}/100\text{ MPa}$ ) (Rasanayagam, Balasubramaniam, Ting, Sizer, Bush y Anderson, 2003).

### **3. Efecto sobre los enlaces químicos**

La ley de moderación de Le Chatelier describe la influencia de la presión a temperatura constante como: “Un aumento de la presión aplicada a un sistema mantenido a temperatura constante, comporta un desplazamiento del equilibrio en el sentido de la reacción que, a temperatura y presión constante, se produce con disminución de volumen”. Consecuentemente, los fenómenos que vienen acompañados por una disminución de volumen son favorecidos por la presión y

---

<sup>2</sup> Un MPa es equivalente a 9.869 atm, 10 bar o  $10.197\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

viceversa (Cheftel, 1992). Un incremento en la presión a temperatura constante permite un ordenamiento de las moléculas o disminución de entropía del sistema. La influencia de una variación isotérmica de la presión sobre la constante de equilibrio viene dada por la expresión general del cambio de energía siguiente:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K = \Delta E + p \cdot \Delta V - T \cdot \Delta S$$

donde **R** es la constante de los gases perfectos, **T** la temperatura, **K** es la constante de equilibrio que gobierna el proceso, **p** la presión y **ΔG**, **ΔE**, **ΔV** y **ΔS** son los cambios de energía libre, energía interna total, volumen y entropía (Mozhaev, Heremans, Frank, Masson y Balny, 1996).

El uso de la presión como variable física cambia solamente el volumen del sistema, a diferencia de la temperatura que modifica la energía interna y el volumen del sistema. El principio de Le Chatelier nos permite predecir las modificaciones inducidas por la presión sobre las moléculas. Si conocemos el cambio de volumen que acompaña un proceso, podemos estimar si es favorecido o inhibido por la presión (Tabla 11).

Los enlaces covalentes no se afectan por el aumento de la presión, al menos hasta valores de 10 a 15 kbar, lo que los hace muy estables. El estudio de sistemas modelo demuestra que los puentes de hidrógeno se estabilizan por la alta presión. Cuando un ión se forma en solución, los dipolos del agua cercanos se comprimen fuertemente por el campo eléctrico, fenómeno conocido como electrostricción, que se acompaña por una disminución de volumen. Las interacciones electrostáticas en las biomoléculas son mucho más débiles a presiones elevadas. Generalmente se acepta que en la formación de atracciones hidrofóbicas hay cambios de volumen que se ven desfavorecidos por la presión, sin embargo, muchas interacciones entre anillos aromáticos se estabilizan. En los procesos en los que el estado de hidratación de los componentes del sistema cambia significativamente, el efecto de la presión es pronunciado (Mozhaev *et al.*, 1996).

**Tabla 11. Cambios de volumen asociados con la ruptura de enlaces químicos**

TIPO DE ENLACE	EJEMPLO	$\Delta V$ (mL/mol)	EFEECTO DE LA PRESIÓN
COVALENTE	C-C	+12	Protege el enlace
HIDRÓGENO	$-\text{OH}\dots\text{O}^- \rightarrow -\text{OH} + \text{O}^-$	+4	Aumenta los enlaces de hidrógeno
IÓNICO	$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$	-21	Rompe las interacciones electrostáticas
HIDROFÓBICO	$\text{CH}_4$ en hexano $\text{CH}_4$ en agua	-23	Rompe las interacciones hidrofóbicas
PROTEÍNA (DESNATURALIZACIÓN)	Mioglobina (pH 5.0) (nativa $\rightarrow$ desnaturalizada)	-98	Produce la desnaturalización
PROTEÍNA (DISOCIACIÓN)	Lactatodeshidrogenasa (M4 $\rightarrow$ 4M)	-500	Produce la disociación

Fuente: Gross y Jaenicke, 1994 (1994) y Lee (2002)

#### 4. Efecto sobre los sistemas biológicos

La presión afecta la conformación espacial de las macromoléculas, los cambios de estado físico del agua y los lípidos así como a numerosas reacciones químicas (Cheftel y Culioli, 1997).

##### **Agua**

A 600 MPa y 22 °C, el agua se comprime un 15% y los alimentos con gran contenido de humedad y poco gas experimentan una reducción de volumen similar a la del agua. La compresión adiabática del agua también promueve el incremento de temperatura, la cual puede disiparse por transferencia de calor entre el alimento, el agua de presurización y la vasija del equipo (Cheftel y Culioli, 1997). La API induce la disociación reversible de las moléculas de agua, disminuyendo el pH en 0.73 unidades cuando la presión se incrementa de 0.1 a 100 MPa, que puede tener un efecto sobre las proteínas (Butz y Tauscher, 2000). Además, el diagrama de fases indica que el agua puede permanecer en estado líquido a -22 °C a 210 MPa, con importantes implicaciones en los sistemas biológicos (Kalichevsky, Knorr y Lillford, 1995).



## ***Proteínas***

Generalmente, las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos se clasifican en tres grupos principales: a) propiedades de hidratación, que dependen de las interacciones agua-proteína y tienen una importante relación con la humectación, dispersión, solubilidad, absorción y retención de agua, adhesión, viscosidad, b) propiedades interfaciales incluyendo tensión superficial, emulsificación, características espumantes y c) propiedades de agregación y gelificación, que dependen de las interacciones proteína-proteína. La API puede afectar la conformación de las proteínas y permitir la desnaturalización, agregación o gelificación dependiendo del sistema proteico (tipo de proteína, pH, fuerza iónica), la presión, la temperatura y la duración del tratamiento (Messens, VanCamp y Huyghebaert, 1997).

Los efectos de la API sobre las proteínas están relacionados básicamente con la ruptura de las interacciones no covalentes dentro de las moléculas y la subsiguiente reordenación de enlaces intra e intermoleculares. Diferentes tipos de interacciones contribuyen a la estructura de las proteínas (Tabla 12).

*Estructura primaria.* Los enlaces covalentes no se ven afectados por presiones inferiores a 1 000 - 1 500 MPa, ya que su energía es muy elevada y su compresibilidad mínima, por lo que la estructura primaria permanece intacta (Mozhaev, Bec y Balny, 1994). Sin embargo, los enlaces disulfuro se ven favorecidos por la presión por reacciones de intercambio entre los grupos SH/SS o por oxidación de los grupos sulfhidrilo y tienden a estabilizar los agregados de masa molecular elevada que se forman después del desdoblamiento de proteínas inducido por la presión (Messens *et al.*, 1997; Funtenberger, Dumay y Cheftel, 1997).

*Estructura secundaria.* Los enlaces de hidrógeno son elementos clave de la estructura secundaria y su ruptura compromete el mantenimiento de la misma durante la presurización. Por el contrario, las presiones más bajas permiten estabilizar estos enlaces.

**Tabla 12. Características de las interacciones que estabilizan la estructura de las proteínas**

TIPO DE INTERACCIÓN	E* kJ/mol <sup>-1</sup>	D** Å	GRUPO FUNCIONAL	CONDICIONES DES-ESTABILIZANTES	CONDICIONES ESTABILIZANTES
COVALENTE  SEMI-COVALENTE	330 a 400  200	1-2	Enlace peptídico -NH-CO- y cistina S-S	Agentes reductores: β-mercaptoetanol, ditiotreitól (S-S)	Reactividad incrementada de grupos S-H a pH>7
ELECTROSTÁTICA	42-84	2-3	Aminoácidos con COO <sup>-</sup> (Asp, Glu) y NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (His, Arg, Lis)	Soluciones salinas, pH alto o bajo, presión	
ENLACES DE HIDRÓGENO	8-40	2-3	Átomo de H -N-H····O=C -O-H····O=C	Soluciones con guanidina, HCl, urea o detergentes, calor	Enfriamiento
HIDROFÓBICA	4-12	3-5	Aminoácidos con cadenas alifáticas o aromáticas	Detergentes, calor, presión (cadenas alifáticas laterales)	Calor moderado, presión (cadenas alifáticas laterales)
VAN DER WAALS	1-9		Dipolos permanentes, inducidos e instantáneos		

Fuente: Messens *et al.* (1997). \* Energía \*\* Distancia

*Estructura terciaria.* La estructura terciaria se modifica por presiones superiores a 200 MPa. La desnaturalización inducida por la presión parece ser un proceso complejo que conduce a muchas formas desnaturalizadas, pasando por formas intermedias, como el estado de glóbulo fundido, pero no llega a ser completa. Éste depende de la intensidad de presión aplicada, pero a más de 200 MPa, el efecto es a menudo irreversible (Balny y Masson, 1993).

*Estructura cuaternaria.* Debido a que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la estabilización de la estructura cuaternaria, las proteínas pueden ser disociadas por la presión. Las proteínas oligoméricas tienden a disociarse en subunidades a presiones moderadas (<150 MPa), y pueden reasociarse a presiones más altas (Ohmiya, Kajino, Shimizu y Gekko, 1989). Este proceso se acompaña por una gran reducción de volumen (hasta 500 mL/mol) (Mozhaev *et al.*, 1996).

El volumen de una proteína es la suma de sus constituyentes principales: el volumen de los átomos, el volumen vacío de las cavidades internas debido al

acomodamiento de los aminoácidos y la contribución de la solvatación de los enlaces peptídicos y las cadenas laterales de aminoácidos. La aplicación de presión causa desnaturalización con una reducción de volumen aproximada de 30-80 mL/mol. Mientras presiones de 1 a 2 kbar son suficientes para causar la disociación de oligómeros o complejos de proteínas, las proteínas monoméricas se suelen desnaturalizar entre 4 y 8 kbar (Heremans y Heremans, 1989; Silva y Weber, 1993). El limitado margen de estabilidad de las proteínas puede apreciarse si se compara el  $\Delta G$  de desnaturalización ( $-20$  a  $-60$  kJ/mol) con el  $\Delta G$  de conformación de enlaces covalentes ( $-200$  a  $-400$  kJ/mol) (Lee, 2002).

*Efecto sobre las enzimas.* Las enzimas juegan un doble papel muy importante en los alimentos: intervienen en reacciones de deterioro y en la modificación de sus constituyentes para producir nuevos productos. La actividad biológica de las enzimas depende principalmente del sitio activo y de su estructura tridimensional. Aun pequeños cambios en el sitio activo conducen a la pérdida de actividad enzimática (Tsou, 1986).

La respuesta de las enzimas sometidas a tratamientos de alta presión es variada y depende del origen de la enzima, la naturaleza del sustrato, así como de la presión, el tiempo y la temperatura aplicada (Palou, López Malo, Barbosa Canovas, Welti y Swanson, 1999). Además, las enzimas reaccionan de forma diferente cuando han sido extraídas de su matriz original que cuando están en los alimentos (Hendrickx, Ludikhuyze, van der Broeck y Weemaes, 1998). Algunas enzimas pueden ser inactivadas a alrededor de 100 MPa a temperatura ambiente, mientras que otras pueden resistir 1 000 MPa. Debido a la extrema barorresistencia de algunas enzimas, en la industria es necesario combinar varios procesos para su inactivación (Farr, 1990); sin embargo, algunas enzimas son más activas tras la presurización, como la polifeniloxidasa sometida a 400 MPa y es necesario aplicar hasta 800 MPa para lograr su inactivación (Weemaes, Ludikhuyze, van der Broeck y Hendrickx, 1998). El incremento de actividad también se ha observado en  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas cuando se someten a 400 y 600 MPa y sólo disminuyen después de un tratamiento a 600 MPa durante 20 min (Gomes, Clark y Ledward, 1998).

---

---

### ***Lípidos***

Los principales efectos de la presión sobre los lípidos se encuentran en los cambios de fase, de modo que la temperatura de fusión aumenta de manera reversible más de 10 °C por cada 100 MPa. Bajo presión, los lípidos tienden a dar cristales más densos y estables (Dumay, Lambert, Funtenberger y Cheftel, 1996).

### ***Carbohidratos***

En general, las moléculas de baja masa molecular como carbohidratos simples, aminoácidos, y compuestos del flavor son muy baroresistentes. Sin embargo, en los carbohidratos complejos, la presión disocia las diferentes cadenas y se observan modificaciones en las propiedades gelificantes del almidón y los alginatos (Heremans, 1982).

### ***Vitaminas***

Una de las ventajas más importantes de la API es la retención de la calidad nutricional original del producto. Sancho, Lambert, Demazeau, Largeteau, Bouvier y Narbonne (1999) estudiaron el efecto de la presión sobre la retención de las vitaminas hidrosolubles B1, B6 y C en un sistema modelo multivitamínico de yema de huevo y puré de fresas; lo compararon con procesos de pasterización (76 °C/20 s) y esterilización (120 °C/20 min), y encontraron que la retención fue mayor del 99% en las vitaminas B1 y B6. Al estudiar la degradación de la vitamina C, observaron que es independiente de la presión aplicada y concluyeron que el tratamiento de API contribuye a la conservación de la calidad nutricional al mismo tiempo que extiende la vida útil de los productos. Según Polydera, Stoforos y Taoukis (2003), en zumo de naranja, los tratamientos por alta presión son menos perjudiciales que los térmicos y los compuestos volátiles de algunos productos de frutas pueden afectarse a 800 MPa pero no a 200 ni a 500 MPa a 20 °C durante 20 min (Lambert, Demazeau, Largeteau y Bouvier, 1999).

### ***Microorganismos***

Hay un gran número de estudios sobre los cambios inducidos por la API en las células microbianas, incluyendo alteraciones en la membrana celular, la

morfología de la célula, efectos sobre las proteínas y enzimas, así como sobre el material genético (Hoover, Metrick, Papineau, Farkas y Knorr, 1989). Sin embargo, los mecanismos de inactivación aún no están totalmente esclarecidos (Patterson, 2005).

Se sabe que la membrana celular es el primer sitio que se daña por la presión (Ulmer, Ganzle y Vogel, 2000; Casadei, Manas, Niven, Needs y Mackey, 2002), y que la pared celular se ve menos afectada que la membrana, sin embargo, el daño intracelular se puede observar mediante microscopio electrónico en microorganismos sometidos a 400 MPa (Ritz, Tholozan, Federighi y Pilet, 2001; Park, Sohn, Shin y Lee, 2001). Los ácidos nucleicos son relativamente resistentes a las altas presiones y como la estructura de la hélice del ADN se forma por enlaces de hidrógeno, también es estable bajo presión. Se ha reportado que la presión causa una condensación de material nuclear en *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Lactobacillus plantarum*, y que a presiones elevadas el ADN entra en contacto con endonucleasas que rompen el ADN (Patterson, 2005). Diferentes estudios han demostrado que la API es capaz de destruir la mayor parte de los microorganismos, pero esto depende del nivel de presión, el tiempo y tipo de aplicación, el pH del medio, el tipo de microorganismo y la temperatura del proceso.

*Células vegetativas.* En general, los microorganismos resistentes a la temperatura, son también resistentes a la presión. Las bacterias Gram positivas son más resistentes a la presión que las Gram negativas; *Listeria* y *Staphylococcus aureus* son más resistentes que *Salmonella* y *Escherichia coli* y los cocos son más resistentes que los bacilos (Patterson, 2005). Sin embargo, hay muchas excepciones a esas reglas, por ejemplo, ciertas cepas de *E. coli* 0157:H7 suelen ser excepcionalmente resistentes a la presión, así como al calor, a los ácidos y al estrés oxidativo y osmótico (Benito, Ventoura, Casadei, Robinson y Mackey, 1999). Otros estudios en patógenos como *Salmonella* han demostrado sólo una débil o ninguna correlación entre la resistencia a la presión y otros tipos de estrés (Metrick, Hoover y Farkas, 1989; Sherry, Patterson y Madden, 2004).

*Esporas bacterianas.* Las esporas pueden ser extremadamente resistentes a la presión, así como a otros tratamientos físicos y pueden sobrevivir a más de

---

---

1000 MPa (Smelt, 1998). Hay una variación importante entre las esporas de diferentes especies y entre distintas cepas de una misma especie. Las esporas de *Clostridium botulinum* son las más resistentes, especialmente las del tipo B no proteolítico (Reddy, Solomon, Fingerhut, Rhodehamel, Balasubramaniam y Palaniappan, 1999). Reddy, Tetzloff, Solomon y Larkin (2006) obtuvieron una reducción de 5 log<sub>10</sub> ufc/mL de esporas de *C. botulinum* tipo E después de procesar a 827 MPa y 40 °C durante 10 min. Sin embargo, presiones relativamente bajas (200 MPa) pueden desencadenar la germinación de esporas y se ha sugerido que las esporas podrían ser destruidas al aplicar la presión en dos etapas (Gould y Sale, 1970; López, Roig, Capellas, Trujillo, Hernández y Guamis, 2003), combinando el proceso con agentes bactericidas (Capellas, Mor-Mur, Gervilla, Yuste y Guamis, 2000; López, Roig, Trujillo, Capellas y Guamis, 2003), con altas temperaturas (Mayer, 2000) o bien con irradiación (Crawford, Murano, Olson y Shenoy, 1996).

*Mohos y levaduras.* Las levaduras no están asociadas generalmente con enfermedades causadas por alimentos, pero son importantes en el deterioro, especialmente de alimentos ácidos. Son relativamente sensibles a la presión, la mayor parte de hongos y levaduras se inactivan a 400 MPa, así como las formas vegetativas, mientras que las ascosporas son más resistentes (Butz, Fister, Losch y Tauscher, 1996; Butz, Funtenberger, Haberditzl y Tauscher, 1996; Voldrich, Dobias, Ticha, Cerovsky y Kratka, 2004).

### ***Virus***

Los virus son muy heterogéneos, por lo que su respuesta a la presión varía considerablemente. Los virus más patógenos de HIV requieren presiones de 400 a 600 MPa a 25 °C por 10 min para reducir 4-5 log<sub>10</sub> el número de partículas infecciosas viables tratadas en un medio de cultivo, a pesar de que diferentes cepas varían en su resistencia a la presión (Patterson, 2005). En carne de pollo y sus productos, un tratamiento de 500 MPa a 15 °C durante 15 s inactiva más de 10<sup>5</sup> ufp/mL de virus A de la influenza aviaria altamente patógena (IAAP) subtipo H7N7 (Isbarn, Buckow, Himmelreich, Lehmacher y Heinz, 2007).

Numerosas aplicaciones son posibles como la esterilización de compuestos termosensibles en la industria farmacéutica y de instrumentos quirúrgicos (Patterson, 2005). Las últimas investigaciones sugieren la posibilidad de elaborar productos seguros para alimentos de alto valor añadido, como los alimentos para bebés (Jurkiewicz, Billasboas, Silva, Weber, Hunsmann y Clegg, 1995). Asimismo, la API puede ser un método seguro, simple y económico de producir vacunas antivirales (Ishimaru, Sa-Carvalho y Silva, 2004).

### **Priones**

En relación con la inactivación de priones infecciosos existen evidencias de que la alta presión tiene efectos sobre ellos (Garcia *et al.*, 2005). Un ejemplo de la utilidad de la API para eliminar la actividad infecciosa de priones son los estudios realizados por Brown, Meyer, Cardone y Pocchiari (2003) y Cardone, Brown, Meyer y Pocchiari (2006) en carnes procesadas debido a que la enfermedad de Creutzfeld-Jacob ha llegado a ser un serio problema de salud pública (Balny, 2006). Además, la API puede contribuir a la identificación del mecanismo de enfermedades neurodegenerativas como las de Alzheimer, Parkinson y Huntington, relacionadas con el plegamiento parcial de las proteínas, la formación de agregados y amiloides (Heindl, Garcia, Butz, Pfaff y Tauscher, 2006; Silva, Cordeiro y Foguel, 2006; Torrent, Balny y Lange, 2006).

Para la destrucción de priones infecciosos se han propuesto dos métodos, basados en la aplicación de ciclos cortos a elevadas temperaturas (121 °C a 137 °C) (Brown *et al.*, 2003) o tiempos prolongados a 800 MPa y 60 °C (Garcia *et al.*, 2004). Existe una patente de Heinze y Kortzchack (2002) con combinaciones de tiempo y temperatura que permiten procesos de esterilización que aseguran la destrucción de la proteína prion (Knorr, Heinz y Buckow, 2006).

### **5. Efecto sobre la carne**

El procesamiento de la carne por API ha sido un tema importante de investigación debido al potencial para mejorar su vida útil. Sin embargo, el tratamiento comporta cambios en los constituyentes que afectan sus propiedades como color, textura y gelificación. La industria de la carne utiliza presiones entre 200 y 800 MPa, con una duración tan corta como sea posible, principalmente con

---

---

el objeto de disminuir la carga bacteriana (de Lamballerie-Anton, Taylor y Culioli, 2002).

*Estructura del músculo.* Los efectos de la presión sobre la estructura del músculo se han evaluado en bovino (Jung, de Lamballerie-Anton y Ghoul, 2000a), aves (Yuste, Raszl y Mor-Mur, 1998) y pescado (Ashie, Simpson y Ramaswamy, 1997) y se considera que a temperatura ambiente o más baja y a presiones menores de 150 MPa, hay muy pocos cambios estructurales (de Lamballerie-Anton *et al.*, 2002). A 150 MPa y 0 °C durante tres horas se produce una pérdida de líneas M y rompimiento de bandas I, al igual que a 20 °C y 3 min. Se ha visto también un mayor espacio entre las fibras y un incremento del diámetro de las fibras y de los sarcómeros (Jung, de Lamballerie-Anton y Ghoul, 2000b). Bajo ciertas condiciones, a presiones superiores a 300 MPa los lisosomas se hinchan y hay ruptura del endomisio y de membranas (Ueno, Ikeuchi y Suzuki, 1999). Los cambios estructurales del músculo provocados por la presión dependen del tiempo *post-mortem*, la temperatura, la presión y, en menor grado, de la especie animal o del tipo de músculo. Si bien, resulta complicado interpretar los efectos de la presión por los rápidos cambios que ocurren *post-mortem* (de Lamballerie-Anton *et al.*, 2002).

*Textura de la carne.* La API puede ablandar la carne cuando se aplica antes del rigor, sin embargo no se consiguen los mismos efectos si la presión se aplica tras la maduración de la carne en refrigeración (de Lamballerie-Anton *et al.*, 2002). Un estudio exhaustivo sobre los efectos en la textura, la ultraestructura y el sistema enzimático de la carne fue realizado por Jung (2000), quien observó que la presión aumenta notablemente la actividad enzimática en el lisosoma, pero no ablanda la carne ni reduce el tiempo de maduración.

Se considera que las proteínas miofibrilares son las principales responsables del cambio de la textura de la carne y que el colágeno resulta poco afectado por la presión ya que se estabiliza primariamente por puentes de hidrógeno (Gekko y Koga, 1983). Las tres principales transiciones térmicas de miosina, colágeno y actina, observadas por DSC, se asocian con los cambios específicos en la textura. A presión atmosférica, la dureza de la carne aumenta al incrementar la temperatura y similares resultados se observan al incrementar la presión en



músculo bovino a 20 °C y 40 °C; sin embargo, a 60 °C y 70 °C y 200 MPa se produce un marcado ablandamiento, sugiriendo que puede ocurrir proteólisis en esas condiciones (Ma y Ledward, 2004). En un estudio realizado en pechuga de pollo, se observó un efecto sinérgico de la temperatura y la presión en el endurecimiento del músculo a temperaturas inferiores a 50 °C. Sin embargo, a 60 °C y 70 °C, la dureza disminuyó en tratamientos por encima de 200 MPa. El análisis por DSC reveló que a presión atmosférica, la miosina se desdobra a 60 °C, mientras que la actina se desnaturaliza completamente a 70 °C, sin embargo a 200 MPa, ambas proteínas se desdoblaron a 40 °C cuando están en solución (Zamri, Ledward y Frazier, 2006).

El tratamiento entre 0 y 450 MPa incrementó tres veces la superficie de hidrofobicidad de las proteínas miofibrilares y elevó la reactividad de los grupos sulfhidrilo de un 40 a un 69 % (Chapleau y de Lamballerie-Anton, 2003). A presiones superiores a 300 MPa se observaron cambios irreversibles y agregación de las proteínas. La modificación de las estructuras terciaria y cuaternaria puede inducir un estado de glóbulo fundido. Los cambios en las interacciones de las proteínas y las propiedades reológicas están relacionados con las modificaciones estructurales, lo que puede afectar las propiedades funcionales de los productos cárnicos (Chapleau, Mangavel, Compoint y de Lamballerie-Anton, 2004).

*Color.* La intensidad del color en el músculo se debe al contenido total de mioglobina, y los diferentes colores observados en la carne están relacionados con la proporción relativa de oximioglobina (rojo brillante), mioglobina (rojo oscuro) y metamioglobina (gris-marrón) (Renerre, 1990; Millar, Wilson, Moss y Ledward, 1994). Las características del color en la carne se modifican por la presión. Entre 250 y 300 MPa, la claridad ( $L^*$ ) aumenta y permanece constante para valores más altos, por lo tanto, la carne de bovino se observa más clara y menos roja (Carlez, Rosec, Richard y Cheftel, 1993). Esta decoloración de la carne es consecuencia tanto de la desnaturalización de la globina como del desplazamiento o liberación del grupo hemo. Por encima de 400 MPa, se produce la oxidación de la mioglobina ferrosa a metamioglobina férrica y los valores de  $a^*$  disminuyen mientras que  $b^*$  permanece constante y la carne toma un tono marrón (Riffero y Holmes, 1983; Carlez, Veciana-Nogues y Cheftel, 1995; Cheah y

---

---

Ledward, 1996). Carlez *et al.* (1995) sugieren que la formación de metamioglobina puede evitarse por la eliminación completa del oxígeno mediante el envasado al vacío o por la formación previa de nitrosomioglobina. Sin embargo, Andres, Adamsen, Moller, Ruiz y Skibsted (2006) encontraron que el oxígeno tiene un efecto negativo sobre la nitrosomioglobina y que el tratamiento a 400 MPa produce una decoloración y degradación oxidativa de los lípidos en el jamón curado durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración e iluminación. A pesar de que la presión induce modificaciones visibles en la carne fresca, después de la cocción la diferencia de color es mínima (Jung, Ghoul y de Lamballerie-Anton, 2003). Asimismo, para minimizar los problemas relacionados con el color, Arnau *et al.* en 2003 han presentado una patente sobre el “Procedimiento para la protección y la estabilización del color de carnes y productos elaborados de carne frescos, marinados o parcialmente deshidratados, tratados por alta presión”.

*Oxidación de lípidos.* Los tratamientos a menos de 300 MPa no tienen efecto sobre la oxidación de los lípidos en el caso de carne triturada envasada en presencia de aire, sin embargo, a mayores presiones la oxidación se incrementa rápidamente (Cheah y Ledward, 1996). Cheah y Ledward (1997) vieron que el hierro liberado de los complejos metálicos durante el tratamiento por API cataliza la oxidación de los lípidos de la carne. En las carnes de cerdo tratadas a 800 MPa a 20 °C, se observó una oxidación similar a la producida por el calor. En carne de pollo, la presurización (500 MPa/50 °C/30 min) provoca la oxidación de los lípidos, pero el sobrecocinado (100 °C/60 min) produce aún más compuestos secundarios de oxidación. En pechugas de pollo, la sal y el efecto mecánico mostraron un efecto prooxidante en tratamientos a 500 MPa (Beltran, Pla, Yuste y Mor-Mur, 2003; Beltran, Pla, Capellas, Yuste y Mor-Mur, 2004). Se considera que una presión de 500 MPa es crítica para el desarrollo de rancidez de la pechuga de pollo y que a una presión superior la oxidación está relacionada con el daño a la membrana celular. Por otro lado, se ha comprobado que un tratamiento de 800 MPa/10 °C/10 min es equivalente al tratamiento por calor a 80 °C durante 10 min y que la intensidad de presión es más importante que la duración del tratamiento para producir el mismo grado de oxidación (Dissing, Bruun-Jensen y Skibsted, 1997; Orlie, Hansen y Skibsted, 2000).

*Digestibilidad.* La API modula la actividad proteolítica de la carne, mejorando su calidad al incrementar el contenido de aminoácidos libres cuando se aplica un tratamiento entre 100 y 300 MPa (Ohmori, Shigehisa, Taji y Hayashi, 1991). La digestibilidad enzimática “*in vitro*” de las proteínas cárnicas se incrementó por la aplicación de 200 MPa/10 min (de Lamballerie-Anton, Delepine y Chapleau, 2002). Hugas, Garriga y Monfort (2002) señalaron que la digestibilidad de jamones tratados por presión es mejor que la de los no tratados y Han (2006) demostró que la digestibilidad de extractos de carne tratados a 200 MPa es mayor que la de los tratados por calor y adicionalmente, que la capacidad antigénica de los principales alérgenos de la carne disminuye al ser tratada por alta presión, dependiendo del grado de digestibilidad.

## **6. Efecto sobre los ovoproductos**

En 1914, Bridgman observó que la clara de huevo coagulaba al ser sometida a presiones entre 5 000 y 7 000 kg/cm<sup>2</sup>. Posteriormente, Hayashi *et al.* (1989) demostraron que el tratamiento de soluciones de albumen y yema de huevo con 4 000 kg/cm<sup>2</sup> a 25 °C durante 30 min inducía una gelificación menos severa que los tratamientos en agua a 100 °C durante 2-10 min. En el caso del albumen se obtuvieron geles más firmes a 6 000 kg/cm<sup>2</sup>, y la dureza se incrementó al aumentar la presión. Al aplicar presiones entre 400-800 MPa en presencia de NaCl y sacarosa, se incrementa la viscosidad de la ovoalbúmina, pero se retienen las propiedades espumantes y la gelificación por calor (Iametti, Donnizzelli, Pittia, Rovere, Squarcina y Bonomi, 1999). Lee, Heinz y Knorr (1999) no observaron coagulación de huevo entero líquido al ser tratado a 150 MPa por 60 min a 25 °C, pero al incrementar a 250 MPa y 45 °C la coagulación ocurrió casi instantáneamente.

*Textura y color.* Okamoto, Kawamura y Hayashi (1990) estudiaron las propiedades de los geles inducidos por presión entre 1 000 y 7 000 kg/cm<sup>2</sup> y los compararon con los de calor (100 °C/10 min). Obtuvieron geles firmes de albumen a 6 000 kg/cm<sup>2</sup> y de yema de huevo a 4 000 kg/cm<sup>2</sup>. Los geles de presión mantuvieron su color y sabor y fueron más suaves y brillantes o lustrosos que los de calor, además, fueron más elásticos e incrementaron la dureza al aumentar la presión aplicada. Por otro lado, Ibarz, Sangronis, Barbosa-Canovas y Swanson

(1999) observaron que la yema de huevo gelifica completamente a partir de 410 MPa mientras que el albumen requiere de 620 MPa para que la gelificación sea completa a temperatura ambiente, manteniendo la presión durante 20 minutos en ambos casos.

*Digestibilidad.* Hayashi *et al.* (1989) vieron que la digestibilidad de los geles de albumen y yema de huevo obtenidos por alta presión es igual o superior a la de los obtenidos por calor, sin destrucción de vitaminas o aminoácidos y sin la formación de compuestos como lisilalanina. El tratamiento de la ovoalbúmina a 400-800 MPa durante 10 min y la presencia de algunos aditivos aumenta notablemente la susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina como consecuencia del desdoblamiento de la molécula y se observa una disminución en el reconocimiento por anticuerpos específicos por lo que disminuye su capacidad antigénica (Iametti, Donnizzelli, Vecchio, Rovere, Gola y Bonomi, 1998).

## **7. Aplicaciones**

El uso de las altas presiones es una alternativa a los tratamientos térmicos clásicos para destruir los microorganismos, ya que permite procesar a temperatura ambiente o a bajas temperaturas. Causa la muerte de los microorganismos sin producir los cambios indeseables debidos al calentamiento y elimina el uso de conservante y otros aditivos con lo que se eleva la calidad de los alimentos. Como la presión se transmite instantáneamente a todo el sistema sin importar la forma y el tamaño, significa una gran ventaja y puede utilizarse para crear ingredientes con nuevas propiedades funcionales (Rastogi, Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjana y Knorr, 2007).

Los tratamientos por API permiten destruir los principales microorganismos patógenos y deteriorantes y reducir la actividad de algunas enzimas que son responsables del cambio de color de frutas y legumbres frescas. Este proceso permite pasteurizar zumos de frutas y bebidas alcohólicas y reducir notablemente los microorganismos causantes del deterioro. La duración de la conservación es prolongada y la calidad de los productos frescos se mantiene sin modificación de sus propiedades sensoriales. Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento por API reduce la alergenicidad de varios alimentos como carne (Suzuki, 2000),

manzanas (Scheibenzuber, Grim, Blümelhuber, Behrendt, Ring y Meyer-Pitroff, 2002) y suero de leche (Olsen, Kristiansen y Skibsted, 2003). La API ha venido a llenar un espacio dentro de la industria alimentaria y actualmente existen numerosos productos comercializados en el mundo (Tablas 13 y 14).

**Tabla 13. Productos comercializados de origen animal tratados por alta presión**

<b>PRODUCTOS CÁRNICOS</b>			
País y año	Producto	Tratamiento	Conservación
España 1998	Jamón cocido en lonchas y "tapas"	400 MPa/10 min/8 °C	2 meses a 7 °C
EUA 2001	Productos cocidos de carne de cerdo y jamón curado	N.D.	N.D.
EUA 2001	Productos de carne de ave, listos para su consumo	N.D.	N.D.
EUA 2001	Carne de pollo y bovino para "fajitas"	N.D.	21 días
España 2002	Lonchas de jamón cocido y serrano, productos de pollo	500 MPa/5-10min/8 °C	2 meses para los productos cocidos
Italia 2003	Jamón crudo curado, salami, mortadela y tocino	500 MPa /10 min/7°C	N.D.
Japón 2005	Jamón ahumado, productos cocidos de cerdo	600 MPa /5 min	1 mes
Alemania 2005	Jamón crudo curado	600 MPa/2 min	N.D.
<b>PRODUCTOS DE PESCADO Y MARISCOS</b>			
EUA 1999	Ostras y salsa de ostras	200-350 MPa/1-2 min	10 a 15 días
Japón 2000	Arenque	185 MPa/30 min/15 °C	1 año a -20 °C
Japón 2000	Salmón ahumado	400 MPa/10 min/15°C	3 semanas a 15 °C
EUA 2001	Ostras	240 MPa/90 s	N.D.
Australia 2002	Ostras	300 MPa/1 min	N.D.
Canadá 2004	Productos del mar	N.D.	N.D.
N. Zelanda 2004	Productos del mar	N.D.	N.D.
España 2004	Salmón y merluza	500 MPa	2 meses
Canadá 2004	Bogavante	275 MPa/1 min	N.D.
Italia 2004	Bacalao desalado	600 MPa	N.D.

Fuente: Chéret (2005). N.D.= Datos no disponibles

Tabla 14. Productos comercializados de origen vegetal tratados por alta presión

<b>PRODUCTOS BASADOS EN FRUTAS Y LEGUMBRES</b>			
Japón 1990	Mermeladas y salsas	400 MPa/10-30 min	2 a 3 meses a 4 °C
Japón 1994	“Mochi-yuomogi”	400 MPa/10 min/50 °C	3 meses a 4 °C
EUA 1999	Guacamole, aguacates en mitades, salsas	600 MPa/2-3 min/4 °C	1 mes a 4 °C
Japón 2000	Arroz hipoalergénico y arroz precocido	400 MPa	Temperatura ambiente
Italia 2001	Manzana, pera, fresa	600MPa/2-5 min/17 °C	1 a 2 meses
EUA 2002	Guacamole y productos de aguacate	N.D.	N.D.
México 2002	Guacamole y productos de aguacate	N.D.	N.D.
EUA 2003	Aros de cebolla	N.D.	45 días
Canadá 2003	Puré y salsa de manzana	N.D.	N.D.
EUA 2004	Productos de soja, “tofu”	N.D.	N.D.
España 2005	Preparado de legumbres listo para su consumo	500 MPa	1 mes
<b>ZUMOS DE FRUTAS Y BEBIDAS</b>			
Japón 1991	Zumo de uva	150-200 MPa/15-20 min/5 °C *	Varios meses a 20 °C
Japón 1992	Zumo de mandarina	400 MPa/1min/20 °C **	Un año a 20 °C-22 °C
Japón 1993	Sake	400 MPa/30 min/15 °C	6-12 meses, 4 °C
Francia 1994	Zumo de cítricos	400 MPa/1 min/20 °C	18 días a 4 °C
México 2000	Zumo de cítricos y mezcla de leche y zumo de frutas	500 MPa	N.D.
Líbano 2001	Zumo de frutas	500 MPa	1 mes
Inglaterra 2001	Zumo de cítricos y mezcla de leche y zumo de frutas	500 MPa/1 min **	21 días
EUA 2001	Zumo de manzana	N.D.**	N.D.
Portugal 2001	Zumo de manzana	450 MPa/20-90 s/ 12 °C	21 días
Italia 2001	Zumo de frutas y jugo de legumbres	600 MPa/3-5 min/ 17 °C	1 a 2 meses
Irlanda 2001	Zumo de cítricos y mezcla de leche y zumo de frutas	N.D.	21 días
EUA 2002	Zumo de naranja y de limón	N.D.*	21 días
Rep. Checa 2004	Zumo de manzana	N.D.	21 días

Fuente: Chéret (2005). \* Método directo.\*\* Método directo semi continuo. N.D.= Datos no disponibles

No hay ningún estudio que demuestre toxicidad de los productos tratados por alta presión. Sin embargo, ya que la API modifica la estructura de las proteínas, la actividad de algunas enzimas y ciertos enlaces moleculares, algunos

riesgos podrían surgir. Será necesario recopilar los estudios sobre toxicidad, capacidad antigénica, pérdida de digestibilidad y calidad nutricional de los productos para clarificar el rol de la API en relación a la toxicidad de los alimentos (Hugas *et al.*, 2002).

## 8. Equipos

La técnica de presurización consiste en aplicar una presión sobre un líquido que contiene el producto, envasado al vacío en un material flexible e impermeable, que será sometido al tratamiento. El equipo se compone de una cámara de acero resistente a la presión, un circuito de alta presión, un sistema de bombeo externo de compresión del fluido, una unidad de control y un dispositivo de calentamiento o enfriamiento (Figura 2).



**Figura 2. Equipo industrial de alta presión**

(Cortesía de N C Hyperbaric, España)

La generación de la presión se consigue mediante compresión directa o indirecta: en el primer sistema, la presión se genera directamente en el interior de la cámara por la compresión de un pistón sobre el medio de contacto, y su ventaja es que alcanza rápidamente las presiones elevadas, pero está limitado por el uso de cámaras de poco diámetro y problemas de estanqueidad. En la compresión indirecta, un intensificador o una bomba de alta presión envía un fluido hacia la cámara de presurización hasta alcanzar la presión deseada. Éste es el método

más utilizado en la industria alimentaria y es el que se empleó para los experimentos de esta tesis. La temperatura se controla por calentamiento eléctrico o mediante sistemas de intercambio de calor.

En 2006, unos ochenta y dos equipos con volúmenes entre 35 y 360 L instalados en empresas de varios países del mundo produjeron más de 100 000 t de productos presurizados (Knorr *et al.*, 2006). En términos de producción, la alta presión es un proceso por lotes, sin embargo, los equipos industriales permiten una producción semi-continua al ensamblar dos o tres equipos en serie. Los costos estimados de producción de los productos tratados por alta presión pueden observarse en la Tabla 15.

**Tabla 15. Costos de producción de tratamientos por alta presión**

VOLUMEN DE LA CÁMARA (L)	PRODUCCIÓN <sup>a</sup> (kg/h)	COSTO (€/kg)	PRODUCCIÓN <sup>b</sup> (kg/h)	COSTO (€/kg)
55	170	0.19	250	0.12
150	425	0.14	660	0.09
300	850	0.11	1325	0.07
600	2 000	0.09	3 100	0.05

Fuente: Chéret (2005). Cálculos basados en un factor de llenado de la cámara de un 50% y una duración media del tratamiento a 600 MPa de a) 3 min o b) 1 min

La efectividad del tratamiento por API está muy influida por las propiedades físicas y mecánicas del material del envase. Éste debe resistir las presiones de operación, tener buenas propiedades de sellado y la habilidad de prevenir el deterioro de la calidad de los alimentos durante la aplicación del tratamiento. Debe soportar una deformación del 15% a 600 MPa en la carne envasada al vacío y sus componentes no deben migrar hacia el producto. En general, las películas plásticas utilizadas en alimentos como el polietileno de baja densidad no se ven modificadas por presiones de 400 a 600 MPa (Le Bail, Hamadami y Bahuaud, 2006).

El nivel de aceptación de la API por los consumidores es del 74% en Alemania, 71% en Francia y 55% en el Reino Unido. El promedio de aceptación es de 67%, cercano al umbral del 60%, considerado como una indicación positiva



para esta nueva tecnología (Barbut, 2004). En la Tabla 16 se presenta una lista de los principales proveedores de equipo y componentes de alta presión.

**Tabla 16. Proveedores de equipos y componentes de alta presión**

EMPRESAS	URL*
Avure Technologies. Washington, USA.	<a href="http://www.avure.com">http://www.avure.com</a>
Autoclave Engineers. Pennsylvania, USA.	<a href="http://www.autoclaveengineers.com/">http://www.autoclaveengineers.com/</a>
Elmhurst Research, Inc. New York, USA.	<a href="http://www.elmhurstresearch.com/">http://www.elmhurstresearch.com/</a>
Engineered Pressure Systems, Inc. Massachusetts, USA.	<a href="http://www.epsi-highpressure.com/">http://www.epsi-highpressure.com/</a>
Harwood Engineering Company, Inc. Massachusetts, USA.	<a href="http://users.rcn.com/harwood.ma.ultranet/">http://users.rcn.com/harwood.ma.ultranet/</a>
High Pressure Equipment Company. Pennsylvania, USA.	<a href="http://www.highpressure.com/">http://www.highpressure.com/</a>
Kobelco (Kobe Steel Group). Japan.	<a href="http://www.kobelco.co.jp/english/index.html">http://www.kobelco.co.jp/english/index.html</a>
Mitsubishi Heavy Industries. Japan.	<a href="http://www.mhi.co.jp/e_hq/e_koatsu/04.html">http://www.mhi.co.jp/e_hq/e_koatsu/04.html</a>
NC Hyperbaric. Burgos, España.	<a href="http://www.nchyperbaric.com/">http://www.nchyperbaric.com/</a>
Resato International, B.V.Roden, The Netherlands.	<a href="http://www.resato.com/">http://www.resato.com/</a>
SITEC-Sieber Engineering A G. Zürich, Switzerland.	<a href="http://www.sitec-hp.ch/SITEC/Steri.htm">http://www.sitec-hp.ch/SITEC/Steri.htm</a>
Stansted Fluid Power, Ltd. Essex, United Kingdom.	<a href="http://www.sfp-4-hp.demon.co.uk/home.htm">http://www.sfp-4-hp.demon.co.uk/home.htm</a>
UHDE High Pressure Technologies GmbH. Hagen, Germany.	<a href="http://www.uhde-hpt.com/">http://www.uhde-hpt.com/</a>

Fuente: Chéret (2005). \*URL = Localizador uniforme de recursos en internet

## 9. Regulación

La legislación europea para los productos tratados por alta presión en la industria alimentaria está basada en el Reglamento CE 258/97 que entró en vigor el 15 de mayo de 1997. Antes de la comercialización, se requiere una autorización

---

---

para los nuevos alimentos o los nuevos ingredientes dentro de la UE. Esta normativa es obligatoria para la totalidad de los estados miembros y todo industrial debe presentar un expediente para su autorización según la recomendación del 27 de julio de 1997. Actualmente en España, si es posible demostrar que el nuevo producto es sustancialmente equivalente a alguno que se encuentre ya en el mercado, entonces se considera bajo la normativa nacional y el expediente deberá enviarse a la Unión Europea sólo como información (Hugas *et al.*, 2002).

En EUA, la reglamentación es mucho más favorable para el desarrollo de nuevos productos. Los dos organismos responsables de la autorización de comercialización de alimentos son: la FDA (Food and Drug Administration) y el FSIS (Food Safety and Inspection Service). La FDA autoriza la comercialización pero declina toda responsabilidad por lo que el industrial es el único garante y la FSIS exige simplemente que el tratamiento por API sea capaz de destruir *L. monocytogenes* en los platos cocinados o en los productos listos para consumir, basados en carne o ave (Chéret, 2005).

## **E. TRANSGLUTAMINASA**

### **1. Antecedentes**

Las transglutaminasas son una familia de proteínas presentes en la mayoría de los tejidos y fluidos extracelulares de los vertebrados (Wilhelm, Meinhardt y Seitz, 1996), e involucradas en varios procesos biológicos tales como: coagulación sanguínea, cicatrización de heridas, queratinización de la epidermis, endurecimiento de la membrana de los eritrocitos. El rol fisiológico de las TGasas parece ser muy diverso y varias enfermedades se han relacionado con deficiencia o sobreproducción de estas enzimas en el organismo humano (Aeschlimann y Thomazy, 2000).

Se identificaron por primera vez por Waelsch y colaboradores (Clarke, Mycek, Neidle y Waelsch, 1959) como enzimas del hígado capaces de incorporar aminos dentro de las proteínas y están ampliamente distribuidas en la naturaleza.

Se han encontrado en mamíferos, pescado, plantas y microorganismos (Fesus y Piacentini, 2002). Wilhelm *et al.* (1996) distinguieron varios tipos o isoformas de las transglutaminasas según la fuente de obtención y describieron los métodos de extracción y purificación así como la manera de determinar su actividad. La masa molecular de las diferentes isoformas determinadas por electroforesis (SDS-PAGE) y la fuente de obtención se presentan en la Tabla 17.

**Tabla 17. Masa molecular de las diferentes isoformas de transglutaminasa**

ENZIMA	MASA MOLECULAR (kDa)	FUENTE DE OBTENCIÓN
TGasa SECRETORIA	65-70	Próstata (cobaya, rata)
TGasa TISULAR	80-85	Hígado (cobaya, rata)
TGasa HEMOCÍTICA	86	Eritrocitos (hombre)
TGasa QUERATINOCÍTICA	92	Hígado, condrosarcoma (rata)
FACTOR XIIIa	80	Plaquetas, placenta, plasma (hombre)
TGasa EPIDÉRMICA (Proenzima)	78	Piel (cobaya, hombre)
TGasa EPIDÉRMICA (Enzima activa)	50	

Fuente: Wilhelm *et al.* (1996)

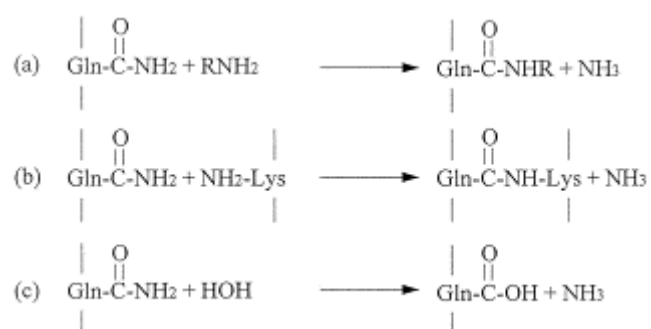
A principios de 1980, se llevaron a cabo los primeros experimentos en alimentos y se observó la posibilidad de modificar el comportamiento de proteínas de la leche y de la soja utilizando transglutaminasa extraída de hígado de cobaya y de plasma bovino (Ikura, Kometani, Sasaki y Chiba, 1980; Kurth y Rogers, 1984). Numerosas investigaciones demostraron que los enlaces cruzados formados mejoran varias de las propiedades funcionales de las proteínas como la capacidad emulsionante, la solubilidad y la gelificación, sin embargo, los altos costos y la poca disponibilidad de esas enzimas, limitaron su uso en la industria alimentaria (Motoki y Seguro, 1998).

La TGasa de hígado de cobaya fue la única fuente de enzima comercial durante varios años y Akamittath y Ball, Jr. (1992) observaron que la actomiosina obtenida de carne de pavo podía ser polimerizada a diferente pH y temperatura. Diversos investigadores intentaron obtener cantidades elevadas de enzima mediante la manipulación genética usando microorganismos huéspedes como

*Escherichia*, *Bacillus*, *Aspergillus* o *Saccharomyces*. No obstante, ninguna de esas transglutaminasas se comercializaron debido en parte a la baja aceptación o al poco rendimiento obtenido (Yokoyama, Nio y Kikuchi, 2004). Finalmente, la producción para uso industrial (Motoki *et al.*, 1990) fue posible con el aislamiento y purificación (Ando *et al.*, 1989) de una enzima secretada por un microorganismo taxonómicamente clasificado como una variante de *Streptoverticillium mobaraense* (Washizu *et al.*, 1994), actualmente denominado *Streptomyces mobaraense*. Esta enzima formó enlaces covalentes en las proteínas, propiedad fundamental de una transglutaminasa, y se denominó transglutaminasa microbiana (MTGasa) (Nonaka *et al.*, 1989).

## 2. Clasificación

La proteína-glutamina- $\gamma$ -glutamilttransferasa<sup>3</sup> (EC 2.3.2.13) conocida comúnmente como transglutaminasa (TGasa) (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992), cataliza la reacción de transferencia de grupos acilo entre el grupo  $\gamma$ -carboxiamida de un péptido ligado a un residuo de glutamina (donador de acilos) y una variedad de aminas primarias (aceptor de acilos), incluyendo el grupo amino de la lisina (Figura 3a).



**Figura 3. Reacciones de la transglutaminasa**

Fuente: Motoki y Seguro (1998)

<sup>3</sup> Transglutaminasa, transglutaminasa tisular, factor XIIIa, fibrinolisasa, factor estabilizante de la fibrina, glutaminilpéptido  $\gamma$ -glutamilttransferasa, poliamina transglutaminasa.

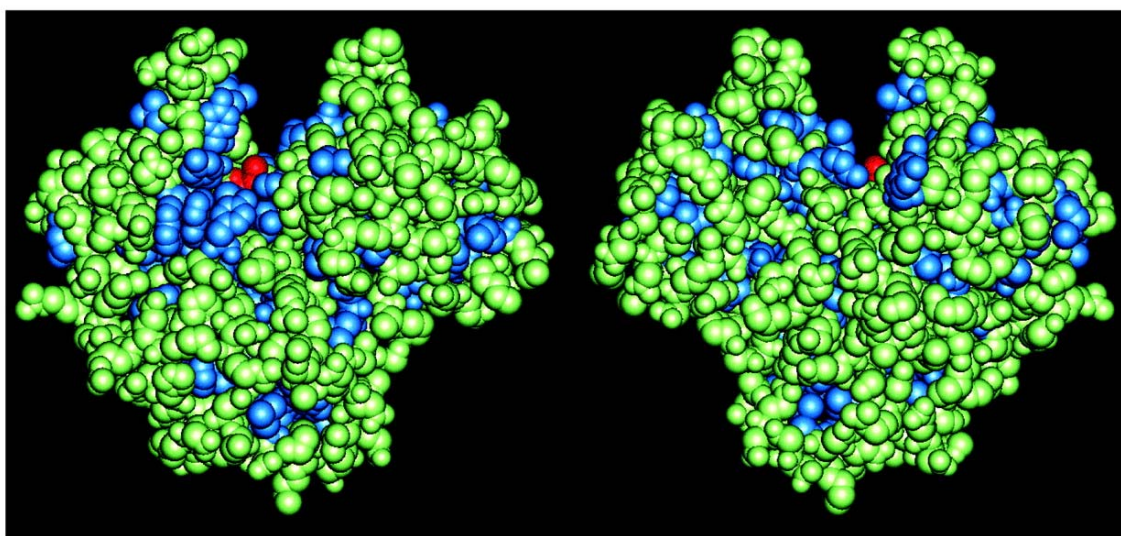
Cuando el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina es el sustrato, las cadenas de péptidos quedan unidas a través de enlaces covalentes  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina (G-L) (Figura 3b). En ausencia de sustratos con grupos amino, la TGasa cataliza la hidrólisis del grupo  $\gamma$ -carboxiamida del grupo glutaminil resultando en una desamidación (Figura 3c) (Yokoyama *et al.*, 2004).

### 3. Estructura de la MTGasa

La MTGasa es secretada en el medio de cultivo desde la membrana citoplásmica como un zimógeno y se activa por un proceso proteolítico (Pasternack, Dorsch, Otterbach, Robenek, Wolf y Fuchsbauser, 1998), por lo tanto, no requiere disrupción celular, su purificación es fácil y su comercialización ha sido rápida (Zhu, Bol, Rinzema y Tramper, 1995).

La MTGasa es una proteína simple, monomérica que consiste en 331 aminoácidos y su masa molecular calculada a partir de la composición de aminoácidos es de 37 863 Da (Kanaji *et al.*, 1993). La estructura cristalina de la MTGasa fue determinada por Kashiwagi *et al.* (2002). Forma un dominio compacto con una profunda hendidura en uno de los lados de la molécula, donde se encuentra el residuo catalítico de Cys<sup>64</sup> y no se encontró ninguna proteína similar a su estructura en las bases de datos (Figura 4). La estructura compacta de la MTGasa es totalmente diferente de la obtenida del plasma humano (F XIIIa) y de la de tipo tisular derivada de hígado de pescado (FTGasa), las cuales se parecen entre sí (Yee *et al.*, 1997; Noguchi, Ishikawa, Yokoyama, Ohtsuka, Nio y Suzuki, 2001).

En la estructura tridimensional de la TGasa FXIII, un residuo de Tyr restringe la accesibilidad del sitio activo y posiblemente los iones Ca<sup>2+</sup> causan un cambio estructural que libera al residuo de Tyr y permite que se forme el complejo intermedio acil-enzima. Sin embargo, en la MTGasa, la Cys<sup>64</sup> está suficientemente expuesta al solvente, por lo que reacciona rápidamente con el sustrato. Un estudio reciente de RMN revela que esta discrepancia entre los dos tipos de enzima, marca la diferencia en cuanto a la especificidad del sustrato y la velocidad de reacción (Shimba, Yokoyama y Suzuki, 2002).



**Figura 4. Modelo de Van der Waals de la transglutaminasa microbiana**

Fuente: Kashiwagi *et al.* (2002). Nota: Los residuos aromáticos e hidrofóbicos están coloreados en azul, la cisteína en rojo y los demás en verde

#### 4. Características

La MTGasa es estable en un amplio rango de pH, su pH óptimo está entre 5 y 8, sin embargo, a pHs 4 y 9 todavía expresa actividad enzimática. El pI de la MTGasa es 8.9. La temperatura óptima es de 55 °C a pH 6.0, pero mantiene completamente su actividad a 40 °C y conserva alguna actividad cerca del punto de congelación (Ando *et al.*, 1989). Se inactiva irreversiblemente a 80 °C después de 2 min a presión atmosférica (Menéndez, Rawel, Schwarzenbolz y Henle, 2006).

La MTGasa cataliza la formación de enlaces  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina en la mayoría de las proteínas como caseínas, globulinas de soja, gluten, proteínas de huevo, miosina, fibrina; sin embargo la cantidad de enlaces cruzados depende de la estructura macromolecular de cada sustrato (Dickinson, 1997). Los residuos de glutamina residen en regiones flexibles de la cadena polipeptídica o en regiones con giros  $\beta$  o inversos, por lo que las caseínas son excelentes sustratos (Nio, Motoki y Takinami, 1986). Sin embargo, se ha publicado ampliamente que las proteínas globulares como la ovoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina no son atacadas

por la transglutaminasa en su estado nativo. La susceptibilidad de las proteínas globulares a la inducción de enlaces cruzados puede incrementarse de varias maneras: por modificación química, por ruptura de enlaces disulfuro, por conversión al estado de glóbulo fundido o por adsorción en la interfase aceite-agua (Dickinson, 1997).

Por definición, las transglutaminasas requieren  $\text{Ca}^{2+}$  para expresar su actividad enzimática (Folk y Chung, 1985), sin embargo, la MTGasa es totalmente independiente (Motoki *et al.*, 1990). Esta característica es muy útil en la modificación de las propiedades funcionales de las proteínas, debido a que muchas proteínas presentes en los alimentos como caseínas, globulinas de soja y miosina, son susceptibles y precipitan fácilmente en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nakahara, Nozawa y Seki, 1999; Matsumura, Lee y Mori, 2000). Otros cationes como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Li}^+$  inhiben con fuerza su actividad y  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  la inhiben moderadamente, posiblemente porque se ligan al grupo tiol de la Cys<sup>64</sup>. Sin embargo,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  no afectan la actividad enzimática (Tsai, Lin y Jiang, 1996).

## 5. Biodisponibilidad

Kumazawa, Sakamoto, Kawajiri, Seguro y Motoki (1996) encontraron que los enlaces  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina ocurren de forma natural en huevos de varias especies de pescado como salmón, arenque y sardina. Sakamoto, Kumazawa, Kawajiri y Motoki (1995) realizaron un análisis cuantitativo de enlaces G-L en 127 alimentos frescos y procesados y encontraron elevadas concentraciones en pescado, crustáceos, carnes, aves y soja, sin embargo, no se hallaron en la leche y productos lácteos, debido posiblemente a la presencia de un péptido inhibidor de la actividad de la TGasa que sí se encuentra en la leche, tanto de bovino, de cabra, de oveja como humana (de Jong, Wijngaards y Koppelman, 2003). La mayor cantidad de enlaces G-L se observó en alimentos procesados como “kamaboko”, jamón, pollo frito, cerdo asado y hamburguesas. Es común que la TGasa endógena forme enlaces cruzados durante el cocinado, ya que muchos organismos contienen TGasa en sus órganos y tejidos y la velocidad de calentamiento es muy lenta, lo que permite que la enzima actúe antes de ser inactivada por altas temperaturas. El calentamiento induce la formación de

---

---

enlaces cruzados G-L como consecuencia de la deshidratación de los grupos  $\gamma$ -carboxilo de la glutamina y  $\epsilon$ -amino de la lisina (Gerrard, 2002), por lo que si el hombre los ha ingerido desde el descubrimiento del fuego y el cocinado de los alimentos, se puede considerar que su consumo es seguro (Motoki y Seguro, 1998).

Después de la ingestión de proteínas con enlaces G-L, las enzimas digestivas de los mamíferos rompen los polipéptidos en aminoácidos, pero mantienen los dipéptidos G-L intactos que se absorben en las paredes intestinales y transportan al hígado, donde se metabolizan por dos enzimas que degradan los enlaces: la  $\gamma$ -glutamil-transferasa (EC 2.3.2.2) y la  $\gamma$ -glutamil-ciclotransferasa (EC 2.3.2.4), generando lisina libre. Varios investigadores han demostrado en experimentos realizados en ratas que la lisina proveniente de los enlaces cruzados se incorpora a los tejidos y se aprovecha por el organismo (Friedman y Finot, 1990; Seguro, Kumazawa, Kuraishi, Sakamoto y Motoki, 1996).

La MTGasa también es capaz de incorporar aminoácidos o péptidos a sustratos de proteínas lo cual puede aumentar el valor nutricional de los alimentos porque los aminoácidos o dipéptidos incorporados covalentemente se comportan como aminoácidos endógenos (Nonaka, Matsuura y Motoki, 1996). Sorensen, Rasmussen y Petersen (1999) comprobaron que la metionina puede incorporarse a la caseína así como la lisina y las proteínas de la soja al gluten de trigo. También la lisilmetionina o la lisinarginina pueden ser añadidas a la caseína para contrarrestar la deficiencia de metionina o arginina (Yokoyama *et al.*, 2004).

## 6. Alergenicidad

Como ya se sabe, la utilización de nuevas proteínas en la elaboración de alimentos puede aumentar el riesgo de inducir reacciones alérgicas en individuos sensibles o susceptibles a ser sensibilizados por la proteína introducida. Por tanto, todas las proteínas nuevas deben evaluarse antes de su introducción en el mercado. Yamauchi, Uenikawa, Enomoto, Tanimoto, Oohata y Motoki (1991) desarrollaron un método para reducir la alergenidad de algunos péptidos y proteínas alimentarias que actúan como alérgenos, al ser tratados con la enzima. En 2004, tanto Pedersen *et al.* como Poulsen investigaron la posible alergenidad



de la MTGasa derivada de *Streptomyces mobaraense* y concluyeron que no hay ningún problema de seguridad con el potencial alergénico de la MTGasa. Sin embargo, Gerrard y Sutton (2005) consideran que la adición de MTGasa a productos de cereales puede generar el epítotope responsable de la enfermedad celíaca.

## **7. Aplicaciones en el procesamiento de alimentos**

La estructura y propiedades de la MTGasa le confieren importantes características que la hacen muy ventajosa para su utilización en la industria alimentaria:

- amplio intervalo de pH
- temperatura de actividad baja y media
- alta velocidad de reacción
- baja masa molecular
- independencia de  $\text{Ca}^{2+}$
- menor especificidad de sustrato
- menor actividad para la desamidación

La MTGasa puede establecer enlaces cruzados con un abanico más amplio de proteínas que el que presentan las TGasas obtenidas de mamíferos (de Jong, Wijngaards, Boumans, Koppelman y Hessing, 2001). Actualmente, la MTGasa se utiliza ampliamente para mejorar las propiedades físicas de muchos alimentos ricos en proteínas como carne, pescado, lácteos, productos de panadería o de soja, etc. (Kuraishi *et al.*, 2001; Pszczola, 2002), y se encuentra incluida en el inventario de coadyuvantes de elaboración (ICE) del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC) del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias (Comisión del Codex Alimentarius, 2006).

### ***Carne y productos cárnicos***

La reestructuración de la carne fresca ha sido una de las principales aplicaciones iniciales de las TGasas (Paardekooper y Wijngaards, 1988). La MTGasa puede reestructurar cortes de carne de bajo costo de varias especies y

---

---

mejorar su valor en el mercado de productos procesados (Lee y Park, 2003). Una combinación de MTGasa y caseinato forma una masa viscosa que liga las piezas de carne de cerdo sin necesidad de utilizar sal ni calor (Kuraishi, Sakamoto, Yamazaki, Susa, Kuhara y Soeda, 1997). Otros ingredientes como una mezcla de gelatina y proteínas de soja se han utilizado junto con la MTGasa para unir piezas de salchichas (Soeda, Hokazono, Ozawa y Fujiwara, 2005).

La capacidad de la miosina de formar un gel después de la adición de TGasa es un factor importante en la preparación de jamón y salchichas (Kuraishi, Sakamoto y Soeda, 1998). Varios investigadores han estudiado el efecto de la concentración de enzima, de sal y de fosfatos en las características de los productos. Pietrasik y Li-Chan (2002b) observaron el efecto de la concentración de sal y MTGasa sobre el color y la textura de los geles de carne de cerdo producidos por calor, y Soeda, Kasagi, Hokazono, Yamazaki y Muguruma (2006) encontraron un mayor número de enlaces cruzados al aumentar las concentraciones de MTGasa en presencia de polifosfatos y un bajo nivel de sal en geles de carne, sin embargo, Hammer (1998) concluyó que no existe interacción entre la enzima y los polifosfatos. Muguruma *et al.* (2003) observaron una mejor textura en salchichas de pollo mediante la adición de MTGasa, soja y proteínas séricas inclusive a reducidos niveles de fosfatos y Kilic (2003) mejoró las características de “kebab” de pollo al añadir MTGasa y caseinato de sodio.

Se han utilizado diversos ingredientes no cárnicos en combinación con la enzima para modificar las características de textura y retención de agua en diversos productos: caseinatos (Kilic, 2003; Pietrasik y Jarmoluk, 2003; Carballo, Ayo y Colmenero, 2006), carragenatos (Pietrasik y Li-Chan, 2002; Pietrasik, 2003; Verbeken, Neirinck, van der Meeren y Dewettinck, 2005), soja (Tsao, Kao, Hsieh y Jiang, 2002; Muguruma *et al.*, 2003), albumen de huevo (Pietrasik, 2003), nueces (Cofrades, Ayo, Serrano, Carballo y Jiménez Colmenero, 2006) o manzana deshidratada (Lantto, Plathin, Niemisto, Buchert y Autio, 2006). También se han usado otras proteínas de origen animal como surimi (Dondero, Figueroa, Morales y Curotto, 2006), lomo de cerdo de baja calidad o jamón (Chin y Chung, 2003; Katayama, Chin, Yoshihara y Muguruma, 2006) y plasma sanguíneo (Jarmoluk y Pietrasik, 2003).

La MTGasa se ha empleado en productos elaborados con carne de cerdo, bovino, pollo y cordero, sin embargo, se ha demostrado que la eficiencia de la enzima varía con la especie animal (Carballo *et al.*, 2006). Mediante la adición de MTGasa se mejora la estabilidad de las emulsiones proteicas tipo aceite en agua, se incrementa la capacidad emulsionante de los homogeneizados de pollo (Ruiz-Carrascal y Regenstein, 2002) y las características de carne pálida, blanda y exhudativa (PSE) pueden contrarrestarse (Milkowski y Sosniki, 1999).

### ***Pescado y pastas de pescado***

Se sabe que la transglutaminasa se encuentra ampliamente distribuida en el músculo de pescado, sin embargo, su actividad varía dependiendo de la especie (Tsukamasa, Miyake, Ando y Makinodan, 2002). Seki *et al.* (1990) encontraron que la transglutaminasa endógena del pescado causa el fenómeno conocido como “suwari” que consiste en el endurecimiento de la pasta de proteína de pescado (surimi) a baja temperatura debido a la formación de enlaces cruzados. Actualmente no hay duda de que tanto la TGasa endógena como la MTGasa exógena mejoran la eficacia de la materia prima para formar geles de pescado, sin embargo, la formación de isopéptidos en los geles de surimi durante el “suwari” difiere cuando es catalizado por una u otra enzima (Sato *et al.*, 2001).

La mayoría de las investigaciones del uso de la MTGasa en la industria pesquera están relacionadas con la producción de surimi (Asagami, Ogiwara, Wakameda y Noguchi, 1995; Dondero, Curotto y Figueroa, 2002). Asimismo, la adición de enzima es útil para la obtención de productos reestructurados de pescado o para mejorar el proceso y minimizar las pérdidas de materia prima en el tratamiento de filetes de pescado (Ramírez, Uresti, Téllez y Vázquez, 2002; Téllez-Luis, Uresti, Ramírez y Vázquez, 2002; Armbrust, Werlein y Watkinson, 2003). No obstante, también se pueden provocar algunos efectos negativos en las propiedades mecánicas y en el color de los geles al combinar la enzima con pectinas de bajo metoxilo (Uresti, Ramírez, López-Arias y Vázquez, 2003).

### ***Productos lácteos***

Las caseínas son particularmente buenos sustratos para la MTGasa (Faergemand, Sorensen, Jorgensen, Budolfsen y Qvist, 1999; O'Connell y de

Kruif, 2003), en cambio, las proteínas del suero tienden a ser menos eficientes en la formación de los enlaces cruzados debido a su estructura globular (Sharma, Zakora y Qvist, 2002) y, en un sistema mixto como la leche, las caseínas forman enlaces cruzados preferentemente con las proteínas séricas (Han y Damodaran, 1996). Estas últimas requieren alguna modificación para poder formar enlaces cruzados entre ellas y las caseínas (Lorenzen, 2000).

La inclusión de MTGasa acelera la velocidad de formación de los geles de caseína, y les proporciona una mayor viscoelasticidad en relación con los geles obtenidos por acidificación o por renina (Flanagan, Gunning y Fitzgerald, 2003). Cuando la enzima se aplica a productos lácteos es posible mejorar la fuerza del gel, las propiedades mecánicas y la capacidad de retención de agua, aumentar la viscosidad, la estabilidad, la coagulación enzimática y disminuir la permeabilidad de los geles (Özrenk, 2006). Las características de los geles formados por caseína o leche desnatada están fuertemente influenciadas por la concentración de enzima y la formación excesiva de enlaces inter e intramoleculares puede potenciar polímeros demasiado largos que impiden el desarrollo de la red (Truong, Clare, Catignani y Swaisgood, 2004).

Uno de los mayores campos de aplicación de la MTGasa es la elaboración de yogurt, ya que disminuye la sinéresis e incrementa la fuerza del gel (Lorenzen, Mautner y Schlimme, 1999; Lauber, Henle y Klostermeyer, 2000; Imm, Lian y Lee, 2000). También se aplica en la producción de queso a partir de proteínas del suero de leche (Soeda, 2000) o leche entera (Kuraishi, Sakamoto y Soeda, 1997). El campo potencial de aplicación de la enzima en la industria láctea incluye la estabilización de productos como nata batida y la preparación de caseinatos con enlaces cruzados como ingredientes funcionales (Lorenzen, Schlimme y Roos, 1998).

### ***Productos de soja***

Las proteínas de la soja, tales como globulinas 11S y 7S, son buenos sustratos para la MTGasa (Nonaka, Toiguchi, Sakamoto, Kawajiri, Soeda y Motoki, 1994). La formación de biopolímeros de la proteína 11S con las proteínas séricas mejoran su estabilidad térmica (Yildirim y Hettiarachchy, 1997). La adición

de enzima mejora la suave textura del “tofu” y evita la pérdida de agua durante la esterilización posterior para prolongar su vida útil (Nonaka, Sakamoto, Toiguchi, Yamagiwa, Soeda y Motoki, 1996; Kwan y Easa, 2003).

### ***Productos de trigo***

Las proteínas del gluten de trigo determinan las propiedades de la masa panaria y juegan un rol predominante en la calidad del pan. Los puentes disulfuro presentes refuerzan la red del gluten lo cual es beneficioso para la calidad de las hogazas de pan (Kaufman, Hosney y Fennema, 1986). También en este caso, la MTGasa favorece la formación de polímeros de alta masa molecular que modifican las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento reológico de la masa (Mujoo y Ng, 2003). Después de la adición de la enzima, se observa un incremento en la cantidad de enlaces cruzados, en la formación de gluteninas de alta masa molecular y en el volumen de la masa de pan y de bollos, asimismo, se mejoran las características del horneado en harinas de gluten débil (Gerrard, Fayle, Brown, Sutton, Simmons y Rasiah, 2001; Bauer, Koehler, Wieser y Schieberle, 2003).

### ***Películas comestibles***

A partir de proteínas de leche, soja, pectina, colágeno o mezclas entre sí, se han desarrollado películas comestibles muy resistentes (Mariniello, Di Pierro, Esposito, Sorrentino, Masi y Porta, 2003; Oh, Wang, Field y Aglan, 2004). Takagaki, Narakawa y Uchio (1991) han propuesto un método para la conservación de frutas y vegetales mediante el recubrimiento con una membrana conteniendo diversas proteínas y MTGasa.

### ***Otras aplicaciones no alimentarias***

La MTGasa tiene aplicaciones interesantes en otros campos como la industria textil al incrementar la fuerza de la fibra y reducir el encogimiento de la lana (Cortez, Bonner y Griffin, 2004); la industria peletera para producir pieles más resistentes (Marmer, Brown, Taylor y Cabeza, 2001); la industria farmacéutica en el desarrollo de un material que promueve la absorción de minerales para la

---

---

formulación de suplementos alimenticios (Noguchi, Tanimoto y Mori, 1992), y en la producción de películas fotográficas (Reiner, Pasternack y Zotzel, 2006).

## 8. MTGasa y alta presión

A pesar de que las aplicaciones de la MTGasa son muy amplias y están bien documentadas, existen pocos estudios sobre su efecto en alimentos tratados por alta presión. Los trabajos realizados por Nonaka, Ito, Sawa, Motoki y Nio (1997) sobre la aplicación de MTGasa y API revelaron su efectividad al acelerar la reacción de transferencia de grupos acilo entre dimetil caseína y monodansil cadaverina con tratamientos de 200-600 MPa durante 30 min. La incorporación de esta última a algunas proteínas ocurre cuando la enzima y la cierta presión se aplican al sustrato como pre-tratamiento.

Lauber, Noack, Klostermeyer y Henle (2001b) observaron que la MTGasa exhibe una gran estabilidad por encima de 400 MPa a 60 °C en solución tampón y Lee y Park (2002) demostraron que mantiene un 60% de su actividad inicial aún después de la presurización a 600 MPa a 60 °C durante 60 min, indicando que es más resistente a la presión que otras enzimas. Recientemente, Menéndez *et al.* (2006) estudiaron la actividad de la MTGasa entre 40 °C y 80 °C sometida a presión. A 600 MPa, la enzima mostró un 50% de su actividad después de 12 min a 40 °C. Estas condiciones provocaron la pérdida de estructura terciaria y una disminución en el contenido de hélices  $\alpha$ . Los autores concluyeron que el centro activo de la enzima es resistente a la alta presión, y que la inactivación es causada por la destrucción de hélices  $\alpha$  lo cual influye en la estabilidad de la enzima en solución. La inactivación irreversible de la enzima se alcanzó después de 2 min a 80 °C a presión atmosférica.

En los últimos años, las investigaciones realizadas sobre la MTGasa combinada con API se han enfocado principalmente al estudio de los efectos de la enzima sobre las proteínas miofibrilares y productos de pescado, así como sobre leche y productos lácteos. La Tabla 18 resume los principales trabajos sobre el tema.

### ***Leche***

Lauber, Noack, Klostermeyer y Henle (2001a) observaron la oligomerización de  $\beta$ -lactoglobulina en presencia de MTGasa a 400 MPa/40 °C. El número de enlaces cruzados fue menor cuando la enzima se añadió después de la presurización y no se detectó ningún oligómero cuando la proteína se incubó con la enzima a presión atmosférica. Esto demuestra que las proteínas globulares, que normalmente no son afectadas por la MTGasa, pueden modificarse durante el tratamiento de API y la enzima. Asimismo, se advirtió la formación de heterólogos entre  $\beta$ -lactoglobulina y  $\beta$ -caseína bajo las mismas condiciones (Lauber, Krause, Klostermeyer y Henle, 2003).

Las micelas de caseína en leches tratadas con la enzima fueron más resistentes a la alta presión y a la hidrólisis por plasmina (O'Sullivan, Kelly y Fox, 2002). En un estudio con leche acidificada, se apreció un incremento notable en la firmeza del gel debido al aumento de enlaces cruzados entre las proteínas séricas y la caseína, cuando la acción de la MTGasa se dio en condiciones de alta presión (Anema, Lauber, Lee, Henle y Klostermeyer, 2005).

### ***Pescado***

Las pastas de surimi pueden formar geles muy fuertes a baja temperatura, debido a la polimerización de la miosina mediante la formación de enlaces covalentes no disulfuro, que es catalizada por la transglutaminasa endógena de pescado (Kimura, Sugimoto, Toyoda, Seki, Arai y Fujita, 1991; Kamath, Lanier, Foegeding y Hamann, 1992). El proceso tradicional de elaboración de los geles de surimi, se lleva a cabo en dos etapas: la primera, es la formación de un gel translúcido y elástico a temperaturas menores de 40 °C, fenómeno conocido como “setting” y una segunda etapa de calentamiento por encima de 80 °C, lo que produce un gel más fuerte y elástico. Sin embargo, este tratamiento térmico promueve la pérdida de calidad del producto (de Jong y Koppelman, 2002). Como la API puede inducir la gelificación a bajas temperaturas (Ohshima, Ushio y Koizumi, 1993) se utiliza en la producción de geles de surimi y se ha descrito que éstos resultan más suaves, más elásticos y sensorialmente superiores a los producidos por calor (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Canovas, 2004).

Tabla 18. Estudios realizados sobre transglutaminasa combinados con alta presión

FUENTE	TRATAMIENTOS	EFEECTO	REFERENCIA
<b>VARIAS PROTEÍNAS</b>			
Seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, lisozima y $\gamma$ -globulina	+MTGasa 200 400 o 600 MPa/ 40 °C/30 min	Transferencia de acilo e incorporación de MDC a proteínas globulares	Nonaka, 1997
Pechuga de pavo	+MTGasa 250 o 300 MPa/4 °C, 40 °C o 50 °C/15 min	Presión a 40 °C-50°C incrementa la fuerza de los geles, pero no a 4 °C	Ashie, 1999
<b>LÁCTEOS</b>			
$\beta$ -Lactoglobulina	+MTGasa 400 MPa/40 °C/60 min	Oligomerización de $\beta$ lactoglobulina	Lauber, 2001
Leche desnatada de bovino	+ MTGasa/6 °C/24 h 600 MPa/20 °C/20 min	Micelas de caseína resistentes a API y a la hidrólisis por plasmina	O'Sullivan, 2002
$\beta$ -lactoglobulina y $\beta$ -caseína	+MTGasa 400 MPa/40 °C/90 min	Formación de compuestos heterólogos	Lauber, 2003
Geles ácidos de leche desnatada	+ MTGasa bajo presión 400 MPa/40 °C/0-120 min	Incremento en la firmeza del gel	Anema, 2004
<b>PESCADO</b>			
Surimi	TGasa endógena 300 MPa/5 °C/30-120min previo al setting	Desnaturalización de la miosina y formación de enlaces disulfuro	Gilleland, 1997
Surimi	+ MTGasa 300 MPa/4 °C/15 min previo al setting Calor 90 °C/20 min	Formación de enlaces cruzados durante la incubación e incremento de la fuerza del gel	Ashie, 1999
Pasta de pescado	TGasa endógena + extracto de romero 300 MPa/25 °C/15 min posterior al setting	Mejora la elasticidad y disminuye la dureza del gel y la oxidación de los lípidos	Pérez Mateos, 2002
Pasta de pescado	TGasa endógena 300 MPa/25 °C/15 o 120 min posterior al setting	Geles más fuertes y con una red más densa y homogénea.	Montero, 2005
Proteínas miofibrilares	+MTGasa + quitosan 300 MPa/25 °C/15 min previo o posterior al setting	Induce geles más fuertes y deformables. Evita la oxidación de lípidos	Gómez-Guillén, 2005
Pasta de pescado	+MTGasa y setting 600 MPa/25 °C- 40 °C/15 min Calor a 90 °C/15 min o 60 °C/30 min y posterior tratamiento a 90 °C/15 min	Mejora las propiedades mecánicas de los geles tratados con MTGasa y sometidos al setting	Uresti, 2006



Las primeras investigaciones sobre las TGAsas endógenas de pescado sometidas a API fueron realizadas por Shoji, Saeki, Wakameda y Nonaka (2004), quienes consideraron que la transglutaminasa del músculo de pescado era inactivada en su mayor parte por el tratamiento a 300 MPa/0 °C/10 min y no podía estar involucrada en la gelificación por alta presión ni en la formación del gel posterior al tratamiento. Sin embargo, estudios llevados a cabo por Gilleland, Lanier y Hamann (1997) en pastas de surimi a 300 MPa/5 °C/30 min demostraron lo contrario. En los geles inducidos por presión se observó la desnaturalización de la miosina y la formación de enlaces disulfuro, pero no hubo polimerización. Durante la incubación a 25 °C ocurrió la polimerización de miosina que provocó un notable incremento en la fuerza del gel, aun cuando la incubación se realizó después del tratamiento con presión. Esta combinación de tratamientos aumentó la fuerza de los geles notablemente cuando se calentaron y se pensó que la enzima era la responsable de la gelificación del surimi a 25 °C. Ashie y Lanier (1999) demostraron que el tratamiento de 250-300 MPa aplicado a las proteínas musculares de pescado y de pavo produce sustratos más accesibles a la MTGasa, mejorando la formación de enlaces cruzados intermoleculares y, por tanto, la fuerza del gel. Por otro lado, muchas proteínas de especies marinas muestran una degradación durante el calentamiento, fenómeno denominado “modori” y ampliamente estudiado en la manufactura de “kamaboko”, un producto tradicional japonés que se deriva del surimi. La miosina es el principal sustrato para las proteasas, enzimas termoestables responsables de esta pérdida de calidad, pero su actividad proteolítica disminuye al incrementar la presión (Ashie, Simpson y Ramaswamy, 1996).

La literatura acerca de la actividad de la TGasa endógena en geles inducidos por API es escasa. Pérez-Mateos, Gómez-Guillén, Hurtado, Solas y Montero (2002) indicaron que en geles de pescado inducidos por presión la elasticidad incrementó y la dureza disminuyó cuando el “setting” se llevó a cabo a 25 °C durante 2 h antes del tratamiento a 300 MPa/25 °C/15 min.

La actividad residual de la enzima endógena de pescado picado se redujo sustancialmente en geles obtenidos mediante la presurización (300 MPa/25 °C/15 min) al incubarlo a 25 °C previamente durante dos horas a presión atmosférica (Montero, López-Caballero, Pérez-Mateos, Solas y Gómez-Guillén, 2005). La

---

---

adición de MTGasa y quitosan en las mismas condiciones, induce geles más fuertes y deformables y reduce la oxidación de los lípidos, comparados con aquellos que sólo fueron presurizados o en los que la presurización se llevó a cabo antes de la incubación (Gómez-Guillén, Montero, Solas y Pérez-Mateos, 2005).

Con el objeto de incrementar el valor comercial de algunas especies de pescado, se ha propuesto utilizar la MTGasa a bajas temperaturas en combinación con API en productos reestructurados. Los resultados muestran que la presión mejora las propiedades mecánicas de los geles de pasta de pescado adicionados con MTGasa e incubados a 25 °C, ya que los incubados a 40 °C parecen inducir la degradación proteolítica de las proteínas miofibrilares (Uresti, Velazquez, Vázquez, Ramírez y Torres, 2006).

## ***F. MECANISMOS DE GELIFICACIÓN***

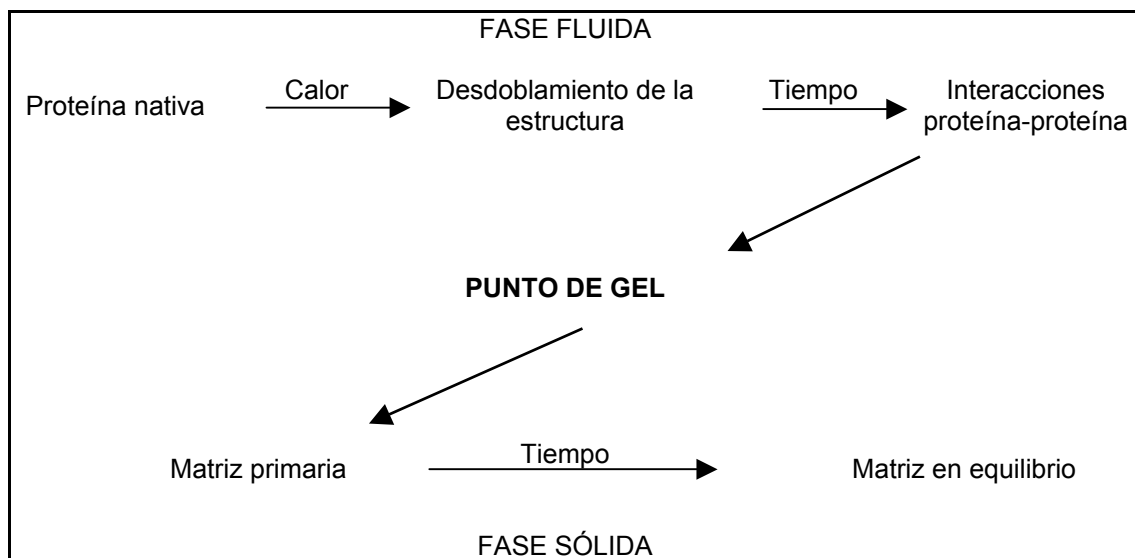
La gelificación es una de las propiedades funcionales más importantes de los componentes de los alimentos ya que muchos de ellos son geles proteicos. Comprender los cambios estructurales de las proteínas, así como su mecanismo durante la formación del gel, nos permite utilizar los ingredientes adecuadamente y elaborar productos con las características deseadas (Wang y Smith, 1994b).

Almdal, Dyre, Hvidt y Kramer (1993) definieron gel como un sólido suave, o material similar a un sólido que consiste de dos o más componentes, uno de los cuales es un líquido en cantidad sustancial que no exhibe fluidez bajo su propio peso, en una escala de tiempo en segundos. La formación de un gel se debe a un fenómeno de agregación proteica en el cual existe un balance entre las fuerzas de atracción y repulsión, de tal manera que se forma una matriz tridimensional, capaz de atrapar una considerable cantidad de agua (Hermansson, 1978). Si las fuerzas de atracción predominan, se formará un coágulo y el agua es expelida de la matriz y si las fuerzas repulsivas prevalecen, no se formará el gel.

Se han propuesto varios modelos para explicar el fenómeno de gelificación, que es básicamente un proceso en dos etapas: 1) cambio estructural o

desnaturalización de la proteína, y 2) asociación gradual o agregación de la proteína individual (Matsumura *et al.*, 2000). Un esquema generalizado de la gelificación propuesto por Foegeding y Hamman en 1992, basado en los modelos más aceptados, se muestra en la Figura 5.

El proceso de desnaturalización produce cambios en la estructura y funcionalidad y por lo tanto afecta al tipo de geles formados de acuerdo al mecanismo de inducción del gel (Galazka *et al.*, 2000; Ledward, 2000). La gelificación puede ser inducida físicamente por temperatura o alta presión, o bien, químicamente mediante la acidificación, la adición de sales, urea o enzimas (Totosaus, Montejano, Salazar y Guerrero, 2002).



**Figura 5. Esquema general de la gelificación de proteínas**

Fuente: Foegeding y Hamman (1992)

### 1. Gelificación inducida por calor

Ferry (1948) propuso una interpretación del mecanismo de gelificación: en primer lugar, al desdoblamiento de las moléculas provocado por el calor sigue una etapa en la cual las reacciones de asociación y agregación dan lugar a un gel, que sólo se forma en unas condiciones del entorno adecuadas. Es importante que la velocidad del segundo paso sea inferior a la del primero para que la agregación de las proteínas sea lo suficientemente ordenada que permita la gelificación. La

---

---

firmeza de los geles está relacionada con la masa molecular así como con el tamaño y forma de los polipéptidos que conforman la red. Wang y Damodaran (1990) señalaron que la masa molecular crítica de las proteínas globulares para la gelificación es próxima a 23 kDa. Las fuerzas químicas involucradas en la formación de la red proteica son principalmente interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas y menos frecuentemente enlaces covalentes como los enlaces disulfuro.

*Hidrofobicidad.* Los grupos hidrofóbicos juegan un rol importante en la formación de un gel. Los aminoácidos no polares se agrupan formando un núcleo hidrofóbico rodeado de una capa de residuos polares en contacto con el solvente, generalmente agua. Las interacciones hidrofóbicas son una consecuencia de las fuertes interacciones entre las moléculas de agua del entorno, más que de las interacciones directas de residuos no polares de las proteínas (Nakai *et al.*, 1984). Varios estudios han encontrado un incremento de la hidrofobicidad en el primer paso (desdoblamiento) y una disminución en el segundo (agregación) (Nakai, 1983; Wicker, Lanier, Hamann y Akahane, 1986). Chan, Gill y Paulson (1992) observaron que las superficies hidrofóbicas expuestas a un entorno polar promovían la formación de una red. La hidrofobicidad media afecta el proceso de formación del gel. Las proteínas que contienen más de 31.5% molar de aminoácidos no polares forman geles tipo coágulo, mientras que aquellas que contienen menos de esa cantidad, producen geles tipo translúcido (Shimada y Matsushita, 1980). También la secuencia de aminoácidos y la estructura resultante debe tenerse en cuenta en la asociación de las proteínas. En la proteína desdoblada influye más la carga neta de hidrofobicidad mientras que en la proteína nativa es el promedio de hidrofobicidad de cada aminoácido.

*Interacciones electrostáticas.* Las interacciones electrostáticas se favorecen por cambios en el pH y la fuerza iónica, afectando las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente. A pH cercano al pI, las proteínas precipitan fácilmente como resultado de la rápida y desordenada agregación, y a pH alejado, las fuerzas repulsivas predominan por lo que la agregación no ocurre. En regiones intermedias, entre pI y pH extremos, las fuerzas repulsivas electrostáticas y las atracciones hidrofóbicas están bien balanceadas y permiten la formación de la red. Aun en condiciones de pH alejado del pI, las sales protegen el exceso de

cargas en la superficie de las moléculas y permiten a las proteínas asociarse para formar una red fina. Sin embargo, a pH intermedio, la presencia de sales rompe el balance de las fuerzas atractivas y repulsivas permitiendo la formación de grandes agregados o coágulos (Matsumura y Mori, 1996).

*Puentes de hidrógeno.* La participación de los puentes de hidrógeno en la formación de un gel puede demostrarse al fundir los geles a una temperatura elevada, como en la gelatina (Ledward, 1986). El incremento de láminas  $\beta$  en la estructura intramolecular sugiere la contribución de los puentes de hidrógeno en la gelificación. La hipótesis propuesta por Wang y Damodaran (1991) dice que en los geles de proteínas globulares, los enlaces de hidrógeno entre segmentos de láminas  $\beta$  orientadas en configuraciones en paralelo o antiparalelo pueden actuar como zonas de unión en la red del gel.

*Enlaces disulfuro.* Mientras las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas inician la formación de la red del gel después de la parcial desnaturalización térmica de las proteínas, el papel de los enlaces disulfuro en la gelificación proteica puede estar relacionado con su habilidad de incrementar la longitud y la masa molecular promedio de la cadena de polipéptidos (Wang y Damodaran, 1990a). Los grupos sulfhidrilo llegan a estar más expuestos al entorno debido al desdoblamiento de las moléculas durante el calentamiento (Beveridge, Jones y Tung, 1984), lo que permite la formación de nuevos enlaces disulfuro inter e intramoleculares, vía intercambio SH/SS y reacciones de oxidación. Sin embargo, Wang y Smith (1994b) consideran que los enlaces disulfuro intermoleculares no son necesarios para la gelificación, aunque producen geles más estables. Se ha demostrado que la gelificación es posible aun cuando no exista el intercambio SH/SS. Los enlaces disulfuro contribuyen a la elasticidad del gel, ya que ésta es proporcional a la densidad de ellos en la red (Matsumura y Mori, 1996).

### ***Gelificación de las proteínas miofibrilares***

La funcionalidad de las proteínas miofibrilares y principalmente la gelificación en relación con la calidad del músculo ha sido extensamente investigada. La gelificación de las proteínas musculares está afectada por varios factores: distribución del tipo de fibras en el músculo, concentración proteica, pH, fuerza

---

---

iónica, temperatura y velocidad de calentamiento. Las proteínas miofibrilares de músculo claro de aves tienen mejores propiedades de gelificación que las de músculo rojo (Lesiow y Xiong, 2003). La desnaturalización térmica de las proteínas miofibrilares de aves se ha estudiado mediante DSC. En el termograma de músculo de pechuga de pollo se observan cinco picos endotérmicos a 57 °C, 62 °C, 67 °C, 72 °C y 79 °C, pero sólo tres transiciones a 53 °C, 61 °C y 69 °C en las miofibrillas post-rigor (Kijowski y Mast, 1988). En el músculo de muslo de pollo, las temperaturas de transición se observan a 60 °C para la miosina, a 66 °C para las proteínas sarcoplásmicas y del tejido conectivo y a 78 °C para la actina (Xiong, Brekke y Leung, 1987).

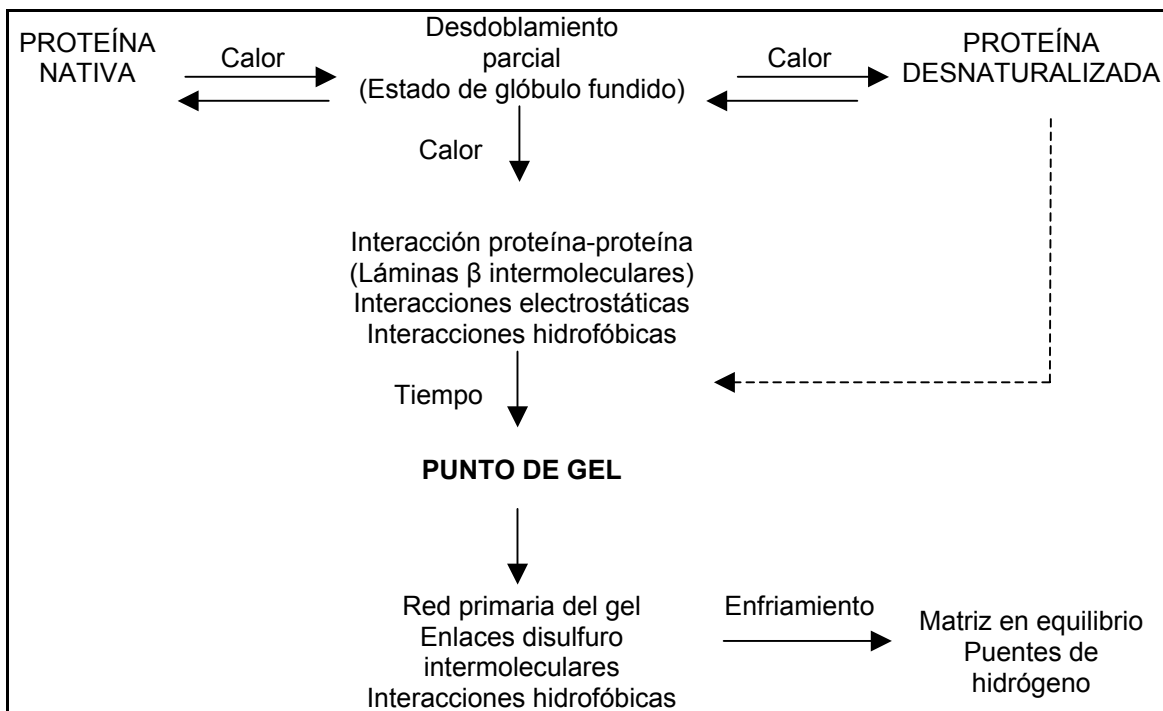
Ziegler y Acton (1984) resumieron el proceso de desnaturalización térmica de la actomiosina basándose en datos bibliográficos. Los cambios se inician con la disociación de la tropomiosina de la F-actina entre 30 °C y 35 °C. La estructura helicoidal de la F-actina se disocia en cadenas individuales a 38 °C y los cambios en la cabeza de la miosina ocurren en el intervalo de 40 °C a 45 °C, seguido de la disociación del complejo actina-miosina entre 45 °C y 50 °C. Las transiciones en la hélice de la meromiosina ligera y su rápida agregación suceden entre 50 °C y 55 °C. La actina tiene los cambios estructurales por encima de 70 °C. Aun cuando la F-actina no muestra ninguna habilidad gelificante, se ha descrito que ésta y la miosina exhiben un efecto sinérgico debido a su interacción.

### ***Gelificación de las proteínas del albumen***

El cambio estructural es un prerrequisito para la agregación de las moléculas de proteínas y, en particular, de las globulares. En la gelificación inducida por calor siempre interviene una forma parcialmente desnaturalizada. Las proteínas globulares no se desdobl原因 completamente y pueden retener su forma globular. Este estado intermedio, o estado de glóbulo fundido, puede definirse como la molécula globular compacta con estructura secundaria similar a la nativa, pero con su estructura terciaria desdoblada (Ohgushi y Wada, 1983; Hirose, 1993).

El primer paso en la gelificación térmica del albumen es el cambio en la conformación de las proteínas nativas a un estado parcialmente desdoblado (Figura 6). La ovoalbúmina, la ovotransferrina y la lisozima forman láminas  $\beta$

intermoleculares. La formación de una estructura estable de láminas  $\beta$  es de suma importancia en la desnaturalización térmica y agregación de las proteínas. Durante esta transición, los grupos funcionales del estado nativo que están enlazados intramolecularmente por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, llegan a estar disponibles para interacciones intermoleculares bajo condiciones apropiadas, formando una red o gel. Aun cuando la agregación de la ovoalbúmina puede ocurrir por interacciones físicas, los enlaces disulfuro son importantes para determinar la morfología y las propiedades reológicas del gel (Visschers y de Jongh, 2005; Broersen, van Teeffelen, Vries, Voragen, Hamer y de Jongh, 2006).



**Figura 6. Esquema de la gelificación térmica de las proteínas del albumen**

Fuente: Mine (1995)

La ovalbúmina domina las propiedades gelificantes en el albumen al ser la proteína más abundante. La dureza de los geles se incrementa al aumentar su concentración y su temperatura de gelificación depende del pH. La gelificación de la ovalbúmina ocurre entre 48.5 °C a pH 2.0 y 76.5 °C a pH 9.5 y la dureza exhibe un pico máximo a pH entre 3.5 y 6.5 (Egelandsdal, 1986). La dureza de los geles

---

---

también está relacionada con el contenido de NaCl y la concentración óptima depende del pH (Mine, 2002).

Se han propuesto varios métodos para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas del albumen. La deshidratación con temperatura y humedad controlada y baja actividad acuosa, mejora notablemente la elasticidad, la fuerza del gel y la capacidad de retención de agua del albumen deshidratado (Kato *et al.*, 1990; Mine, 1997). La homogeneidad y el tamaño molecular de los agregados solubles también son importantes en la formación de un gel firme y se ha demostrado una correlación significativa entre el la masa, la hidrofobicidad y los grupos sulfhidrilo de los mismos (Handa, Hayashi, Shidara y Kuroda, 2001).

### ***Gelificación de las proteínas de la yema***

A pesar de que el modelo teórico general puede aceptarse para describir el mecanismo de gelificación de las proteínas de la yema, es necesario considerar que la yema no es una solución proteica pura, sino una dispersión de partículas donde los triglicéridos neutros están ocultos en la parte interior, mientras que las proteínas dominan la superficie y de este modo estabilizan el sistema. La formación de una estructura de gel por calentamiento de la yema, se debe a la desnaturalización de sus constituyentes, permitiendo la interacción molecular y el desarrollo de una estructura firme y gomosa (Paraskevopoulou y Kiosseoglou, 1997). Se sabe que los componentes de la yema y especialmente las LDL, son particularmente sensibles a los tratamientos térmicos (Le Denmat, Anton y Gandemer, 1999). El calentamiento por encima de 69 °C de soluciones conteniendo LDL causa una disminución en la solubilidad y un incremento de la viscosidad, y se ha demostrado que forman geles fuertes muy cohesivos cuando se calientan a 75 °C (Tsutsui, 1988). La gelificación de la yema puede verse como un proceso de desestabilización de las partículas por desnaturalización, permitiendo la formación de una red entre ellas. Por tanto, parece más una emulsión concentrada de proteínas estabilizada que un gel obtenido por calentamiento (Kiosseoglou, 2003).

Las apolipoproteínas de las micelas parecen dominar el proceso de gelificación. Como describieron Anton, Le Denmat, Beaumal y Pilet (2001), las



soluciones de plasma de yema y de huevo líquido muestran un patrón similar de gelificación, mientras que los gránulos exhiben un comportamiento totalmente diferente y son menos efectivos como agentes formadores de red.

Un calentamiento similar al aplicado durante el secado por atomización puede desestabilizar la estructura supramolecular de las partículas, conduciendo a que las dispersiones en agua exhiban propiedades de gel más débiles a temperatura ambiente (Paraskevopoulou, Kiosseoglou, Alevisopoulos y Kasapis, 2000). Estas dispersiones pueden convertirse en verdaderos geles por desnaturalización de las proteínas y formación de enlaces disulfuro. Estudios más recientes demuestran que las interacciones hidrofóbicas parecen influir en el desarrollo de la estructura de gel tanto de la yema como del plasma, mientras que los enlaces disulfuro formados entre las proteínas a través de intercambio de enlaces SH/SS o como resultado de la oxidación de los grupos sulfhidrilo juegan un rol complementario (Kiosseoglou y Paraskevopoulou, 2005).

## **2. Gelificación inducida por alta presión**

Las altas presiones pueden inducir la gelificación de proteínas a bajas temperaturas formando geles con propiedades diferentes a las obtenidas por calor. La desnaturalización de proteínas por presión involucra la ruptura de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, mientras que la desnaturalización por calor está causada por el movimiento violento de las moléculas que pueden destruir los termolábiles enlaces de hidrógeno. Además, la desnaturalización por calor viene acompañada por la destrucción y formación de enlaces covalentes que aumentan la producción de sabores extraños y/o compuestos tóxicos. La gelificación inducida por API depende de las condiciones del sistema proteico: tipo de proteína, pH, fuerza iónica, presencia de otros compuestos como azúcares, sales y otros aditivos, así como de las condiciones del proceso: intensidad de presión, temperatura y tiempo de procesamiento (Balny y Masson, 1993; Jiménez Colmenero, 2002). El mecanismo de desnaturalización de las proteínas depende principalmente de la combinación de presión y temperatura, así como de la secuencia en la que se aplican (Messens *et al.*, 1997). Alrededor de 200 MPa, se observan algunos efectos reversibles como la disociación de estructuras poliméricas en sub-unidades, pero por encima de ese valor hay cambios

---

---

irreversibles como inactivación de enzimas y desnaturalización de proteínas (Balny y Masson, 1993).

Heremans y Smeller (1997) observaron que la fuerza del gel aumenta con la concentración proteica, con valores más altos para los geles producidos por calor, que por API. Estos resultados pueden estar relacionados con el número total de interacciones formadas dentro de la estructura de la red ya que los cambios son más pronunciados cuando se alcanza un alto grado de desdoblamiento, como en la gelificación térmica. La alteración de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, que causan la disociación y desdoblamiento a bajas presiones, viene desencadenada por la conversión de agua libre a agua ligada a la superficie de la proteína. Sin embargo, a mayor presión (>150 MPa), la agregación puede alcanzarse por la alta compresibilidad y menor volumen del agua libre comparada con la del agua ligada, debido a la compactación de la matriz (Dumay, Kalichevsky y Cheftel, 1998).

Existen diferencias significativas en la apariencia y la textura de los geles inducidos por presión y por calor de proteínas diversas. En la desnaturalización por presión la reorganización de las moléculas de agua alrededor de los aminoácidos incrementa el brillo y la transparencia de los geles (Okamoto *et al.*, 1990). Los geles formados por API generalmente tienen un flavor más natural comparados con los geles inducidos por calor y son más suaves pero resistentes al rompimiento (Hoover, 1993).

### ***Presurización de las proteínas de la carne***

Los primeros estudios realizados acerca del efecto de la API sobre las proteínas miofibrilares, demostraron la despolimerización de las proteínas y como consecuencia, un incremento en la solubilidad. Suzuki, Suzuki, Ikeuchi y Saito (1991) encontraron que mientras las proteínas del filamento delgado como actina, tropomiosina, troponina C y proteína M se solubilizan a presiones de 100 MPa, la cadena pesada de miosina requiere mayor presión. Sin embargo, en carne de cerdo y bovino sometidas a presiones de 600 MPa a 20 °C durante 30 min, la solubilidad de las proteínas tanto sarcoplásmicas como miofibrilares disminuye notablemente (Cheftel y Culioli, 1997).

La presión induce geles muy diferentes a aquellos producidos por el calor como resultado de las estructuras formadas, las cuales implican principalmente puentes de hidrógeno, aunque también se forman enlaces disulfuro (Angsupanich, Edde y Ledward, 1999). Gilleland *et al.* (1997) demostraron la formación de enlaces disulfuro durante la desnaturalización y agregación de pasta de surimi, que también se estabiliza mediante fuerzas hidrofóbicas y débiles enlaces intermoleculares.

La API induce cambios fisicoquímicos y morfológicos en las moléculas de miosina que se asocian para formar agregados. A partir de 70 MPa, las dos cabezas de la molécula se fusionan a través de interacciones intramoleculares. Entonces, al incrementar la presión entre 100 y 200 MPa y el tiempo de tratamiento, se forman oligómeros por interacciones cabeza con cabeza. Unas 20 moléculas se agrupan con las cabezas en posición central y las colas hacia el exterior, como una margarita, con una morfología muy similar a la observada por calentamiento. Durante la agregación se observa un incremento en la hidrofobicidad que permanece constante por encima de 200 MPa a pH 6.0 y por encima de 300 MPa a pH 7.0. No se observan asociaciones cola-cola y por lo tanto la gelificación sólo se lleva a cabo después del calentamiento y pueden apreciarse geles con una estructura agregada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). A baja fuerza iónica, la gelificación de la miosina se realiza por encima de 200 MPa (Yamamoto, Miura y Yasui, 1990). A pesar de que la presión sola no induce gelificación a elevada fuerza iónica, inclusive a 500 MPa, la agregación de las moléculas de miosina puede ocurrir. La presurización hasta 210 MPa durante 30 min no afecta la fuerza del gel formado por calentamiento (Yamamoto, Hayashi y Yasui, 1993; Yamamoto, Yoshida, Morita y Yasui, 1994). Iwasaki y Yamamoto (2002) observaron que los cambios en el subfragmento S-1 de la miosina de pollo se inician a 150 MPa y los cambios estructurales en los sitios de unión de la actina y ATPasa se llevan a cabo a presiones mayores de 200 MPa.

Cuando las proteínas miofibrilares han sido sometidas previamente a API (150 MPa) y luego se aplica calor, se forman geles más fuertes, debido al incremento de hidrofobicidad e interacciones de los grupos sulfhidrilo (Ikeuchi, Tanji, Kim y Suzuki, 1992). La presurización a 200 MPa antes del calentamiento,

---

---

incrementa la elasticidad aparente de miofibrillas de pollo y geles de carne de cerdo, sin embargo, presiones mayores la disminuyen. Las propiedades reológicas de las salchichas de cerdo con bajo contenido (1%) de sal pueden mejorarse por el tratamiento a 200 MPa antes de la cocción debido a la disociación de los filamentos delgados (Iwasaki, Noshiroya, Saitoh, Okano y Yamamoto, 2006). Massaux, Bitar, Bera, Sindic y Deroanne (2000) encontraron que la elevación de la presión entre 400 y 600 MPa mejora las características texturales y de retención de agua de los geles de pollo formados, dependiendo de la intensidad, la duración y la temperatura del proceso.

Recientemente, Chapleau *et al.* (2004) demostraron que no se producen cambios en la estructura secundaria de las proteínas miofibrilares a presiones de 50 a 600 MPa a 20 °C, sin embargo, se aprecia cierta agregación a partir de 300 MPa y que la modificación de la estructura terciaria puede inducir al estado de glóbulo fundido.

### ***Presurización de las proteínas del huevo***

La ovalbúmina es estable hasta 60 °C y permanece bastante estable cuando se presuriza hasta 400 MPa, lo cual se debe a la presencia del único enlace disulfuro y de los cuatro grupos sulfhidrilo así como a fuertes interacciones no covalentes que estabilizan su estructura tridimensional (Galazka *et al.*, 2000). El grado de desnaturalización de la ovoalbúmina inducido por API es mucho menor que el causado por el calor o por agentes químicos y se caracteriza por un decremento tanto en su contenido  $\alpha$ -helicoidal (72%) como en su entalpía (61%), en relación con la proteína nativa, sin embargo, no se observan cambios en el patrón de las proteínas mediante electroforesis (Hayakawa, Kajihara, Morikawa, Oda y Fujio, 1992; Hayakawa, Linko y Linko, 1996).

Los efectos de la presión (400-800 MPa/25 °C) sobre la solubilidad de la ovoalbúmina a pH neutro fueron investigados por lametti *et al.* (1998). La pérdida de solubilidad depende de la intensidad del tratamiento y de la concentración proteica y parece ser una consecuencia de la modificación de la estructura terciaria. La formación de agregados insolubles puede inhibirse con la adición de 10% de sacarosa o de cloruro de sodio que actúan como baroprotectores. El

albumen tratado por API (450-800 MPa/25 °C) incrementa su viscosidad y digestibilidad, pero mantiene las propiedades de formación de espuma y de gelificación por calor (Iametti *et al.*, 1999). La presencia de polisacáridos también parece proteger a la ovoalbúmina de la desnaturalización (Zhang, Li y Tatsumi, 2005).

Smith, Galazka, Wellner y Sumner (2000) apreciaron cambios irreversibles en la estructura  $\beta$  de la ovoalbúmina por encima de 400 MPa lo que coincide con estudios previos acerca del contenido de hélices  $\alpha$  el cual se redujo ligeramente por la presión aplicada. Observaron también una mayor exposición al solvente de residuos aromáticos en la proteína presurizada, la cual puede ser estructuralmente similar a la de formas intermedias, todo ello corrobora la formación del glóbulo fundido.

Los estudios realizados por Ngarize, Herman, Adams y Howell en 2004, revelaron mayores valores en la fuerza de los geles obtenidos a 90 °C comparados con los obtenidos por presión entre 400 y 600 MPa, sin embargo al aumentar por encima de 650 MPa, la dureza de los geles es comparable entre ambos tratamientos. La microscopía de transmisión electrónica mostró que la temperatura induce geles con una estructura más densa y mayor número de enlaces cruzados, mientras que los geles obtenidos por presión fueron porosos y con menos enlaces. Mediante espectroscopía se monitorearon los grupos específicos durante la gelificación y se observó que hubo menos enlaces disulfuro y pocos cambios en la estructura secundaria y menor formación de láminas  $\beta$  a presiones entre 400-600 MPa que en los geles obtenidos por calor. En contraste, las interacciones hidrofóbicas tuvieron un papel principal en la gelificación en ambos tratamientos. Las interacciones proteína-proteína con otras proteínas globulares tuvieron un efecto sinérgico (Ngarize *et al.*, 2005).

Estudios recientes demuestran que es en el intervalo de presión de 400 a 700 MPa donde se producen los cambios más pronunciados en la ovoalbúmina, tales como un incremento en la hidrofobicidad, cantidad de grupos sulfhidrilo expuestos y susceptibilidad a la hidrólisis enzimática, mientras que la solubilidad de la proteína, el contenido total de grupos SH y la entalpía disminuyen y la actividad inhibitoria a la tripsina desaparece (van der Plancken, van Loey y

---

---

Hendrickx, 2005b). Bajo severas condiciones de proceso (más de 70 °C a presión atmosférica o más de 500-600 MPa, dependiendo de la temperatura aplicada) hay una mayor exposición de los grupos SH con la subsiguiente oxidación y reacciones de intercambio SH/SS, produciendo agregados solubles, lo cual puede explicar porqué los geles de albumen obtenidos por presión son más suaves y más elásticos que los geles obtenidos por calor (van der Plancken, van Loey y Hendrickx, 2005a).

A bajas temperaturas (de -5 °C a 50 °C), la presión requerida para formar geles firmes de ovoalbúmina es menor de 500 MPa, sin embargo, se observa una disminución en la fuerza del gel a los 25 °C a todas las presiones aplicadas. En la yema, la efectividad de gelificación se reduce progresivamente al disminuir la temperatura pero no puede conseguirse a temperaturas menores de 10 °C (Dumoulin, Ozawa y Hayashi, 1998).

La yema tiene un comportamiento tixotrópico que varía con la presión de 100 a 400 MPa (Ahmed, Ramaswamy, Alli y Ngadi, 2003). Los cambios inducidos por la presión son dependientes de la temperatura del tratamiento y del pH de la solución. Speroni *et al.* (2005) demostraron que la aplicación de 200-600 MPa a 20 °C incrementa notablemente la desnaturalización y agregación de las lipoproteínas de baja densidad al modificar el pH de 3 a 8 y la aplicación de API bajo condiciones alcalinas disminuye la floculación de las dispersiones de las lipoproteínas.

### **3. Gelificación inducida por medios químicos**

#### ***Sales***

La adición de iones a soluciones proteicas disminuye las fuerzas electrostáticas de repulsión y origina interacciones proteína-proteína para formar un gel. Se ha descrito ampliamente que las proteínas séricas de la leche forman geles sin calentamiento después de la adición de cloruro de sodio o de calcio (Hongsprabhas y Barbut, 1997). Otras sales como bromuro de litio y tiocianato de potasio pueden inducir la gelificación de la miosina. Esos iones desestabilizan la estructura secundaria y el contenido de hélices  $\alpha$  disminuye al incrementar la concentración salina (Nakayama, Niwa y Hamada, 1983).

### **Urea**

Algunas proteínas como las del albumen o la seroalbúmina bovina dan geles transparentes por la adición de urea. La urea desestabiliza las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno, por lo que el mecanismo de gelificación se atribuye a otras fuerzas como interacciones SH/SS y oxidación de grupos sulfhidrilo (Xiong y Kinsella, 1990). El albumen presenta diferente comportamiento cuando la gelificación es inducida por calor (75 °C/15 min) o por urea (6 M).

### **Ácidos**

La gelificación inducida por ácidos es común en la elaboración de alimentos. La acidez puede conseguirse mediante la adición de ácidos orgánicos o algunos acidulantes como la glucono- $\delta$ -lactona (Totosaus, Gault y Guerrero, 2000). La gelificación de suspensiones ácidas de proteínas cárnicas a baja temperatura (4 °C) se utiliza para obtener carne reestructurada (Ngapo, Wilkinson y Chong, 1996). En las proteínas de pescado, la acidificación por ácidos orgánicos produce un fluido viscoso que al ser calentado induce geles más rígidos que los formados solamente por ácidos. La presencia de sales inhibe la gelificación a bajo pH (Chawla, Venugopal y Nair, 1996). El mecanismo de gelificación por ácidos puede explicarse por la teoría de agregación fractal propuesta por Lucey y Singh (1998) en la que señalan que la reducción del pH forma grupos de agregados con una estructura suficientemente ordenada para producir el gel.

### **Enzimas**

La formación de enlaces covalentes cruzados entre cadenas de proteínas provoca la formación de una estructura de gel. La gelificación enzimática depende de las cadenas laterales reactivas a la enzima específica utilizada. La MTGasa es capaz de gelificar soluciones concentradas de proteínas con características funcionales diferentes a los geles obtenidos por calor. Por ejemplo, las caseínas que no forman geles por el calor, sí lo hacen con la MTGasa, y la gelatina, que gelifica en frío, no funde a 100 °C (Babin y Dickinson, 2001; Priglinger *et al.*, 2004; Taylor, Marmer y Brown, 2004). Diferentes proteínas pueden unirse covalentemente para producir combinaciones con nueva funcionalidad. La caseína o las globulinas de soja con ovomucina, mejoran la emulsificación en

comparación con las proteínas aisladas (Kato, Wada, Kobayashi, Seguro y Motoki, 1991).

Kashiwagi *et al.* (2002) propusieron un mecanismo de acción hipotético de la MTGasa basado en la similitud del sitio activo de la MTGasa con la transglutaminasa del Factor XIII y la cisteína-proteasa. El número de enlaces se incrementa con la concentración de enzima y existe una correlación entre el número de enlaces formados y la fuerza del gel (Sakamoto, Kumazawa, Toiguchi, Seguro, Soeda y Motoki, 1995). Por otro lado, Lee, Lanier, Hamann y Knopp (1997) señalaron que la proporción de enlaces correlaciona mejor con la fuerza del gel que el número de enlaces formados, por lo que el tipo de estructura obtenida es más importante que el número total de dipéptidos formados.





### **III. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

## **A. OBJETIVOS**

Esta tesis doctoral pretende rentabilizar materias primas nutritivas de bajo precio, frecuentemente infravaloradas por la industria avícola, para aumentar su valor añadido. Y por ello, su objetivo es doble:

*I.* Aplicar los efectos de la alta presión isostática sobre las macromoléculas de la carne de pollo y de los huevos, para obtener un gel modelo que sirva como base en el desarrollo de diversos productos que respondan a las demandas actuales de los consumidores.

El gel modelo debe cumplir los siguientes requisitos desde el punto de vista nutricional:

- contenido proteico superior a 15% de proteínas totales,
- contenido en grasa menor de 9% de lípidos totales,
- contenido en sal menor de 1.5% de NaCl añadido y
- contenido en fosfatos máximo de 0.1% de sales de fosfatos añadidos.

*II.* Evaluar la aplicación de alta presión y transglutaminasa microbiana en las pastas cárnicas para mejorar las características fisicoquímicas de los geles en estudio.

## **B. PLAN DE TRABAJO**

Para alcanzar los objetivos propuestos, el trabajo se abordó en varias etapas que dieron lugar a los artículos presentados en esta tesis.

### ***I Etapa: Optimización de la formulación y condiciones del proceso***

Se realizaron varias pruebas preliminares con el objeto de determinar la proporción de los principales ingredientes (carne de pierna de pollo y albumen) y las condiciones de proceso idóneas (presión, temperatura y tiempo) para obtener

un gel. Para ello, se establecieron varias mezclas, partiendo de un mínimo del 50% de carne de pollo picada, adicionada de 0, 10 y 20% de albumen deshidratado y manteniendo fijos el porcentaje de agua (27.2%), de sal (2.5%) y de fosfatos (0.3%).

En el diseño del experimento se utilizó la metodología de superficie de respuesta combinando los tres factores experimentales: % de albumen, presión y temperatura. En las muestras tratadas por calor se tomaron como referencia 3 muestras con 0, 10 y 20 % de albumen. Para las muestras tratadas por presión se eligió un diseño factorial  $2^3$  con dos puntos centrales. Se llevaron a cabo 10 tratamientos combinando los valores de los factores experimentales, como se indica en el artículo 1. Las variables a analizar fueron las características texturales.

En los geles se evaluaron, además, el rendimiento del proceso, la capacidad de retención de agua y el color. En las materias primas, se analizó su composición y se caracterizaron mediante análisis térmico para determinar sus temperaturas de desnaturalización.

Los resultados mostraron que los geles obtenidos por alta presión fueron muy suaves aunque con buenas propiedades ligantes, y aquellos que contenían un 10% de albumen resultaron más fáciles de manipular durante el mezclado y embutido.

### ***II Etapa: Adición de yema de huevo fresco y reducción del contenido de sal.***

Con la intención de optimizar la textura, se llevaron a cabo otros experimentos. Se añadió yema de huevo en varias proporciones (3, 6 y 10%), se redujo el porcentaje de sal a 1.0% y aplicó la máxima presión utilizada en el experimento anterior (500 MPa/40 °C/30 min).

Los resultados, no mostrados en este trabajo de tesis, indicaron que la formulación más adecuada resultó ser: 50% de carne, 10% de albumen deshidratado, 10% de yema de huevo, 1% de sal, 0.3% de fosfatos y el agua

necesaria. Sin embargo, los geles aún exhibían una textura blanda aunque con mejor sabor y palatabilidad.

### ***III Etapa: Aplicación de transglutaminasa microbiana***

En este experimento, se adicionó la enzima transglutaminasa microbiana que, según la bibliografía, había mostrado buenos resultados para reestructurar piezas de carne y mejorar la textura de productos cárnicos a presión atmosférica, pero que al inicio de los experimentos aún no había sido utilizada como aditivo en elaborados cárnicos bajo condiciones de alta presión.

Se realizaron algunas pruebas previas para determinar si había alguna actividad de la enzima a 500 MPa y los resultados fueron positivos, por lo que los experimentos se realizaron con la MTGasa (0.3%), a presión atmosférica a 20 °C y 40 °C y bajo presión a 500 MPa a 40 °C durante 30 min. Todos los datos obtenidos en esta etapa han sido publicados en el artículo 2.

Aun cuando los resultados con la enzima y presión fueron satisfactorios y ya que se contaba con un equipo que alcanzaba los 1 000 MPa, se consideró realizar un nuevo experimento a presiones más elevadas e investigar la posibilidad de reducir los fosfatos en la formulación.

### ***IV Etapa: Reducción del contenido de fosfatos***

Se quiso averiguar hasta que punto la MTGasa y la presión podían ejercer un efecto favorable en los geles y determinar si se podían reducir o eliminar totalmente los fosfatos de una pasta cárnica con bajo contenido de sodio y grasa, así como investigar la influencia que tendría en las características del gel y en su rendimiento.

Por lo tanto, con la misma formulación ya establecida, pero eliminando totalmente los fosfatos, se llevaron a cabo los experimentos con enzima y sin enzima a 500, 700 y 900 MPa, manteniendo la temperatura de 40 °C. Los resultados se han publicado en el artículo 3.



#### **IV. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN**

---

---

**1. Optimizing composition and processing conditions of pressure  
chicken and dried egg white gels using the response surface  
methodology**

Pilar Trespacios and Reyes Pla

Enviado para su publicación en Poultry Science



**Optimizing Composition and Processing Conditions of Pressure Chicken and Dried Egg White Gels Using the Response Surface Methodology**

Journal:	<i>Poultry Science</i>
Manuscript ID:	PS-07-00230
Manuscript Type:	Full-Length Article
Key Words:	Chicken meat, dried egg white, high pressure, texture, response surface methodology



Review

1

2       RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE PRESSURE CHICKEN

3

GELS

4

5       Optimizing Composition and Processing Conditions of Pressure Chicken and Dried Egg

6

White Gels Using the Response Surface Methodology

For Peer Review



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12

**PROCESSING, PRODUCTS AND FOOD SAFETY**

Optimizing Composition and Processing Conditions of Pressure Chicken and Dried Egg  
White Gels Using the Response Surface Methodology

**P. Trespalacios and R. Pla\***

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

---

\* To whom correspondence should be sent: reyes.pla@uab.cat

12 **ABSTRACT**

13 Egg and poultry products constitute excellent raw materials to develop new foods of  
14 high added value. The objective of this work was to obtain a low fat gel with high  
15 protein content and good texture by means of the application of high pressure. Dried  
16 egg white (DEW) was added as fat replacement. In the experiment design and analysis  
17 of results, the response surface methodology was used. A factorial design  $2^3$  with two  
18 central points was applied to measure the effect of three control factors: pressure (400 to  
19 500 MPa), temperature (40 to 60°C) and DEW percentage (0 to 20%). Ten treatments  
20 were performed combining the factors on the following response variables: hardness,  
21 cutting force and compression that displayed determination coefficients of 98.2%,  
22 89.8% and 79.6%, respectively. It was observed that the three experimental factors were  
23 significantly influent in the response variables. The pressure gels were less firm and  
24 less elastic than the heat ones, which had lower cohesiveness. Nevertheless, the  
25 presence of DEW remarkably increased hardness, cutting force and compression of the  
26 gels, suggesting that these proteins participate in the network structure coupled to the  
27 myofibrillar proteins. The DEW improved the binding properties and texture of all the  
28 gels. Thermal analysis showed that batters treated at 500 MPa and 40°C had an  
29 incomplete denaturation of the myofibrillar and egg proteins, with similar results of a  
30 lesser magnitude observed at 60°C. In these conditions, the connective tissue remained  
31 in the native form and a partial unfolding of ovalbumin was observed. A modified  
32 structure of myosin with lower thermal stability was formed at 49.5°C. This work  
33 demonstrates the possibility of modifying certain functional characteristics of chicken  
34 meat gels with low fat content by means of high pressure and addition of DEW.

35 **Key words:** *Chicken meat, dried egg white, high pressure, texture, response surface*  
36 *methodology.*

37

## INTRODUCTION

38

39 Growing awareness of the link between diet and health is fast changing consumer  
40 habits and there has been increasing demand for foods with health enhancing properties,  
41 such as low fat meat products. The meat industry has responded by producing lower fat  
42 products. The modification of the fat and water contents affects texture, flavour, colour  
43 and water holding capacity of products (Mittal and Barbut, 1994), consequently other  
44 non-meat ingredients have been used to increase the binding properties of meat proteins  
45 and to improve the physical and sensorial characteristics of sausages. Most fat  
46 replacements in low fat (5 to 10%) fresh or cooked and smoked sausages are protein or  
47 carbohydrate based substitutes (Keeton, 2001).

48 Poultry products constitute excellent raw materials to develop new foods of high  
49 added value. The traditional method for preparing chicken meat products is heating,  
50 which causes changes in appearance, flavor, texture and nutritional value. The gelation  
51 properties of the muscular components determine the development of new meat  
52 products with a desirable structure, and it is known that the myofibrillar proteins are  
53 responsible for modifications like hardening and shrinking of the tissues, liberation of  
54 juice and colour changes. A textural profile with specific hardness and cohesiveness is  
55 critical for meat products; also, for most sausages, the retention of water and fat are  
56 equally substantial.

57 High pressure (HP) represents an alternative in food processing and offers huge  
58 potential for commercialization. In recent investigations about consumer perceptions of  
59 foods processed by innovative technologies, HP processing produced the most  
60 encouraging effect of all technologies assessed. The term “cold preservation” has

## GELS

61 positive associations for all participant groups, but “minimally processed” has negative  
62 associations (Cardello et al., 2007).

63 Pressure produces important changes in the functional properties of foods such as  
64 texture, colour and water holding capacity (Carlez et al., 1995; Angsupanich et al.,  
65 1999; Yuste et al., 1999; Jung et al., 2000). It has been shown that pressurization  
66 enhances denaturation and gelation of the structural proteins from the muscle. Pressure  
67 also induces the depolymerization of F-actine and actomyosin, increases the solubility  
68 of myofibrillar proteins and promotes the aggregation of myosin (Iwasaki et al., 2006).  
69 Pressure assisted gelation depends on the protein system (species, type of protein, pH,  
70 ionic strength and presence of other compounds) and processing conditions such as  
71 pressure level, time and pressurizing temperature (Jiménez Colmenero, 2002).  
72 However, pressure applied in combination with heat, at thermal denaturing conditions,  
73 limits the gelling process of meat systems. Chicken and pork meat batters treated at  
74 temperatures between 60 and 80°C and 200 MPa to 400 MPa for 30 min, result in better  
75 water binding properties but weaker structures than gels obtained by heat or  
76 pressurization prior to heating (Fernández Martín et al., 1997; Jiménez-Colmenero et  
77 al., 1998). Fernández Martín et al. (1997) found that HP was particularly effective at  
78 non-denaturizing temperatures and that pressure or thermal treatments impaired meat  
79 gelling at usual cooking temperatures, leading to undesirable effects on the pressurized  
80 pork batters.

81 Several studies revealed that at atmospheric pressure, the unfolding of chicken  
82 myosin was completed at 60°C, unlike actin, which completely denatured only above  
83 70°C. Nevertheless, unfolding of myosin and actin was induced with simultaneous  
84 treatment at 200 MPa and 40°C in extracted myofibrillar protein (Zamri et al., 2006).

## GELS

85 Egg white could be a potential water binding and texture-modifying agent in reduced  
86 fat comminuted meat products, however, reports about the effect on hydration and  
87 textural properties of meat gels obtained by heat under atmospheric pressure have been  
88 inconsistent. Fisher (1994) suggested that egg proteins help to stabilize the meat  
89 emulsions, contribute to the formation of the protein network and increase the binding  
90 properties. In opposition, Hammer (1992) reported that the egg white had no positive  
91 technological effect in meat emulsions because it did not participate in the protein  
92 structure and gave raise to a softer product with poor binding properties.

93 As for heat treatment, the pressure-induced denaturation of egg white proteins  
94 modifies their structural properties, affecting important functionalities such as gelling  
95 (Ngarize et al., 2005). Recent studies have shown that the most pronounced changes are  
96 observed in the pressure range from 400 to 700 MPa, and that pressure-induced  
97 denaturation is enhanced at temperatures between 10 to 40°C (van der Plancken et al.,  
98 2005; 2007).

99 The objective of this work was to obtain low fat chicken gels with DEW by means of  
100 high pressure at moderate temperatures (40 and 60°C). In order to optimize the  
101 composition and processing conditions of temperature and pressure the response surface  
102 methodology was used.

103

104

**MATERIALS AND METHODS**

105

***Preparation of Samples and Treatments***

107

108 ***Preparation of Samples.*** Fresh chicken thighs were obtained commercially  
109 (Corporación Alimentaria Guissona, S. A., Guissona, Spain) and bones, skin and

## GELS

110 adjacent fat were eliminated manually. The meat was minced twice in a mincer Model  
111 PC-22 (Sammic, S. L., Azpeitia, Spain) using perforated plates of 6 and 3 mm of  
112 diameter and mixed with NaCl (2.5% of final weight) and left to stand for 18 h at 4°C.  
113 Following this, the meat was mixed in a refrigerated vacuum homogenizer Model UM5  
114 (Stephan Machinery GmbH & Co., Hameln, Germany) with tripolyphosphates (0.3%),  
115 DEW (0, 10 and 20% p/p) (Degussa Texturants, Barcelona, Spain) and ice. The  
116 mixtures were homogenized during 12 min at 1,800 rpm applying 80% of vacuum while  
117 a temperature below 10°C was maintained. The total percentage of added water was  
118 fixed at 27.2%. The batters were stuffed into Nojax cellulose casings of 22 mm  
119 diameter (Viskase Companies, Inc., Willowbrook, USA) and vacuum packaged in  
120 Cryovac Corace Packaging VS 26 (Cryovac Europe, Kriens, Switzerland).

121 **Treatments.** A discontinuous isostatic press ACB (GEC Alsthom, Nantes, France)  
122 was used for HP processing (Trespacios and Pla, 2007a). Eight different combinations  
123 of pressure (400 and 500 MPa) and temperature (40 and 60°C) were applied to the  
124 batters with 0 or 20% DEW for 30 min, and two treatments at 450 MPa and 50°C for 30  
125 min to batters with 10% DEW. In total, ten treatments in duplicate were made. Heat  
126 treatment samples were heated in a water bath to assure an internal temperature of 75°C  
127 for 30 min, after which the samples were cooled at room temperature and stored at 4°C  
128 until analysis.

129 **Experiment Design.** For the experiment design, the response surface methodology  
130 (RSM) was used combining the three experimental factors: %DEW, pressure and  
131 temperature. For the pressure treatment, a factorial design  $2^3$  with two central points  
132 was chosen. Combining the values of the experimental factors carried out ten  
133 treatments. For the heat treatment 3 samples with 0, 10 and 20% of DEW were taken as  
134 reference.

135

136 *Analysis*

137

138 ***Proximate Analysis and pH.*** Official methods (Association of Official Analytical  
139 Chemists, 1990) were used to determine the moisture, total nitrogen, fat and ash  
140 contents of raw meat, batters and gels. The results were the average of three  
141 determinations. A conversion factor of 6.25 was used to calculate the protein content.  
142 The pH was determined by triplicate samples of a homogenate of 5g of sample in 50mL  
143 of distilled water at 20°C with a pHmeter Model 507-05 (Crison Instruments, S.A.  
144 Barcelona, Spain). All chemicals were from Panreac (Barcelona, Spain).

145 ***Water Holding Capacity.*** Water holding capacity (WHC) was determined by  
146 quadruplicate samples as follows: chopped sample (1.5g) was placed in a centrifuge  
147 tube along with two dried pipette filters (Gilson Pipetman, Villiers le Bel, France) and  
148 centrifuged at 4,000g for 10 min at 20°C (Model J221, Beckman Coulter, Inc.,  
149 Fullerton, USA). The WHC was expressed as percentage of water retained per 100g of  
150 water present in the sample prior to centrifugation.

151 ***Yield Determination.*** Four replicates of gel samples were tempered at 20°C and  
152 removed from the casing, blotted dry with a paper towel and weighed. Yield was  
153 expressed as percentage by dividing the weight of sample treated by heat or pressure by  
154 the weight of the non-treated sample.

155 ***Instrumental Colour Analysis.*** Three parameters of colour were evaluated:  $L^*$   
156 (lightness),  $a^*$  (redness) and  $b^*$  (yellowness) values with a Hunter Lab Model 45/0 L  
157 AV Mini Scan XE, (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, USA). The internal  
158 colour of six replicates from each treatment was analyzed using the illuminant F<sub>cw</sub> and  
159 the 10° standard observer.

## GELS

160 **Instrumental Texture Analysis.** The textural characteristics of gels were analysed  
161 through six replicates according to the texture profile analysis (TPA), compression and  
162 cutting force using a TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Haslemere,  
163 UK) with a 25kg load cell ( $\pm 1$  g). For TPA, cylinders were cut (20mm high) and axially  
164 compressed twice to 40% of their original height at a crosshead speed of 1mm/s with an  
165 aluminium compression plate P50 (5cm diameter). For the compression test (80% of the  
166 original height) the same probe was used as in the case of TPA. Cutting force was  
167 measured with a probe HDP/BSK across the diameter.

168 **Thermal Analysis.** The fresh raw chicken meat and the untreated batters were  
169 subjected to differential scanning calorimetry (DSC) Module Type DSC 821<sub>e</sub> /700  
170 (Mettler Toledo GmbH, Germany). The DEW and the lyophilized gels (10 to 15mg)  
171 were scanned after dialyzing against deionised water at 4°C for 24 h and tempered at  
172 20°C. Samples were weighed in aluminium pans (40  $\mu$ L) and then sealed with a  
173 crimper. Deionised water was used as reference. For temperature (T) and enthalpy ( $\Delta H$ )  
174 calibration, two standards were used: gallium (T = 29.8°C,  $\Delta H$  = 80.22 J/g) and indium  
175 (T = 156.6°C,  $\Delta H$  = 28.46 J/g). The heating conditions of samples were in the range of  
176 20 to 100°C at a heating rate of 10°C/min, except for chicken meat samples, which were  
177 in the range of 20 to 90°C (Kijowski and Mast, 1988). The Star<sup>o</sup> System V 6.1 software  
178 was used to obtain the plots of heat flow versus temperature, to calculate the  
179 temperature of extrapolated onset ( $T_o$ ), and temperature of maximum transition ( $T_m$ ) of  
180 at least three replicates.

181 **Statistical Analysis.** The colour data were analysed using the GLM procedure of The  
182 SAS System for Windows V 8 (SAS Institute Inc., Cary, USA), and the differences  
183 between the averages and their interactions were evaluated by means of the Student



## GELS

184 Newman Keuls (SNK) test. For the texture results, Minitab V 10.0 (Minitab, Inc.,  
185 Pennsylvania, USA) was used and then adjusted to three models for each of the  
186 response characteristics: hardness, cutting force and compression. The logarithms from  
187 the responses were taken to validate the initial hypotheses and the Backward  
188 Elimination algorithm was applied to find the best model. Level of significance was set  
189 for  $P < 0.05$ .

190

191

**RESULTS AND DISCUSSION**

192

193 ***Proximal Analysis and pH.*** The composition of the chicken meat was similar to that  
194 reported in the bibliography and is in agreement with Xiong et al.'s (1993) study of  
195 muscle composition variations from broilers. The increase in pH and protein content of  
196 batters was the result of adding DEW (88.5%  $\pm$  0.95 protein). A low level of lipids was  
197 expected because external fat was trimmed off before mincing, and were similar to  
198 values reported by Amato et al., 1989) (3% and 8% for breast and thigh muscles,  
199 respectively) (Table 1).

200 ***Yield and Water Holding Capacity.*** The WHC of heat gels was higher in gels with  
201 20% DEW (95.06%) and 10% DEW (92.87%) than in the gels without DEW (83.66%).  
202 There were no differences between gels obtained by pressure or heat, although the  
203 presence of DEW in both cases increased the WHC (between 11% and 14%) (Table 2).  
204 Carballo et al. (1995) found that egg white had no influence on binding properties of  
205 bologna sausages obtained by heat at 70°C. However, when pressure (400 MPa) and  
206 heat (70°C) were applied simultaneously the egg white improved the water binding of  
207 chicken meat gels (Fernández et al., 1998).

## GELS

208 The gels without DEW obtained at 500 MPa showed a higher yield at 40°C than at  
209 60°C, and than at 400 MPa at both temperatures. This is probably due to the unfolding  
210 of myofibrillar proteins that occurs at lower temperatures under HP, showing an  
211 antagonist effect between both parameters. Jiménez-Colmenero et al. (1997) did not  
212 find any differences between the water binding properties of low fat and high fat pork  
213 sausages treated at 100 MPa, whereas those treated at 300 MPa presented negative  
214 effects. The authors suggested that the pressure limited the formation of gel structures,  
215 which was probably associated with its preserving effect against thermal denaturation of  
216 meat proteins (Jiménez-Colmenero et al., 1998). However, poultry sausages pressurized  
217 at 500 MPa for 30 min at 50, 60, 70 or 75°C gave lower cooking losses than those  
218 treated only by heat (75°C for 30 min) (Yuste et al., 1999).

219 There are no studies available on the effects of pressure above 400 MPa on mixtures  
220 of egg and meat proteins. It is possible that the previous contradictory results were due  
221 to the specific temperature and pressure applied by authors, because a recent study has  
222 shown that the most pronounced changes in egg proteins are observed in the range 400  
223 to 700 MPa (van der Plancken et al., 2005). Ngarize et al. (2005) had reported that  
224 DEW showed no gelation below 500 MPa for 20 min, but there was an increase in gel  
225 strength with increasing pressure, although the values remained lower than those of the  
226 heat-induced gels. Ibarz et al. (1999) on the other hand demonstrated that egg white  
227 requires more than 620 MPa to form hard gels at 20°C.

228 **Colour.** The heat gels with DEW were lighter than the pressure ones, with the 20%  
229 of DEW gels showing the highest  $L^*$  and the lowest  $a^*$  values. Unexpectedly, the  
230 pressure gels at 60°C with 20% of DEW were darker than those without DEW in the  
231 same conditions of pressure (Table 2). In pressure gels, lightness increased as pressure  
232 increased although the temperature remained constant. This agrees with Fernández et al.

## GELS

233 (1998) who found that chicken meat with 2% of DEW had a greater  $L^*$  value when  
234 treated at 400 MPa than at 200 MPa at 70°C. Our results differ from those obtained by  
235 Yuste et al. (1999) where it is mentioned that mechanically recovered poultry meat  
236 subject to pressurization (500 MPa/75°C) gave rise to lighter and more yellow sausages  
237 than meat subject to conventional heat treatment.

238 Our results show that the most drastic effects on redness were observed at 500 MPa  
239 at 40 and 60°C in absence of DEW, while the lowest pressure (400 MPa) and  
240 temperature (40°C) better preserved the red colour of the gels.

241 The reduction of the reddish tone of the meat has been associated with the  
242 modifications induced by HP on myoglobin. Jung et al. (2003) found that, in beef meat,  
243 pressure higher than 300 MPa induced changes in colour, such as a decrease in the total  
244 colour difference, and that the pressure intensity was more significant than the holding  
245 time for redness, metmyoglobin content and total colour difference. We consider that  
246 the presence of DEW in the pressure gels had a protective effect on the denaturalization  
247 of the myoglobin because, although the content of this protein is smaller when  
248 increasing the amount of DEW in the mixture, the gels with 20% DEW were darker and  
249 had a higher redness value than the ones that contained greater proportion of meat.

250 In both pressure and heat gels, the yellowness was influenced by DEW: The higher  
251 the DEW %, the greater the yellowness. However, in gels without DEW the yellowness  
252 decreased with pressure. Fernández et al. (1998) did not find similar differences  
253 between chicken gels with and without egg white, obtained at 200 MPa and 400 MPa at  
254 70°C.

255 **Texture.** In heat gels there is an important effect of the addition of DEW, in that it  
256 notably increased the hardness, cohesiveness, chewiness, compression and cutting force  
257 of gels, with only a slight decrease in springiness (data no shown). These results

## GELS

258 indicate that egg proteins participate in the formation of a firm network with the  
259 myofibrillar proteins giving better binding (as shown earlier) and textural properties. In  
260 pressure gels, statistic analysis showed that all the three experimental factors influenced  
261 the response values. For hardness, the most influential factor was the interaction of  
262 DEW with pressure ( $P = 0.010$ ) and temperature ( $P = 0.043$ ). For cutting force, the  
263 relevant factor was the springiness ( $P = 0.002$ ) and the interaction of DEW with  
264 pressure ( $P = 0.017$ ); a quadratic term was also significant for DEW ( $P = 0.032$ ). For  
265 compression, the most influential factor was DEW ( $P = 0.001$ ).

266 The fitted and validated models, with determination coefficients ( $R^2$ ) of 98.2 %,  
267 89.8% and 79.6% respectively, were:

268 Hardness = exp {1.67869 – 0.403297 DEW – 0.592112 PRESSURE + 0.0249053  
269 TEMPERATURE + 0.00852444 DEW \* PRESSURE + 0.00268092 DEW \*  
270 TEMPERATURE}

271 Cutting force = exp {1.13924 - 0.311761 DEW – 0.0440152 PRESSURE +  
272 0.0472346 TEMPERATURE + 0.00481812 DEW<sup>2</sup> + 0.00521161 DEW \* PRESSURE}

273 Compression = exp {-1.29009 + 0.0831681 DEW + 0.0495039 PRESSURE +  
274 0.0256764 TEMPERATURE}

275 In general, the pressure gels were less firm, elastic and cohesive than heat-treated  
276 ones with the exception of the 20% DEW gels obtained at 60°C. Nevertheless, the  
277 addition of DEW improved gel hardness, springiness and cohesiveness. The effect of  
278 DEW percentage on hardness in pressure gels is shown in 3D graphics (Figure 1). In  
279 gels without DEW, it was observed that hardness values decreased when pressure  
280 increased (Figure 1a), but augmented with the temperature; a similar effect being  
281 observed in cutting force (Figure 2 a). The addition of 10% and 20% of DEW had a

## GELS

282 linear effect in the logarithmic scale for hardness (Figures 1b and c) and cutting force  
283 (Figures 2b and c).

284 The results agree with Ma and Ledward (2004), who found that although increasing  
285 pressure on beef muscle at 20 and 40°C caused increasing hardness, when beef muscle  
286 was treated at 60°C and above, marked tenderization occurred at 200 MPa and above. In  
287 whole chicken muscle, heat treatment at atmospheric pressure increases hardness only at  
288  $\geq 50^\circ\text{C}$ . In pressure treatments at temperatures ranging from 20 to 50°C, heat and  
289 pressure acted synergistically to increase muscle hardness, with the most significant  
290 increase being between 200 MPa and 400 MPa. However, at 60 and 70°C, hardness  
291 decreased in treatments above 200 MPa (Zamri et al., 2006). The significant increase of  
292 hardness at 400 MPa is presumably due to the myofibrillar proteins unfolding which  
293 may coincide with compression of myosin thick filaments into the Z line of the muscle,  
294 related to increased toughness in HP treatments (Iwasaki et al., 2006).

295 Chung and Lee (1991) have reported that the addition of egg white reduces the  
296 compression and penetration force in surimi gels. It has been attributed to the fact that  
297 egg white has a diluting effect and interferes in the gelation of myofibrillar proteins.  
298 However, other authors have found that egg white improved the textural properties of  
299 actomyosin gels (Chen et al., 1993). Carballo et al. (1995) found a direct relationship  
300 between egg white content and textural parameters of bologna sausages obtained by  
301 heat at 70°C. They consider that these inconsistencies about the effects of egg white on  
302 myosystem properties appear to be related to the functional quality of the myofibrillar  
303 proteins.

304 Our results agree with van der Plancken et al. (2007), who observed that pressure-  
305 induced denaturation in egg proteins was enhanced at low temperatures. This is opposite  
306 to what was observed for heat treatment at ambient pressure, indicating an antagonistic

## GELS

307 effect of temperature and pressure in the temperature-pressure range studied (10, 25 and  
308 40°C at 525 MPa to 600 MPa). At higher temperature (60°C), pressure-induced egg  
309 white protein denaturation more closely resembles heat-induced denaturation.

310 The interaction of DEW with pressure and DEW with temperature indicate that the  
311 effect of DEW depends on both of these variables. As the meat hardness decreased at  
312 temperatures above 60°C and pressure-induced denaturation in egg proteins was  
313 enhanced by pressure treatment at lower temperatures, we suggest that in subsequent  
314 experiments pressure levels be increased while temperature is maintained at the range  
315 studied, and some additive is added to probe for enhanced the textural properties.

316 ***Thermal Analysis.*** At atmospheric pressure, the transitions for myosin and actin in  
317 the myofibrillar proteins of chicken leg muscle, were 59.5 and 84.2°C respectively and  
318 the respectively and the isolated DEW showed two main peaks, at 65.8°C from  
319 conalbumin and 83.16°C for ovalbumin (Trespacios and Pla, 2007b). The batters  
320 produced two principal endothermic peaks: at 60.2 and 82.8°C. In thermograms of heat  
321 gels with DEW, the myosin peak totally disappeared. This fact is related to the  
322 significant increase observed in hardness, however, a minimal peak was seen at 83°C,  
323 which implied that ovalbumin was not completely denatured by the heat treatment. The  
324 pressure gels (500 MPa and 40°C) produced three peaks at 49.5, 65.51 and 82.34°C and  
325 similar results of a lesser magnitude were observed at 60°C. This signifies a partial  
326 denaturation of the mixture protein under these conditions, because the last two  
327 transitions correspond to connective tissue that remained in the native form and a partial  
328 unfolding of ovalbumin. Ma and Ledward (2004) found that collagen is apparently not  
329 affected by pressure.

330 We consider the first peak (49.5°C) to be related to a modified structure of myosin,  
331 with a lower thermal stability or a residual pressure resistant structure. The rescanning

GELS

332 did not show any peak, which indicated that it was stabilized by hydrogen bonds. This  
333 phenomenon was observed also by Zamri et al. (2006) at 51°C in whole chicken muscle  
334 between 400 MPa and 600 MPa at 40°C, in beef meat by Ma and Ledward (2004)  
335 (50.1°C) and in turkey meat by Angsupanich et al. (1999), who explain that thermally  
336 induced gels are mainly stabilized by hydrophobic interactions and disulfide bonds,  
337 while pressure induced gels appeared to be stabilized, at least partially, by hydrogen  
338 bonds. The application of HP together with the addition of DEW allows diversifying  
339 products with low fat content therefore, although it is necessary to find the optimal  
340 conditions for each of the desired properties.

341

342

**ACKNOWLEDGEMENTS**

343

344 This work was financially supported by the Secretaría General del Plan de Desarrollo  
345 I+D (AGL2000-0357) of Spain and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
346 (CONACyT) of México. The authors thank the collaboration of Mrs. Melissa Edwards  
347 for the manuscript proof-reading and Degussa Texturants Systems for providing the  
348 additives used in this study.

349

## GELS

349

## REFERENCES

350

351 Amato, P. M., D. D. Hamann, H. R. Ball, and E. A. Foegeding. 1989. Influence of  
352 poultry species, muscle groups, and NaCl level on strength, deformability, and water-  
353 retention in heat-set muscle gels. *J. Food Sci.* 54:1136-1140.

354

355 Angsupanich, K., M. Edde, and D. A. Ledward. 1999. Effects of high pressure on the  
myofibrillar proteins of cod and turkey muscle. *J. Agric. Food Chem.* 47:92-99.

356

357 Association of Official Analytical Chemists. 1990. Meat and meat products. Pages 931-  
358 948 in *Official methods of analysis*. K. Helrich, ed. Association of Official Analytical  
Chemists, Arlington, VA.

359

360 Carballo, J., G. Barreto, and F. Jiménez-Colmenero. 1995. Starch and egg-white  
361 influence on properties of bologna sausage as related to fat-content. *J. Food Sci.*  
60:673-677.

362

363 Cardello, A. V., H. G. Schutz, and L. L. Lesher. 2007. Consumer perceptions of foods  
364 processed by innovative and emerging technologies: A conjoint analytic study.  
*Innov. Food Sci. Emerg.* 8:73-83.

365

366 Carlez, A., T. Veciana-Nogues, and J. C. Cheftel. 1995. Changes in color and  
367 myoglobin of minced beef meat due to high-pressure processing. *Lebensm. -Wiss.*  
*Technol.* 28:528-538.

368

369 Chen, J. S., C. M. Lee, and C. Crapo. 1993. Linear-programming and response-surface  
methodology to optimize surimi gel texture. *J. Food Sci.* 58:535-538.

370

371 Chung, K. H. and C. M. Lee. 1991. Water binding and ingredient dispersion pattern  
effects on surimi gel texture. *J. Food Sci.* 56:1263-1266.

372

373 Fernández Martín, F., P. Fernández, J. Carballo, and F. Jiménez-Colmenero. 1997.  
374 Pressure/heat combinations on pork meat batters: Protein thermal behavior and  
product rheological properties. *J. Agric. Food Chem.* 45:4440-4445.

375

376 Fernández, P., S. Cofrades, M. T. Solas, J. Carballo, and F. Jiménez-Colmenero. 1998.  
377 High pressure-cooking of chicken meat batters with starch, egg white, and iota  
carrageenan. *J. Food Sci.* 63:267-271.

378

379 Fisher, A. 1994. Tecnología de elaboración y producción de productos cárnicos. Pages  
511-625 in *Tecnología e Higiene de la Carne*. O. Prändl, ed. Ed. Acribia, Zaragoza.

380

381 Hammer, G. F. 1992. Sustancias aditivas y aditivos. Pages 83-106 in *Tecnología de los*  
*Embutidos Escaldados*. F. Wirth, ed. Ed. Acribia, Zaragoza.

382

383 Ibarz, A., E. Sangronis, G. V. Barbosa-Canovas, and B. G. Swanson. 1999. Texture of  
egg gels induced by high hydrostatic pressure. *Food Sci. Technol. Int.* 5:191-201.



## RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE PRESSURE CHICKEN

### GELS

- 384 Iwasaki, T., K. Noshiroya, N. Saitoh, K. Okano, and K. Yamamoto. 2006. Studies of the  
385 effect of hydrostatic pressure pretreatment on thermal gelation of chicken myofibrils  
386 and pork meat patty. *Food Chem.* 95:474-483.
- 387 Jiménez Colmenero, F. 2002. Muscle protein gelation by combined use of high  
388 pressure/temperature. *Trends in Food Science and Technology.* 13:22-30.
- 389 Jiménez-Colmenero, F., J. Carballo, P. Fernández, G. Barreto, and M. T. Solas. 1997.  
390 High-pressure-induced changes in the characteristics of low-fat and high-fat  
391 sausages. *J. Sci. Food Agric.* 75:61-66.
- 392 Jiménez-Colmenero, F., P. Fernández, J. Carballo, and F. Fernández Martín. 1998.  
393 High-pressure-cooked low-fat pork and chicken batters as affected by salt levels and  
394 cooking temperature. *J. Food Sci.* 63:656-659.
- 395 Jung, S., M. de Lamballerie-Anton, and M. Ghoul. 2000. Textural changes in bovine  
396 meat treated with high pressure. *High Pressure Res.* 19:459-464.
- 397 Jung, S., M. Ghoul, and M. de Lamballerie-Anton. 2003. Influence of high pressure on  
398 the color and microbial quality of beef meat. *Lebensm. -Wiss. Technol.* 36:625-631.
- 399 Keeton, J. T. 2001. Formed and emulsion products. Pages 195-226 in *Poultry Meat*  
400 *Processing.* A.R.Sams, ed. CRC Press, LLC, Boca Raton, FL.
- 401 Kijowski, J. M. and M. G. Mast. 1988. Thermal properties of proteins in chicken broiler  
402 tissues. *J. Food Sci.* 53:363-366.
- 403 Ma, H. J. and D. A. Ledward. 2004. High pressure/thermal treatment effects on the  
404 texture of beef muscle. *Meat Sci.* 68:347-355.
- 405 Mittal, G. S. and S. Barbut. 1994. Effects of fat reduction on frankfurters physical and  
406 sensory characteristics. *Food Res. Int.* 27:425-431.
- 407 Ngarize, S., A. Adams, and N. Howell. 2005. A comparative study of heat and high  
408 pressure induced gels of whey and egg albumen proteins and their binary mixtures.  
409 *Food Hydrocolloids.* 19:984-996.
- 410 Trespalacios, P. and R. Pla. 2007a. Simultaneous application of transglutaminase and  
411 high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. *Food Chem.*  
412 100:264-272.
- 413 Trespalacios, P. and R. Pla. 2007b. Synergistic action of transglutaminase and high  
414 pressure on chicken meat and egg gels in absence of phosphates. *Food Chem.*  
415 104:1718-1727.
- 416 van der Plancken, I., A. van Loey, and M. E. Hendrickx. 2005. Combined effect of high  
417 pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innov. Food*  
418 *Sci. Emerg.* 6:11-20.

GELS

- 419 van der Plancken, I., A. van Loey, and M. E. Hendrickx. 2007. Kinetic study on the  
420 combined effect of high pressure and temperature on the physico-chemical properties  
421 of egg white proteins. *J. Food Eng.* 78:206-216.
- 422 Xiong, Y. L., A. H. Cantor, A. J. Pescatore, S. P. Blanchard, and M. L. Straw. 1993.  
423 Variations in muscle chemical-composition, pH, and protein extractability among  
424 eight different broiler crosses. *Poult. Sci.* 72:583-588.
- 425 Yuste, J., M. Mor-Mur, M. Capellas, B. Guamis, and R. Pla. 1999. Mechanically  
426 recovered poultry meat sausages manufactured with high hydrostatic pressure. *Poult.*  
427 *Sci.* 78:914-921.
- 428 Zamri, A. I., D. A. Ledward, and R. A. Frazier. 2006. Effect of combined heat and high-  
429 pressure treatments on the texture of chicken breast muscle (*Pectoralis fundus*). *J.*  
430 *Agric. Food Chem.* 54:2992-2996.  
431  
432

# RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE PRESSURE CHICKEN

## GELS

### List of Tables and Figures

#### TABLES:

Table 1. Chemical composition and pH of raw chicken meat and batters with dried egg white

Table 2. Yield and colour parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ;  $b^*$ ) of low fat chicken gels with dried egg white obtained by heat and high pressure

#### FIGURES:

Figure 1. Surface plots for log of hardness in low fat chicken gels with a) 0%, b) 10% and c) 20% dried egg white

Figure 2. Surface plots of cutting force of low fat chicken gels with a) 0%, b) 10% and c) 20% dried egg white

Figure 3. Surface plots of compression force at 80% of low fat chicken gels with a) 0%, b) 10% and c) 20% dried egg white

# RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE PRESSURE CHICKEN

## GELS

**Table 1. Chemical composition and pH of raw chicken meat and batters with dried egg white**

	MOISTURE (%)	ASH (%)	PROTEIN (%)	FAT (%)	pH
Raw chicken meat	72.25 ± 0.63	0.95 ± 0.02	18.24 ± 0.07	9.35 ± 0.05	6.56
Batter 0% DEW <sup>1</sup>	78.81 ± 0.10	3.34 ± 0.02	12.60 ± 0.22	6.80 ± 0.05	6.38
Batter 10% DEW	71.78 ± 0.16	3.74 ± 0.01	18.55 ± 0.03	6.40 ± 0.03	6.83
Batter 20% DEW	65.40 ± 0.42	4.18 ± 0.02	25.20 ± 0.31	5.82 ± 0.03	7.20

<sup>1</sup>DEW = dried egg white

RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE PRESSURE CHICKEN

GELS

**Table 2. Yield and colour parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ )<sup>1</sup> of low fat chicken gels with dried egg white obtained by heat and high pressure<sup>5</sup>**

DEW <sup>2</sup> (%)	P <sup>3</sup> (MPa)	T <sup>4</sup> (°C)	YIELD (%)	$L^*$	$a^*$	$b^*$
HEAT						
0	0.1	75	96.42 ± 0.35d	68.00 ± 0.23 f	5.13 ± 0.16 cd	11.00 ± 0.27 e
10	0.1	75	99.52 ± 0.27b	72.86 ± 0.51 b	4.61 ± 0.39 e	10.16 ± 0.21 f
20	0.1	75	99.78 ± 0.19a	76.16 ± 0.21 a	4.14 ± 0.14 f	10.92 ± 0.12 e
HIGH PRESSURE						
0	400	40	96.06 ± 0.15d	60.11 ± 0.08 i	5.41 ± 0.07 bc	9.64 ± 0.03 g
0	400	60	96.60 ± 0.23d	70.29 ± 0.28 d	4.96 ± 0.08 d	9.68 ± 0.39 g
0	500	40	97.31 ± 0.32c	64.90 ± 0.06 h	3.46 ± 0.04 g	8.75 ± 0.09 i
0	500	60	95.12 ± 0.27e	72.82 ± 0.48 b	3.36 ± 0.22 g	9.33 ± 0.32 h
10	450	50	99.63 ± 0.18b	68.38 ± 0.24 f	5.23 ± 0.21 bcd	10.69 ± 0.26 e
10	450	50	99.62 ± 0.46b	67.15 ± 0.45 g	5.23 ± 0.41 bcd	10.80 ± 0.14 e
20	400	40	99.90 ± 0.29a	60.43 ± 1.03 hi	6.97 ± 0.54 a	13.58 ± 0.19 a
20	400	60	99.72 ± 0.41a	68.91 ± 0.26 e	5.47 ± 0.13 bc	13.20 ± 0.15 b
20	500	40	99.79 ± 0.37a	64.46 ± 0.45 h	5.59 ± 0.31 b	12.95 ± 0.03 c
20	500	60	99.66 ± 0.26a	71.96 ± 0.33 c	4.39 ± 0.15 ef	12.37 ± 0.21 d

<sup>1</sup> $L^*$  = Lightness,  $a^*$  = redness,  $b^*$  = yellowness

<sup>2</sup>DEW = Dried egg white

<sup>3</sup>P = Pressure

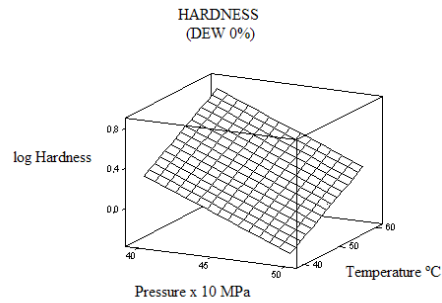
<sup>4</sup>T = Temperature

<sup>5</sup>Different letters in a same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

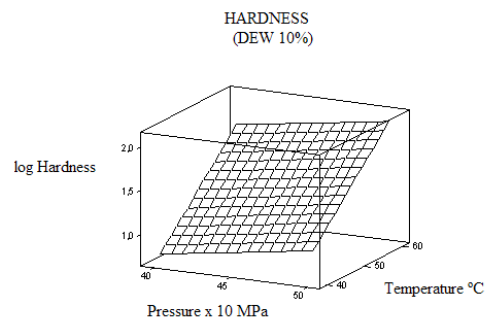
# RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE PRESSURE CHICKEN

## GELS

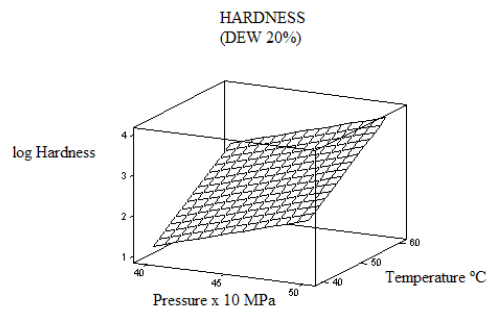
**Figure 1. Surface plots for log of hardness in low fat chicken gels with a) 0%, b) 10% and c) 20% dried egg white**



**Figure 1a**



**Figure 1b**

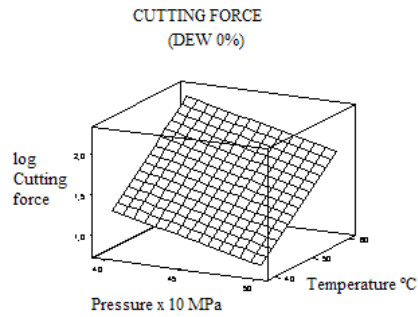


**Figure 1c**

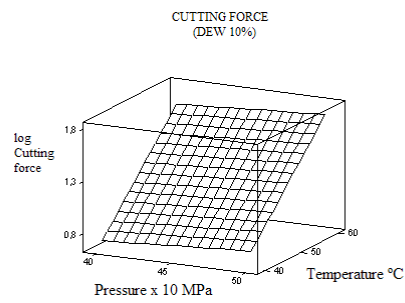
# RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE PRESSURE CHICKEN

## GELS

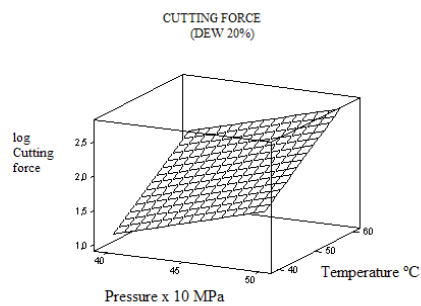
**Figure 2. Surface plots of cutting force of low fat chicken gels with a) 0%, b) 10% and c) 20% dried egg white**



**Figure 2a**

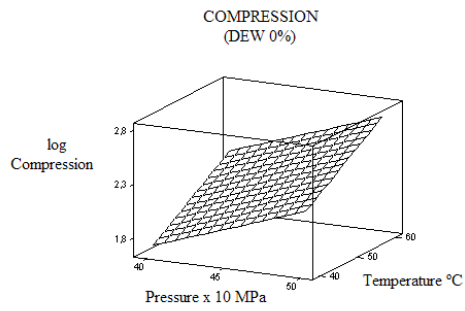


**Figure 2b**

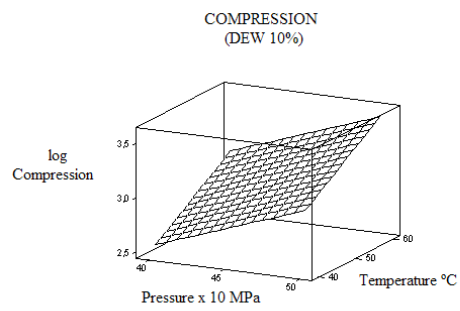


**Figure 2c**

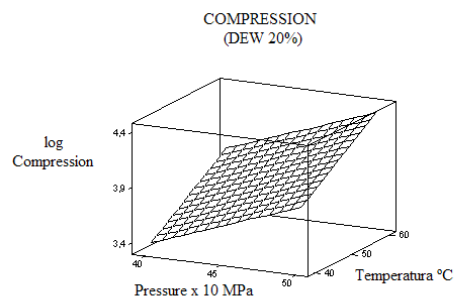
**Figure 3. Surface plots of compression force at 80% of low fat chicken gels with a) 0%, b) 10% and c) 20% dried egg white**



**Figure 3a**



**Figure 3b**



**Figure 3c**



---

---

**2. Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels**

Pilar Trespacios and Reyes Pla, 2007

Food Chemistry 100(1), 264-272

# Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels

Pilar Trespalacios, Reyes Pla \*

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

Received 25 April 2005; received in revised form 20 September 2005; accepted 20 September 2005

## Abstract

Low-fat protein gels obtained by pressure are softer than those processed by conventional heat treatment. In this study, microbial transglutaminase (MTGase) (0.3%) was added to chicken batters in order to investigate the combined effect of pressure and enzyme on the functional properties of gels. Batters of meat with egg proteins were treated at 500 MPa for 30 min at 40 °C and then heated at 75 °C for 5 min to inactivate the enzyme. Treated samples showed, under confocal microscopy, a more compact and homogeneous microstructure and exhibited a notable increase in hardness and chewiness as compared to controls that were pressurized but contained no MTGase. They were also harder, more chewy and springy but had a similar cohesiveness and cutting force to those obtained by heat alone.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Microbial transglutaminase; High pressure; Chicken meat gels; Texture; Microstructure

## 1. Introduction

Consumer demand for minimally processed, microbiologically safe, stable food products that are additive-free, has stimulated the interest of food companies in high pressure processing (Hendrickx, Ludikhuyze, Van den Broeck, & Weemaes, 1998). Growing awareness of the link between diet and health is fast-changing consumer habits, so that there has been increasing request for foods with health-enhancing properties, such as low-fat meat products (Jiménez Colmenero, 2000). In recent years, it has also been recommended that salt intake should be reduced in light of the relationship between high sodium levels and development of arterial hypertension. However, in products with reduced levels of sodium, the functionality of the traditional myosin heat-set matrix may be limited due to low

ionic strength, water binding and a decrease in the firmness of meat gels (Smith, 1988; Whiting, 1988).

Many processed meat products that have been traditionally made from pork have high levels of fat. As a result, chicken with fat substitutes is now being used to manufacture emulsified sausages in order to obtain healthier meat products (Jiménez Colmenero, Carballo, & Cofrades, 2001). However, reformulation with fat substitutes can cause a reduction in particle binding, darker product colour, lack of flavour, reduced browning reactions and shorter microbiological shelf-life (Keeton, 1994).

Fisher (1994, chap. IV) indicated that egg proteins help to stabilize batters and may be advantageous in increasing binding properties. Numerous authors have used egg white as a functional ingredient in a number of ground and emulsified meat products to support and ensure the binding properties of meat (Carballo, Barreto, & Jiménez Colmenero, 1995; Carballo, Fernandez, Barreto, Solas, & Colmenero, 1996; Fernández, Cofrades, Solas, Carballo, & Jiménez Colmenero, 1998; Jiménez Colmenero, Barreto, Fernandez, & Carballo, 1996; Pietrasik, 2003; Pietrasik & Li-Chan, 2002a).

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 4112; fax: +34 93 581 1494.  
E-mail addresses: [mariadelpilar.trespalacios@campus.uab.es](mailto:mariadelpilar.trespalacios@campus.uab.es) (P. Trespalacios), [reyes.pla@uab.es](mailto:reyes.pla@uab.es) (R. Pla).

In a previous study, functional characteristics, such as water-holding capacity, texture and colour of low fat chicken gels were modified with the addition of ovalbumen as fat substitute and pressure processing (Trespalacios et al., 2002). Protein gels made under pressure are generally glossier and softer than heat induced gels (Jiménez Colmenero, 2002; Okamoto, Kawamura, & Hayashi, 1990). On the other hand, sausages made from chicken meat obtained by heat (Muguruma et al., 2003) or pressure do not provide desirable gel strength (Yuste, Mor-Mur, Capellas, Guamis, & Pla, 1999).

Transglutaminase (TGase) (EC 2.3.2.13, protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyl transferase) is an enzyme that catalyses acyl transfer reactions between the  $\gamma$ -carboxamide group of glutamine residues and the  $\epsilon$ -amino group of lysine in proteins, leading to inter- or intra-molecular cross-linking (De Jong & Koppelman, 2002). Transglutaminases are a widely distributed family of enzymes found in plants, animal tissues and body fluids of mammals, which can modify proteins by means of amine incorporation, cross-linking and deamidation (Motoki & Seguro, 1998). Sakamoto, Kumazawa, Kawajiri, and Motoki (1995) quantitatively analysed  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine cross-links in 127 different foods and the highest levels were found in fish paste products, processed fish, shellfish, meats, soybeans and raw poultry organs. Thus, TGase cross-linked proteins have been long ingested by man.

The production of TGase for industrial use was made possible by the isolation (Nonaka et al., 1989) and purification (Ando et al., 1989) of a bacterial TGase from a microorganism taxonomically classified as a variant of *Streptovorticillum mobaraense*. Transglutaminases require  $\text{Ca}^{2+}$  for expression of enzymatic activity; however, microbial transglutaminase (MTGase) is totally independent of  $\text{Ca}^{2+}$  (Motoki et al., 1990). Such a property is very useful in the modification of the functionality of food proteins, such as casein and myosin, because they are easily precipitated in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and become less sensitive to MTGase (Motoki & Seguro, 1998).

Transglutaminase is now widely used in seafood, surimi products, meat products, noodles and pasta, dairy products and baked goods (Kuraishi, Yamazaki, & Susa, 2001). Although the effect of the MTGase is well documented for raw and restructured meats (Kuraishi et al., 1997; Lee & Park, 2003; Nielsen, 1995; Serrano, Cofrades, & Jiménez Colmenero, 2004; Tsao, Kao, Hsieh, & Jiang, 2002), few studies have been reported on characteristics of cooked meat emulsions (Pietrasik, 2003; Pietrasik & Jarmoluk, 2003; Pietrasik & Li-Chan, 2002a; Pietrasik & Li-Chan, 2002b). Only some chicken meat products have been developed (Kilic, 2003; Muguruma et al., 2003; Tseng, Liu, & Chen, 2000).

Nonaka et al. (1989) showed that rabbit myosin was polymerised by a catalytic reaction of the microbial transglutaminase (MTGase), but actine was not affected under the same conditions. On the other hand, globular proteins, such as  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and ovalbumin,

have proven to be poor substrates because of their compact structures, which limit the accessibility of the TGase to the target glutamine and lysine residues (Nio, Motoki, & Takinami, 1985; Sakamoto, Kumazawa, & Motoki, 1994). Furthermore, ovalbumin and conalbumin were found only to be modified by MTGase when a reducing agent like dithiothreitol was used, which is undesirable for food manufacturing (Nonaka et al., 1989). Subsequent investigations have shown that pre-treatment or simultaneous application of high pressure at 400–600 MPa can induce structural changes in the native protein, making it accessible to the acyl binding site of MTGase (Nonaka, Ito, Sawa, Motoki, & Nio, 1997). Other reports of high pressure effects on various biomolecules indicate that this may be a suitable denaturing treatment for enhancing TGase activity (Ashie & Lanier, 1999; Gilleland, Lanier, & Hamann, 1997).

MTGase dissolved in buffer solution exhibits a remarkable stability toward high pressure treatment above 400 MPa at 60 °C (Lauber, Noack, Klostermeyer, & Henle, 2001b). 60% of initial MTGase activity was maintained even after pressurization at 600 MPa for 60 min, indicating that MTGase was pressure-resistant compared to other enzymes (Lee & Park, 2002).

Although many references can be found on the separate application of TGase and pressure to different food products, some hypotheses have been suggested to elucidate the mechanism involved when they are applied together (Ashie & Lanier, 1999; Uresti, Velazquez, Vázquez, Ramirez, & Torres, 2006); there is a lack of knowledge on their combined effects. Thus, the objective of this study was to investigate the simultaneous application of high pressure and MTGase on poultry meat emulsions and to improve the textural characteristics of low-fat and low-salt chicken meat gels added with ovalbumen and egg yolk.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of low fat and low salt chicken gels

Fresh chicken thighs and eggs were purchased from a local market (Corporación Alimentaria Guissona, S.A., Guissona, Spain). Skinless, boneless meat was trimmed to remove visible fat and connective tissue, ground twice through 6 and 3 mm plates in a mincer Mod. PC-22 (Sammic, S.L., Azpeitia, Spain), then mixed with NaCl (1.0% w/w total formulation) and left to stand for 18 h at 4 °C. The mixture was homogenised with 10% fresh egg yolk, 10% dehydrated egg white and 0.3% of tripolyphosphates (Degussa Texturant Systems, Barcelona, Spain) and cold water (30%) in a homogeniser Mod. UMC 5, (Stephan Machinery GmbH & Co., Hameln, Germany) at 1800 rpm for 12 min at 80% vacuum. The final temperature of the batters never exceeded 12 °C. Samples with enzyme were added with 0.3% Transglutaminase Activa™ WM (Ajinomoto Co. Inc., Tokio, Japan) which contains 99% maltodextrins and 1% MTGase with an activity of 100 units/g. Immediately after this, the batters were stuffed,

by means of a sausage filler Mod. TWF-6 (Dick GmbH, Deizisau, Germany), into Nojax<sup>®</sup> cellulose casing (22 mm diameter) (Viskase Companies, Inc., Willowbrook, USA) or polyvinylidene casing (55 mm diameter) (Krehalon Industrie B.V., Deventer, Holland). The samples were vacuum packaged in a Cryovac Corace Packaging VS 26 (Cryovac Europe, Kriens, Switzerland) before treatments. Batters with MTGase were treated no later than 10 min after enzyme was added. Samples without enzyme were produced under the same conditions.

## 2.2. High pressure and thermal treatments

A discontinuous isostatic press ACB (GEC Alsthom, Nantes, France) was used for HP processing at 500 MPa for 30 min at 40 °C. The time needed to achieve the treatment pressure was ca. 120 s and the decompression time was ca. 30 s. The pressure chamber (22 cm height, 10 cm diameter) and the water inside were held at the indicated temperature, by circulating hot water through a coil around the walls of this chamber. Another batch of samples was treated at 40 °C in a water bath for the same amount of time at atmospheric pressure (0.1 MPa). A third treatment was performed at room temperature (20 °C) at 0.1 MPa. Finally, all samples were heated in a water bath to assure an internal temperature of 75 °C for 5 min to inactivate the added enzyme (Ando et al., 1989) and cooled in water. For the heat treatment, samples were heated to 75 °C (Thermometer 638 Pt, Crison Instruments, S.A., Barcelona, Spain) for 30 min in a water bath and then cooled. Samples without enzyme were treated under the same pressure and heat conditions. All treated samples were stored at 4 °C for their analysis. These experiments were performed twice.

## 2.3. Proximate analysis and pH

Moisture, ash and total nitrogen of the raw meat, batters and treated samples were quantified in triplicate (Association of Official Analytical Chemists, 1990). Fat content was estimated by difference. A conversion factor of 6.25 was used for protein content. The pH was measured in triplicate using a portable pH meter Mod. 507-05 (Crison Instruments, S.A. Barcelona, Spain) on a homogenate of 5 g sample in 50 ml distilled water at 20 °C. All chemicals were from Panreac (Barcelona, Spain).

## 2.4. Expressible moisture

Coarsely chopped sample (ca. 1.5 g) ( $W_i$ ) wrapped with a Whatman No. 1 filter paper was placed in a centrifuge tube and submitted to 4000g for 10 min at 20 °C in a centrifuge Mod. J221 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA). This determination was carried out in quadruplicate. Expressible moisture ( $E_m$ ) is expressed as the ratio of moisture lost after centrifugation ( $W_f$ ) to the initial gel sample weight

$$E_m = (W_i - W_f/W_i)100.$$

## 2.5. Instrumental colour analysis

The colour of the meat gels was measured using a portable spectrophotometer Model 45/0 L Mini Scan XE<sup>™</sup> (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, USA) and expressed as  $L$  (lightness),  $a$  (redness), and  $b$  (yellowness). Six cylindrical replicates (55 mm diameter) were cut to measure the internal colour of gels. Measurements were done with reference to illuminant  $F_{cw}$  and the 10° standard observer.

## 2.6. Instrumental texture analysis

The textural characteristics of gels were analysed according to texture profile analysis (TPA) (Bourne, 1978) and force at cutting using a TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Haslemere, UK) with a 25 kg load cell ( $\pm 1$  g). Four cylindrical replicates were cut (22 mm diameter and 20 mm height) and axially compressed twice to 40% of their original height at a crosshead speed of 1 mm/s with an aluminium compression plate P50 (5 cm diameter). Force at cutting was measured with a probe HDP/BSK to six cylindrical replicates across the diameter of the gels (22 mm).

## 2.7. Confocal scanning laser microscopy

A confocal scanning laser microscope Leica DM IRE 2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) was used to observe the microstructure of gels. Gels were cut in slices of 0.5–1.0 mm and soaked in a 0.1% aqueous acridine orange solution (Panreac, Barcelona, Spain) mixed with an equal volume of 1% acetic acid for 5 min to stain the gels (Yiu, 1985). After rinsing and draining, sections were mounted in a non-fluorescent observation medium between two glass slides. The images were obtained with an oil immersion 40× lens with aperture set to 1.3. Samples were excited at 568 nm with a Kr/Ar laser for the observation (Heertje, Vandervlist, Blonk, Hendrickx, & Brakenhoff, 1987).

## 2.8. Statistical analysis

The data were analysed using the general linear model procedure of The SAS<sup>®</sup> System for Windows V 8 (SAS Institute Inc., Cary, USA). Level of significance was set for  $P < 0.05$ . Differences between each variable and treatment were determined using Duncan's multiple range test.

# 3. Results and discussion

## 3.1. Composition and pH

The proximate analysis of raw chicken meat was similar to that reported in the bibliography. Results for thigh

chicken meat were: moisture,  $74.16\% \pm 0.72$ ; protein,  $19.36\% \pm 1.99$ ; ash,  $1.11\% \pm 0.06$  and fat,  $5.37\%$ , which match the values indicated in the study of variations in muscle composition of broilers (Xiong, Cantor, Pescatore, Blanchard, & Straw, 1993). Protein contents in the dried egg white and egg yolk were  $88.5\% \pm 0.95$  and  $17.5\% \pm 0.78$ , respectively. The pH of raw meat (6.65) increased after adding the egg white and the pH of batter with MTGase was slightly more acidic (6.84) than that of samples without MTGase (6.89). Gels without enzyme had  $69.11\% \pm 0.13$  moisture and  $19.9\% \pm 1.05$  protein while gels with MTGase had  $67.7\% \pm 0.14$  moisture and  $19.3\% \pm 1.75$  protein.

### 3.2. Expressible moisture

The addition of enzyme significantly decreased the expressible moisture of samples from each treatment and was significantly higher in the non-pressurised samples, as shown in Table 1. Gels obtained by pressure without enzyme showed lower values than those produced with the enzyme added but without pressure at 20 and 40 °C. The lowest expressible moisture was obtained from the gel with added MTGase and treated by pressure, showing a synergistic effect of enzyme and pressure when they are applied at the same time. The binding properties are strongly influenced by sodium content in processed muscle foods. Higher ionic strength enhances electrostatic repulsions and causes a loosening of the myofibrillar structure, so that there is more space for water to be trapped (Whiting, 1988). Barbut and Mittal (1990) reported that reduced-salt batters were less stable because of lower extraction of salt-soluble proteins. Increased salt levels (from 0% to 2%) have also been reported to reduce the cooking loss (from 28% to 14%) in poultry meat batters (Hongsprabhas & Barbut, 1999).

The effect of pressure on binding properties of meat products depends on various factors, such as animal species, type of muscle, pH and ionic strength, level of fat and protein and treatment conditions, such as pressure, time and temperature. Jiménez Colmenero, Carballo, Fernández, Barreto, and Solas (1997) reported no differences between the water-binding properties of low-fat and high-

fat pork sausages treated at 100 MPa, whereas those treated at 300 MPa showed an increase in total cooked-out fluid and water released, which became more pronounced with a longer pressurisation time. However, poultry sausages pressurised at 500 MPa for 30 min at 50, 60, 70 or 75 °C, presented lower cooking losses than those treated at 75 °C for 30 min (Yuste et al., 1999).

The consequence of TGase on binding properties in meat products has been contradictory. Some experiments have shown that proteins in oil-in-water type emulsions can be gelled and that MTGase enhanced the emulsion stability and water uptake ability of chicken batters (Ruiz-Carrascal & Regenstein, 2002). Meanwhile, Pietrasik and Li-Chan (2002b) found that the presence of increasing levels of MTGase (0–0.6%) favourably decreased the cooking loss at different levels of sodium chloride (0–2%) in cooked pork batter gels but that low-salt batters produced gels that had poorer binding properties than gels produced with higher salt.

The addition of 0.5% MTGase, to beef homogenates, significantly decreased expressible moisture, cooking and purge loss from beef gels added with egg white (Pietrasik, 2003). Tseng et al. (2000) also reported that the yield of low salt (1%) chicken meatballs increased with higher levels (0–1%) of crude pig plasma TGase, suggesting that they had better emulsion stability and hydration properties. However, Hammer (1998) did not find a significant effect of MTGase (0.2%) for water-binding properties in finely comminuted sausages. Also, Pietrasik and Jarmoluk (2003) reported that MTGase had no effect on water-binding properties, although it increased the hardness of pork gels at higher levels of sodium caseinate. Cooking and purge losses were not appreciably affected by enzyme presence in beef gels, except when they were formulated with egg white which showed significantly lower purge losses after one week's storage compared to the samples elaborated without MTGase (Pietrasik & Li-Chan, 2002a).

Reports about the effects of egg proteins on hydration properties of meat gels have also been contradictory. Fisher (1994, chap. IV) explained that egg white participates in the formation of a protein network that enhances water-binding capacity and extends freshness of meat products. Conversely, Hammer (1992, chap. 5) reported that egg white plays no part in the structure of gels, while Carballo et al. (1995) did not find any influence on water- and fat-binding properties of pork meat batters. However, when pressure was applied at 70 °C the addition of egg white increased water binding of chicken meat batters (Fernández et al., 1998).

### 3.3. Colour

The intensity of muscle visual colour is due to its total myoglobin content. When the myoglobin content is kept constant, the colour of comminuted products is mostly influenced by processing parameters: fat content, non-meat ingredients and added or lost water. It is well known that

Table 1  
Expressible moisture of low-fat and low-salt chicken gels obtained by pressure and microbial TGase (0.3%)<sup>A</sup>

Enzyme	Pressure (MPa)	Temperature (°C)	Expressible moisture (%)
NE	0.1	20	32.5 ± 2.0 b
NE	0.1	40	36.9 ± 2.0 a
NE	500	40	24.2 ± 1.1 d
MTGase	0.1	20	27.6 ± 3.0 c
MTGase	0.1	40	28.4 ± 1.3 c
MTGase	500	40	19.1 ± 2.0 e

NE, no enzyme added; MTGase, microbial transglutaminase (0.3%).

<sup>A</sup> Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Table 2  
Hunter Lab values of low-fat and low-salt chicken gels obtained by pressure and microbial TGase (0.3%)<sup>A</sup>

Enzyme	Pressure (MPa)	Temperature (°C)	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>
NE	0.1	75	75.0 ± 0.2 a	2.64 ± 0.04 e	15.0 ± 0.2 c
NE	0.1	20	72.0 ± 4.1 b	5.91 ± 1.30 b	16.3 ± 2.2 b
NE	0.1	40	69.7 ± 0.8 c	6.72 ± 0.30 a	17.5 ± 0.6 a
NE	500	40	72.9 ± 1.0 ab	5.58 ± 0.33 bcd	16.5 ± 0.2 b
MTGase	0.1	20	73.7 ± 1.7 ab	4.98 ± 0.37 d	16.9 ± 1.5 ab
MTGase	0.1	40	71.7 ± 1.8 b	5.75 ± 1.01 bc	17.6 ± 0.2 a
MTGase	500	40	74.2 ± 1.7 a	5.11 ± 0.84 cd	17.7 ± 0.1 a

NE, no enzyme added; MTGase, microbial transglutaminase; *L\**, lightness; *a\**, redness; *b\**, yellowness.

<sup>A</sup> Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

application of high pressure, even at 5–10 °C, induces drastic changes in the colour of red muscle (Cheftel & Culioli, 1997).

Table 2 shows that there were no differences in lightness of sample obtained at 75 °C and those obtained by pressure with or without MTGase, possibly due to the inactivation step of the enzyme (75 °C for 5 min). However, samples with MTGase treated at 40 °C without pressure were lighter than those were treated without enzyme at same conditions. Non-pressurised samples without enzyme at 20 °C showed the lowest *L\** values.

The increase of *L\** values or “whitening” effect is attributed to the denaturation of the globin moiety of myoglobin. According to Zipp and Kauzmann (1973), denaturation of metmyoglobin under pressure is similar to denaturation caused by heat, acid or urea, and is partly due to the rupture of hydrophobic bonds. They found that, at 550 MPa, the denaturation was complete, rapid and no further changes were seen by spectrophotometry at higher pressures. However, Defaye, Ledward, Macdougall, and Tester (1995) reported that the degree and rate of renaturation of myoglobin solutions subjected to 7.5–8 kbars, was dependent on pH and ionic strength, suggesting that electrostatic forces dominate the protein-protein aggregation and that hydrogen bonds may also stabilise the aggregate. Compared to the standard cooking process, Yuste et al. (1999) found that 500 MPa of pressure, applied at high temperatures (50–75 °C), yielded lighter and more yellow mechanically recovered poultry meat sausages.

At atmospheric pressure, the addition of MTGase decreased the redness of samples treated at 40 and 20 °C. However, there were no significant differences in those samples treated at 500 MPa, with or without enzyme, which were more reddish than the cooked ones. Nielsen, Petersen, and Moller (1995) reported that pork meat samples with 0.4% TGase Factor XIIIa had significant lower *a\** values than the controls in raw meat treated at 37 °C for 90 min or 10 °C for 23 h without any other thermal or pressure processing. In addition, gels obtained by heat showed lesser *a\** values mainly due to globin denaturation. For example, when minced meat is subjected to pressure above 400 MPa its colour becomes much paler, due to the partial oxidation of ferrous myoglobin into ferric metmyoglobin and with possible globin denaturation (Carlez, Veciana-Nogues, & Cheftel, 1995; Cheftel & Culioli, 1997).

There were no differences in *b\** values of samples with or without MTGase treated at the same temperature and atmospheric pressure, however, pressure decreased yellowness in samples without enzyme. Meanwhile, heat treatment decreased the yellowness in relationship to all samples treated at 20 and 40 °C with or without enzyme. Pietrasik (2003) found that MTGase increased *b\** of beef gels with egg white processed at 80 °C for 14 min, however, Hammer (1998) observed a linear decrease related to the amount of the enzyme (0–0.2%) in finely comminuted cooked sausages. Both authors reported no differences in *L\** and *a\**.

Pietrasik and Li-Chan (2002b) also studied the effect of MTGase, salt and heating temperature on the colour of pork gels. While they did not find significant influence of the enzyme, yellowness and redness were inversely proportional to the salt content. Previous reports have shown that TGase had no effect on colour parameters of chicken meat products, such as döner kebabs (Kilic, 2003), low-salt chicken meat balls (Tseng et al., 2000) and pork gels (Pietrasik & Jarmoluk, 2003). No references about the effect on the meat colour were found when MTGase and pressure (500 MPa) were applied.

### 3.4. Textural properties

Table 3 shows how the enzyme addition notably modified the characteristics of the texture profile analysis in samples processed at 40 °C. However, those treated at ambient temperature did not show significant differences between samples with and without MTGase, due to the short reaction time at that temperature, which it is not the most favourable. According to Ando et al. (1989), the time required for the reaction at 20 °C is 70 and 20 min at 40 °C when there is enough substrate. In restructured meats, several authors have demonstrated the ability of MTGase to bind the meat pieces at chill or mild temperature with reaction times that vary from 2 to 5 h at 5 °C (Kuraishi et al., 1997), 90 min at 37 °C (Nielsen et al., 1995) or 60 min at 40 °C (Tsao et al., 2002).

In this study, the pressurized sample without enzyme was the softest and showed the lowest value for chewiness of all samples. These results concur with those obtained by Hayashi, Kawamura, Nakasa, and Okinaka (1989) and Okamoto et al. (1990), who showed that pressure induced

Table 3  
Textural properties of low-fat and low-salt chicken gels obtained by pressure and microbial TGase (0.3%)<sup>A</sup>

Enzyme	Pressure (MPa)	Temperature (°C)	Hardness (N)	Springiness (mm)	Cohesiveness (dimensionless)	Chewiness (N × mm)	Cutting force (N)
NE	0.1	75	35.0 ± 1.7 b	7.01 ± 0.27 d	0.535 ± 0.01 a	131.4 ± 6.5 b	6.98 ± 0.57 a
NE	0.1	20	30.1 ± 0.9 c	7.04 ± 0.10 cd	0.514 ± 0.01 c	108.9 ± 4.8 cd	6.07 ± 0.79 abc
NE	0.1	40	29.6 ± 2.0 c	7.16 ± 0.13 bc	0.518 ± 0.01 bc	110.2 ± 9.5 c	6.07 ± 0.67 abc
NE	500	40	26.8 ± 1.1 d	7.26 ± 0.11 b	0.524 ± 0.01 b	102.0 ± 4.8 d	5.96 ± 0.67 bc
MTGase	0.1	20	31.0 ± 3.0 c	7.18 ± 0.13 bc	0.521 ± 0.01 bc	116.0 ± 10.3 c	4.96 ± 0.66 d
MTGase	0.1	40	33.2 ± 0.6 b	7.29 ± 0.08 b	0.523 ± 0.01 b	127.3 ± 2.1 b	5.17 ± 1.23 cd
MTGase	500	40	42.4 ± 1.7 a	7.48 ± 0.07 a	0.540 ± 0.01 a	171.4 ± 8.2 a	6.81 ± 1.21 ab

NE, no enzyme added; MTGase, microbial transglutaminase.

<sup>A</sup> Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

protein gels were softer than heat induced ones but that they also tended toward increase in hardness and decrease in adhesiveness as pressure increased. Yuste et al. (1999) reported that pressure processing at high temperatures yielded less firm, less springy but more cohesive poultry meat sausages compared to standard cooking processing.

Addition of the enzyme at 40 °C increased the hardness and chewiness, due to the formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine bonds. Nonaka et al. (1989) proved that rabbit myosin was polymerised by MTGase, but actin was not. In experiments by Akamittath and Ball (1992) and Kim et al. (1993), polymerisation of turkey and beef actomyosin was induced by guinea pig liver TGase.

Our results are consistent with findings reported by various authors in cooked meat emulsions and meat products. Finely comminuted sausages containing 0.2% MTGase were harder and firmer than were sausages without enzyme (Hammer, 1998). Pietrasik and Li-Chan (2002a) also reported that beef gel samples with 0.5% MTGase had better textural characteristics than those without enzyme. Microbial TGase favourably increased hardness and chewiness of pork gels, but was not able to improve these parameters in low-salt products to the same levels as in high-salt ones and significant linear effects were observed for enzyme concentration (0–0.6%) on hardness and springiness (Pietrasik & Jarmoluk, 2003; Pietrasik & Li-Chan, 2002b).

Tseng et al. (2000) found that gel strength of low salt chicken meat balls increased with the addition of TGase. Chicken döner kebab also increased in hardness and chewiness with the presence of MTGase (1%) and the values were higher still when sodium caseinate was added (Kilic, 2003). Pietrasik (2003) reported that the addition of MTGase to beef gels induced greater hardness, cohesiveness, springiness and chewiness; moreover, cohesiveness increased only in samples containing egg albumen. In pork gels, springiness was also increased when 2% egg albumen was added (Pietrasik & Li-Chan, 2002a).

It can be seen in Table 3 that the combination of pressure and enzyme rendered samples with higher hardness, springiness, cohesiveness and chewiness values than samples only treated by pressure or with MTGase at atmospheric pressure at 40 °C.

Comparing the cutting force and hardness values of gels obtained at 75 °C and gels obtained by pressure and MTGase, it can be seen that the cutting forces for the two samples were very similar (6.98 and 6.81 N, respectively), while hardness was 34.99 N for heated gels and 42.43 N for the pressurised ones. This fact may be due to the different gelation process: in heat-induced gels, the outer part of gel becomes overcooked but, in the pressure-induced ones, the transmission is instantaneous and isostatic.

Pressurization at 250 or 300 MPa, of muscle proteins at 4 °C, did not induce gelation of turkey pastes. However, pressurization at 40 or 50 °C, prior to setting, increased the strength of turkey gels containing MTGase (Ashie & Lanier, 1999). Lauber, Noack, Klostermeyer, and Henle (2001a) did not detect oligomerization when  $\beta$ -lactoglobulin was incubated with MTGase under atmospheric pressure; however, it was evident when 400 MPa was applied.

Thus, we consider that the increase in hardness, chewiness, cohesiveness and springiness of gels is due to the simultaneous application of 500 MPa and MTGase. This induces structural changes in the native ovalbumin, exposing glutamyl and lysyl residues which may be buried inside their tertiary structure, and making them accessible to the acyl binding site of MTGase, which creates cross links between egg proteins and the myofibrillar proteins of meat.

In Table 3, it is clearly observed that applying MTGase and high pressure at the same time induces dramatic changes in texture. The introduction of cross-links produces structures with better hardness, chewiness and greater springiness compared to conventional heat gels. This behaviour is characteristic of a chemical gel network, whose unbreakable cross-links lead to a very high restoring force at large strains (Dickinson, 1997).

### 3.5. Microstructure

Enzymes can provide highly specific modifications in the microstructure of a biopolymer, which can result in significant changes in the macroscopic properties. Microphotographs of gels obtained by pressure, with and without enzyme, are shown in Fig. 1. The network of gel without

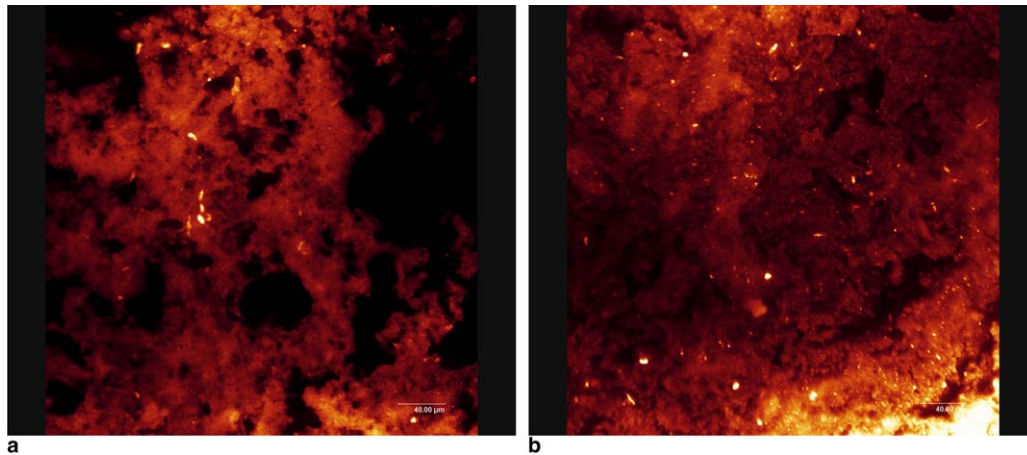


Fig. 1. Microstructure of low-fat low salt gels treated at 500 MPa and 40 °C for 30 min. (a) Without MTGase. (b) With MTGase added. Bar = 40 µm.

MTGase was loose with big, irregular holes; however, a more compact and homogeneous structure was observed when MTGase was present. These observations are coincident with those of texture: samples with MTGase that were simultaneously treated with pressure showed the highest values in overall TPA parameters, possibly due to inter- and intra-molecular  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine cross-links between egg proteins and myofibrillar proteins. This is consistent with the conclusions of Muguruma et al. (2003) on chicken sausages and with Tseng et al. (2000) who reported that low salt chicken meat balls with TGase had more regular network structures and that higher levels of TGase (1.0%) produced bigger, more complete gel clusters. Siu, Ma, and Mine (2002) Chanyongvorakul, Matsumura, Nonaka, Motoki, and Mori (1995) found large differences in the organization of gel network structures between heat- and TGase-induced gels (oat and soybean), with larger clusters and thicker strands in the latter.

#### 4. Conclusions

Microbial transglutaminase, in combination with high pressure treatment, offers possibilities for cross-linking of myofibrillar proteins with globular proteins, the latter not usually being affected by the enzyme under atmospheric pressure and, consequently, the binding properties, textural parameters, microstructure and colour of low-fat and low-salt chicken gels are enhanced. MTGase and pressure, applied simultaneously, offer a means of synthesizing new heterologous biopolymers valuable for the food industry.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by the Secretaría General del Plan Nacional de I + D (AGL2000-0357) of Spain and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of México. The authors thank Ajinomoto Co. Inc. and Degussa Texturant Systems for providing the additives and ingredients used in this study.

#### References

- Akamittath, J. G., & Ball, H. R. Jr., (1992). Transglutaminase mediated polymerization of crude actomyosin refined from mechanically deboned poultry meat. *Journal of Muscle Foods*, 3(1), 1–14.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., et al. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2613–2617.
- Ashie, I. N. A., & Lanier, T. C. (1999). High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 64(4), 704–708.
- Association of Official Analytical Chemists (1990). Meat and meat products. In: K. Helrich (Ed.), *Official methods of analysis* (15th ed., Vol. II, pp. 931–948). Arlington: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Barbut, S., & Mittal, G. S. (1990). Effect of heating rate on meat batter stability, texture and gelation. *Journal of Food Science*, 55(2), 334–337.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(7), 62–66, 72.
- Carballo, J., Barreto, G., & Jiménez Colmenero, F. (1995). Starch and egg white influence on properties of bologna sausage as related to fat content. *Journal of Food Science*, 60(4), 673–677.
- Carballo, J., Fernandez, P., Barreto, G., Solas, M. T., & Colmenero, F. J. (1996). Morphology and texture of bologna sausage as related to content of fat, starch and egg white. *Journal of Food Science*, 61(3), 652–655.
- Carlez, A., Veciana-Nogues, T., & Cheftel, J. C. (1995). Changes in color and myoglobin of minced beef meat due to high-pressure processing. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(5), 528–538.
- Chanyongvorakul, Y., Matsumura, Y., Nonaka, M., Motoki, M., & Mori, T. (1995). Physical properties of soy bean and broad bean 11S globulin gels formed by transglutaminase reaction. *Journal of Food Science*, 60(3), 483–488.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46(3), 211–236.
- De Jong, G. A. H., & Koppelman, S. J. (2002). Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *Journal of Food Science*, 67(8), 2798–2806.
- Defaye, A. B., Ledward, D. A., Macdougall, D. B., & Tester, R. F. (1995). Renaturation of metmyoglobin subjected to high isostatic pressure. *Food Chemistry*, 52(1), 19–22.
- Dickinson, E. (1997). Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends in Food Science and Technology*, 8(10), 334–339.



- Fernández, P., Cofrades, S., Solas, M. T., Carballo, J., & Jiménez Colmenero, F. (1998). High pressure-cooking of chicken meat batters with starch, egg white, and iota carrageenan. *Journal of Food Science*, 63(2), 267–271.
- Fisher, A. (1994). Tecnología de elaboración y producción de productos cárnicos. In O. Prändl (Ed.), *Tecnología e Higiene de la Carne* (pp. 511–625). Zaragoza: Acribia.
- Gilleland, G. M., Lanier, T. C., & Hamann, D. D. (1997). Covalent bonding in pressure-induced fish protein gels. *Journal of Food Science*, 62(4), 713–716, 733.
- Hammer, G. F. (1992). Sustancias aditivas y aditivos. In F. Wirth (Ed.), *Tecnología de los Embutidos Escaldados* (pp. 83–106). Zaragoza: Acribia.
- Hammer, G. F. (1998). Microbial transglutaminase and diphosphate in finely comminuted cooked sausage. *Fleischwirtschaft*, 78(11), 1155–1156, 1159–1162, 1186.
- Hayashi, R., Kawamura, Y., Nakasa, T., & Okinaka, O. (1989). Application of high-pressure to food processing: pressurization of egg-white and yolk, and properties of gels formed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), 2935–2939.
- Heertje, I., Vandervlist, P., Blonk, J. C. G., Hendrickx, H. A. C. M., & Brakenhoff, G. J. (1987). Confocal scanning laser microscopy in food research: some observations. *Food Microstructure*, 6(2), 115–120.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9(5), 197–203.
- Hongsprabhas, P., & Barbut, S. (1999). Effect of pre-heated whey protein level and salt on texture development of poultry meat batters. *Food Research International*, 32(2), 145–149.
- Jiménez Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 11(2), 56–66.
- Jiménez Colmenero, F. (2002). Muscle protein gelation by combined use of high pressure/temperature. *Trends in Food Science and Technology*, 13(1), 22–30.
- Jiménez Colmenero, F., Barreto, G., Fernandez, P., & Carballo, J. (1996). Frozen storage of bologna sausages as a function of fat content and of levels of added starch and egg white. *Meat Science*, 42(3), 325–332.
- Jiménez Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59(1), 5–13.
- Jiménez Colmenero, F., Carballo, J., Fernandez, P., Barreto, G., & Solas, M. T. (1997). High-pressure-induced changes in the characteristics of low-fat and high-fat sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), 61–66.
- Keeton, J. T. (1994). Low-fat meat products: technological problems with processing. *Meat Science*, 36(1–2), 261–276.
- Kilic, B. (2003). Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken döner kebab. *Meat Science*, 63(3), 417–421.
- Kim, S. H., Carpenter, J. A., Lanier, T. C., & Wicker, L. (1993). Polymerization of beef actomyosin induced by transglutaminase. *Journal of Food Science*, 58(3), 473–474, 491.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., & Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62(3), 488–490, 515.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K., & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17(2), 221–246.
- Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H., & Henle, T. (2001a). Oligomerization of beta-lactoglobulin by microbial transglutaminase during high pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 213(3), 246–247.
- Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H., & Henle, T. (2001b). Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 213(4–5), 273–276.
- Lee, E. Y., & Park, J. (2002). Pressure inactivation kinetics of microbial transglutaminase from *Streptovorticillum mobaraense*. *Journal of Food Science*, 67(3), 1103–1107.
- Lee, E. Y., & Park, J. (2003). Microbial transglutaminase induced cross-linking of a selected comminuted muscle system – processing conditions for physical properties of restructured meat. *Food Science and Biotechnology*, 12(4), 365–370.
- Motoki, M., Okiyama, A., Nonaka, M., Tanaka, H., Uchio, R., Matsuura, A., et al. (1990). Novel transglutaminase. Ajinomoto Co. Inc. & Amano Pharmaceutical Co. Ltd. European Patent Application (EP 0 379 606 A1).
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9(5), 204–210.
- Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., et al. (2003). Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Science*, 63(2), 191–197.
- Nielsen, G. S., Petersen, B. R., & Moller, A. J. (1995). Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F-XIIIa) on the texture of restructured meat. *Meat Science*, 41(3), 293–299.
- Nielsen, P. M. (1995). Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnology*, 9(3), 119–156.
- Nio, N., Motoki, M., & Takinami, K. (1985). Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(8), 2283–2286.
- Nonaka, M., Ito, R., Sawa, A., Motoki, M., & Nio, N. (1997). Modification of several proteins by using Ca<sup>2+</sup> independent microbial transglutaminase with high pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 11(3), 351–353.
- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K., et al. (1989). Polymerization of several proteins by Ca<sup>2+</sup> independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2619–2623.
- Okamoto, M., Kawamura, Y., & Hayashi, R. (1990). Application of high-pressure to food-processing: textural comparison of pressure and heat induced gels of food proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 183–189.
- Pietrasik, Z. (2003). Binding and textural properties of beef gels processed with kappa-carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase. *Meat Science*, 63(3), 317–324.
- Pietrasik, Z., & Jarmoluk, A. (2003). Effect of sodium caseinate and kappa-carrageenan on binding and textural properties of pork muscle gels enhanced by microbial transglutaminase addition. *Food Research International*, 36(3), 285–294.
- Pietrasik, Z., & Li-Chan, E. C. Y. (2002a). Binding and textural properties of beef gels as affected by protein, kappa-carrageenan and microbial transglutaminase addition. *Food Research International*, 35(1), 91–98.
- Pietrasik, Z., & Li-Chan, E. C. Y. (2002b). Response surface methodology study on the effects of salt, microbial transglutaminase and heating temperature on pork batter gel properties. *Food Research International*, 35(4), 387–396.
- Ruiz-Carrascal, J., & Regenstein, J. (2002). Emulsion stability and water uptake ability of chicken breast muscle proteins as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 67(2), 734–739.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Kawajiri, H., & Motoki, M. (1995). Epsilon (gamma-glutamyl) lysine cross-link distribution in foods as determined by improved method. *Journal of Food Science*, 60(2), 416–419.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., & Motoki, M. (1994). Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *Journal of Food Science*, 59(4), 866–871.
- Serrano, A., Cofrades, S., & Jiménez Colmenero, F. (2004). Transglutaminase as binding agent in fresh restructured beef steak with added walnuts. *Food Chemistry*, 85(3), 423–429.
- Siu, N. C., Ma, C. Y., & Mine, Y. (2002). Physicochemical and structural properties of oat globulin polymers formed by a microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2660–2665.

- Smith, D. M. (1988). Meat proteins: functional properties in comminuted meat-products. *Food Technology*, 42(4), 116–121.
- Trespalacios, M.P., Mor-Mur, M., Saldo, J., Yuste, J., Beltran, E., & Pla, R. (2002). Optimization of the composition and process conditions to obtain a fine paste of chicken meat by means of high isostatic pressure. In: Proceedings of II Congreso Español de Ingeniería de Alimentos (p. 187), 18 September 2002, Lleida, Spain.
- Tsao, C. Y., Kao, Y. C., Hsieh, J. F., & Jiang, S. T. (2002). Use of soy protein and microbial transglutaminase as a binder in low-sodium restructured meats. *Journal of Food Science*, 67(9), 3502–3506.
- Tseng, T. F., Liu, D. C., & Chen, M. T. (2000). Evaluation of transglutaminase on the quality of low-salt chicken meat-balls. *Meat Science*, 55(4), 427–431.
- Uresti, R. M., Velazquez, G., Vázquez, M., Ramírez, J. A., & Torres, J. A. (2006). Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chemistry*, 94(2), 202–209.
- Whiting, R. C. (1988). Ingredients and processing factors that control muscle protein functionality. *Food Technology*, 42(4), 104–110.
- Xiong, Y. L., Cantor, A. H., Pescatore, A. J., Blanchard, S. P., & Straw, M. L. (1993). Variations in muscle chemical composition, pH, and protein extractability among eight different broiler crosses. *Poultry Science*, 72(3), 583–588.
- Yiu, S. H. (1985). A fluorescence microscopic study of cheese. *Food Microstructure*, 4(1), 99–106.
- Yuste, J., Mor-Mur, M., Capellas, M., Guamis, B., & Pla, R. (1999). Mechanically recovered poultry meat sausages manufactured with high hydrostatic pressure. *Poultry Science*, 78(6), 914–921.
- Zipp, A., & Kauzmann, W. (1973). Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry*, 12(21), 4217–4228.

---

---

**3. Synergistic action of of transglutaminase and high pressure on  
chicken meat and egg gels in absence of phosphates**

Pilar Trespacios and Reyes Pla, 2007

Food Chemistry 104(4), 1718-1727

# Synergistic action of transglutaminase and high pressure on chicken meat and egg gels in absence of phosphates

Pilar Trespalacios, Reyes Pla \*

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

Received 28 September 2006; received in revised form 10 November 2006; accepted 15 January 2007

## Abstract

The effects of simultaneous application of microbial transglutaminase (MTGase) and high pressure (HP) (500, 700 and 900 MPa/40 °C/30 min), only pressure under the same conditions or heat (75 °C/30 min) were investigated on chicken batters with the addition of egg components and without phosphates. MTGase gels (700 and 900 MPa) showed marked increases in textural parameters compared to gels without enzyme (NE) or those obtained by heat. The addition of enzyme did not show differences between gels obtained at 700–900 MPa; however, gels obtained at 500 MPa were darker and more reddish than those obtained by heat. MTGase gels were more homogeneous and compact. Thermal analysis revealed that pressure levels above 700 MPa caused as much denaturing as did heat. The microstructure and texture of MTGase gels suggest that a higher amount and heterogeneity of crosslinks was produced when meat and egg proteins were treated in the presence of MTGase under specific conditions of pressure.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Microbial transglutaminase; High pressure; Chicken meat; Egg components; Gelation

## 1. Introduction

The growing consumer demand for healthier products has stimulated the development of low-fat meats and meat products, which include some factors associated with raw materials, reformulation of products and technological processes. Consumer demand for processed poultry meat has increased, due to its low-fat content; however, sausages made from chicken meat do not provide desirable gel strength and the use of additives traditionally employed in the meat industry, such as salt and phosphates, is being reduced for health reasons.

Sodium chloride plays a key role in the solubility of myofibrillar proteins required for subsequent denaturation and aggregation to give proper water–fat retention and acceptable textural properties of meat gels. Phosphates

act on muscle proteins by increasing pH and ionic strength, which augment the solubility of myofibrillar proteins through actomyosin dissociation and depolymerization of thick and thin filaments. Partial replacement of NaCl by phosphates in low sodium formulations has been effectively used in the meat industry, reducing the negative effect of lower salt levels and improving sensorial and technological properties (Fernández Martín, Cofrades, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2002). Phosphate usage is limited to 0.5% in countries such as the USA and Canada and totally prohibited in Germany for meat products. This limitation is mainly imposed to restrict water addition; however, a level above 0.5% can also cause off-flavours, reported by consumers as metallic and soapy flavours (Barbut, 2002).

In recent years, high pressure (HP) has been increasingly investigated as a method of altering the functional properties of macromolecules and is a powerful tool for the study of proteins and modulation of enzymatic activity (Mozhaev, Heremans, Frank, Masson, & Balny, 1996). This process causes a series of physicochemical changes

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 5814112; fax: +34 93 5811494.  
E-mail addresses: [pilitres@yahoo.com](mailto:pilitres@yahoo.com) (P. Trespalacios), [reyes.pla@uab.cat](mailto:reyes.pla@uab.cat) (R. Pla).

in meat proteins, from solubility to aggregation, depending on processing conditions and system characteristics (Chapleau, Mangavel, Compoint, & de Lamballerie-Anton, 2004), improving meat binding properties and partially compensating for NaCl reduction (de Lamballerie-Anton, Taylor, & Culioli, 2002, Chap. 16). Several studies have demonstrated that meat gels obtained by HP are generally softer than are heat-induced gels (Jiménez Colmenero, 2002), so, some non-meat proteins or hydrocolloids have been added to increase the gel strength.

On the other hand, the enzyme transglutaminase (TGase; EC 2.3.2.13) can catalyse the formation of intra and inter molecular  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine crosslinks between food proteins, which have unique effects on protein properties, gelation capability, thermal stability and water-holding capacity (Kuraishi, Yamazaki, & Susa, 2001), depending on the macromolecular structure of each substrate. Nonaka, Ito, Sawa, Motoki, and Nio (1997) and Lauber, Noack, Klostermeyer, and Henle (2001) found that MTGase was capable to create crosslinks under pressure and Lee and Park (2002) observed that a 60% of initial MTGase activity was maintained, even after pressurization at 600 MPa/60 min, indicating that the enzyme was pressure-resistant.

Dried egg white has been used as a fat substitute due to the elevated crude protein concentration, the higher gel strength and its ability to stabilize batters. However, ovalbumin has proved to be a poor substrate for MTGase because of its compact structure (Sakamoto, Kumazawa, & Motoki, 1994) but egg yolk is a better one. As for heat-denaturation, HP induces changes in egg white functionality, such as foaming and gelling, and affects the structural properties. Smith, Galazka, Wellner, and Sumner (2000) observed irreversible changes in the  $\beta$  structure of the protein above 400 MPa consistent with previous reports about the  $\alpha$ -helix of the ovalbumin, which was reduced slightly by HP treatment. The pressure causes the protein hydrophobic core to become more exposed and thus more readily available for the MTGase action.

In a previous study (Trespalacios & Pla, 2007), customary levels (0.3%) of sodium tripolyphosphates and NaCl (1.5%) were used to obtain low-fat and low-salt chicken gels. Synergistic effects on texture and expressible moisture were observed when HP and MTGase were applied simultaneously; therefore the possibility of reducing, even more, the salt content and eliminating the phosphates was considered.

There are few studies regarding low-fat and low-salt meat gels without phosphates produced by HP or with MTGase at atmospheric pressure; moreover, there are no reports on the application of HP and MTGase combined on meat systems. However, it is necessary to thoroughly investigate the simultaneous application of MTGase and HP, at higher levels of pressure, on meat products to better understand the mechanism involved. The objective of this study was to evaluate the simultaneous effects of MTGase and HP (500, 700 and 900 MPa) on chicken meat and egg

batters without phosphates and with a low content of sodium chloride.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Fresh chicken legs and eggs were purchased from a local market (Corporación Alimentaria Guissona, S.A., Guissona, Spain). Dehydrated egg white was kindly supplied by Degussa Texturant Systems (Barcelona, Spain) and Transglutaminase Activa™ WM (Ajinomoto Co. Inc., Tokyo, Japan) by Impex Química, S.A. (Barcelona, Spain). The commercial product contains 99% maltodextrins and 1% MTGase with an activity of 100 units/g. According to Ajinomoto's specifications, one unit is the amount of the enzyme that catalyses the formation of 1  $\mu$ mol of hydroxamic acid/min at 37 °C. In the present study, the enzyme concentration is reported as the commercial product concentration and referred to as % MTGase. Nojax® cellulose casing (22 mm diameter) and polyvinylidene casing (55 mm diameter) were obtained from Viskase Companies, Inc. (Willowbrook, USA) and Krehalon Industrie B.V. (Deventer, Holland). All chemicals for the proximate analysis, pH and microstructure were from Panreac Química, S.A. (Barcelona, Spain).

### 2.2. Preparation of low-fat and low-salt chicken gels

Skinless, boneless chicken leg (thigh and drumsticks) meat was trimmed to remove visible fat and connective tissue, ground twice through 6 and 3 mm plates in a mincer Mod. PC-22 (Sammic, S.L., Azpeitia, Spain), then mixed with NaCl (1.0% w/w total formulation) and left to stand for 18 h at 4 °C. The mixture was homogenized with 10% fresh egg yolk, 10% dehydrated egg white and cold water (30%) in a homogenizer Mod. UMC 5 (Stephan Machinery GmbH & Co., Hameln, Germany) at 1800 rpm for 12 min in 80% vacuum. The final temperature of the batters never exceeded 12 °C. Samples with enzyme were treated with 0.3% w/w of the commercial MTGase preparation. Immediately after this, the batters were stuffed into cellulose or polyvinylidene casings by means of a sausage filler Mod. TWF-6 (Dick GmbH, Deizisau, Germany). The samples were vacuum-packaged in a Cryovac Corace Packaging VS 26 (Cryovac Europe, Kriens, Switzerland) before treatments. Batters with MTGase were treated no later than 10 min after enzyme was added. Samples without enzyme were processed under the same conditions.

### 2.3. High pressure and thermal treatments

A discontinuous high pressure pilot unit "Food-Lab" Food Processor Model S-FL-850-9W (Stansted Fluid Power, Ltd., Essex, UK) was used for processing at 500, 700 and 900 MPa at 40 °C for 30 min. The times needed to achieve the pressure treatment were 120, 170 and

285 s, respectively, and the decompression time was from 30 to 60 s. The pressure chamber and the water inside were held at 40 °C by circulating hot water through a coil around the walls of this chamber. Finally, all samples were heated in a water bath to assure an internal temperature of 75 °C for 5 min, in order to inactivate the added enzyme, and then cooled in water. For the heat treatment, samples were heated at 75 °C for 30 min in a water bath and then cooled (Thermometer 638 Pt, Crison Instruments, S.A., Barcelona, Spain). Samples without enzyme were treated under the same pressure and heat inactivation conditions. All treated samples were stored at 4 °C prior to their analysis. These experiments were performed twice.

#### 2.4. Yield determination

Gel samples were tempered to 20 °C and removed from the casing, blotted dry with a paper towel and weighed for yield determination, which was expressed as a percentage by calculating as the weight of sample treated by heat or pressure divided by the weight of the non-treated sample.

#### 2.5. Proximate analysis and pH

Moisture, ash and total nitrogen of raw meat, batters and treated samples were quantified in triplicate (Association of Official Analytical Chemists, 1990, Chap. 39). Fat content was estimated by difference. A conversion factor of 6.25 was used for protein content. The pH was measured in triplicate on a homogenate of 5 g of sample in 50 ml distilled water at 20 °C, using a portable pHmeter Mod. 507-05 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, Spain).

#### 2.6. Expressible moisture

Coarsely chopped sample (ca. 1.5 g) ( $W_i$ ), wrapped with a Whatman No. 1 filter paper, was placed in a centrifuge tube and submitted to 4000g for 10 min at 20 °C in a centrifuge Mod. J221 (Beckman Coulter, Inc., Fullertone, USA) and then weighed ( $W_f$ ). This determination was carried out in quadruplicate. Expressible moisture ( $E_m$ ) was expressed as the ratio of moisture lost after centrifugation to the initial gel sample weight:

$$E_m = (W_i - W_f / W_i) 100$$

#### 2.7. Instrumental colour analysis

The colour of gels was measured using a portable spectrophotometer Model 45/0 L Mini Scan XE™ (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, USA) and expressed as  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (redness), and  $b^*$  (yellowness). Six cylindrical replicates (55 mm diameter) were cut to measure the internal colour. Measurements were done with reference to the illuminant  $F_{cw}$  and the 10° standard observer.

#### 2.8. Instrumental texture analysis

The textural characteristics of gels (22 mm diameter) were analysed according to the texture profile analysis (TPA) and cutting force using a TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Haslemere, UK) with a 25 kg load cell ( $\pm 1$  g). Six cylindrical replicates were cut (20 mm height) and axially compressed twice to 40% of their original height at a crosshead speed of 1 mm/s with an aluminium compression plate P50 (5 cm diameter). Cutting force was measured with a probe HDP/BSK in six cylindrical replicates.

#### 2.9. Confocal scanning laser microscopy

A confocal scanning laser microscope Leica DM IRE 2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) was used to observe the microstructure of gels. Gels were cut in slices of 0.5–1.0 mm and soaked in a 0.1% aqueous acridine orange solution (Panreac, Barcelona, Spain) mixed with an equal volume of 1% acetic acid for 5 min to stain the gels. After rinsing and draining, sections were mounted in a non-fluorescent observation media between two glass slides. The images were obtained with a 10X objective with aperture 0.4. Samples were excited at 568 nm with a Kr/Ar laser.

#### 2.10. Thermal analysis

The chicken meat, egg yolk and untreated batter were subjected to differential scanning calorimetry (DSC). The dried egg white and lyophilized gels (10–15 mg) were scanned after dialyzing against deionized water at 4 °C for 24 h and temperature of 20 °C. DSC was performed on a Mettler Toledo Module Type DSC 821<sub>c</sub>/700 (Mettler Toledo GmbH, Germany). Samples were weighed in aluminium pans (40  $\mu$ l) and then sealed with a crimper. Deionized water was used as reference. For temperature ( $T$ ) and enthalpy ( $\Delta H$ ) calibration, two standards were used: gallium ( $T = 29.8$  °C,  $\Delta H = 80.22$  J/g) and indium ( $T = 156.6$  °C,  $\Delta H = 28.46$  J/g). The heating conditions of samples were in the range 20–100 °C, at a heating rate of 10 °C/min, except for chicken meat samples, which were in the range 20–90 °C (Kijowski & Mast, 1988). The Star<sup>c</sup> System V 6.1 software was used to obtain the plots of heat flow versus temperature and to calculate the temperature of extrapolated onset ( $T_o$ ), temperature of maximum transition ( $T_m$ ) and  $\Delta H$  of at least three replicates.

#### 2.11. Statistical analysis

Data were analysed using the General Linear Model Procedure of The SAS<sup>®</sup> System for Windows V 8 (SAS Institute Inc., Cary, USA). Level of significance was set for  $P \leq 0.05$ . Differences between variables and treatments were determined using a studentized maximum modulus (GT2) test.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Proximate analysis and pH

Proximate analyses and pH of raw chicken leg meat, batters and gels are shown in Table 1. These results agree with the study on variations in muscle composition of broilers of Xiong, Cantor, Pescatore, Blanchard, and Straw (1993). A low level of lipids was expected since external fat was trimmed off from the meat before mincing, which agrees with Lan et al. (1995) who found less than 4% of lipids in broiler's breast and thigh muscles. An increase in the pH of batters was due to egg white addition.

#### 3.2. Yield and expressible moisture

As shown in Fig. 1, gels without MTGase obtained by pressure (NE) and gels obtained by heat had higher yield values (99–99.8% and 97.7%, respectively) than had gels with MTGase and pressure (94.2–95.4%). Heat generates structures mainly stabilized by disulfide bonds and hydrophobic interactions, while HP promotes hydrogen bonds, which gives better hydration properties than does heat (Angsupanich, Edde, & Ledward, 1999).

Poultry sausages pressurized at 500 MPa for 30 min at 50, 60, 70 or 75 °C, presented lower cooking loss than did those treated at 75 °C for 30 min (Yuste, Mor-Mur, Capellas, Guamis, & Pla, 1999). Fernández Martín et al. (2002) showed that pressurization (400 MPa/70 °C/30 min) of pork batters produced a partial denaturation and both salt-soluble and -insoluble proteins remained native after the treatment.

Enzyme addition increased the expressible moisture. For identical pressure, NE gels showed lower values than did MTGase gels. MTGase gels, obtained at 500 MPa, showed the highest values and were unlike those reported in our previous study (Trespalacios & Pla, 2007) where we found a lower expressible moisture in the pressure MTGase gel, showing a synergistic effect of enzyme and pressure when applied simultaneously. The NaCl reduction from 1.5% to 1.0% and the absence of phosphates in this study decreased the ionic strength and consequently the water-holding properties. However, the expressible moisture was favourably reduced in MTGase gels obtained at 700 and 900 MPa.

Although MTGase gels had lower yield values than had NE or heat gels, they were higher than those reported in

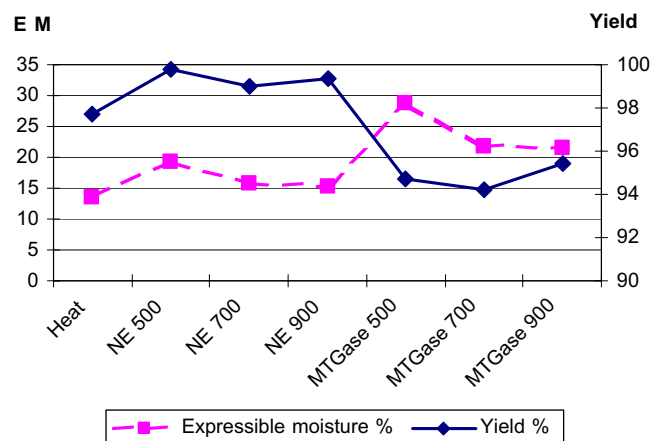


Fig. 1. Expressible moisture (EM) and yield (Y) of chicken meat and egg gels without phosphates; obtained by heat (75 °C/30 min), by pressure (NE) (500 MPa, 700 MPa or 900 MPa) and by pressure and microbial transglutaminase (0.3%) (MTGase).

low-salt chicken meatballs with pig plasma TGase (0.4–1%) and phosphates (Tseng, Liu, & Chen, 2000) and those of chicken döner kebab with MTGase and sodium caseinate (Kilic, 2003). Pietrasik (2003) reported similar results in beef gels with egg white and phosphates in cooked samples with MTGase.

The results of MTGase addition to meat products at atmospheric pressure have been contradictory. Pietrasik (2003) found that the addition of 0.5% MTGase to beef homogenates decreased the binding properties of gels with egg white and Lee and Park (2003) observed a slight reduction in water-holding of restructured meat with MTGase; however, in cooked pork gels, the increase of NaCl (0–2%) produced gels with better binding properties (Pietrasik & Li-Chan, 2002b). Other studies revealed no significant effect of MTGase (Hammer, 1998; Pietrasik & Li-Chan, 2002a). It is possible that these differences between authors were due to the temperature applied.

Reports concerning the effect of egg proteins on hydration properties of meat gels obtained by heat at atmospheric pressure have also been inconsistent; however, when pressure (400 MPa) was applied at 70 °C, the addition of egg white increased the water-binding of chicken meat batters (Fernández, Cofrades, Solas, Carballo, & Jiménez Colmenero, 1998). There are no studies about the effect of egg proteins mixed with meat proteins at pressure levels above 400 MPa.

Table 1

Proximate analysis and pH of raw chicken meat, chicken meat and egg batters and gels obtained by pressure: without enzyme (NE) and with microbial transglutaminase (MTGase) (0.3%)

Sample	Moisture (%)	Ash (%)	Protein (%)	Fat (%)	pH
Raw chicken meat	74.16 ± 0.72 a	1.10 ± 0.00 b	20.8 ± 1.40 b	3.98	6.38
Chicken and egg batters	72.56 ± 0.19 b	2.12 ± 0.01 a	21.1 ± 0.78 a	4.26	6.66
NE gels	71.02 ± 0.00 b	2.17 ± 0.01 b	19.3 ± 0.63 c	7.59	6.82
MTGase gels	68.70 ± 0.14 c	2.09 ± 0.02 a	20.5 ± 0.86 a	8.71	6.81

Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Recent studies have shown that the most pronounced changes in ovalbumin are observed in the pressure range 400–700 MPa, such as an increase in surface hydrophobicity, exposed SH content and susceptibility to enzymatic hydrolysis, while protein solubility, total SH content, denaturation enthalpy and trypsin inhibitory activity all decrease (Van der Plancken, Van Loey, & Hendrickx, 2005a).

We consider that HP at 500 MPa allows MTGase to establish intermolecular crosslinks between ovalbumin and myosin. In our study, the gels obtained at 700 and 900 MPa had better water-binding properties than had those obtained at 500 MPa. The higher expressible moisture at 500 MPa (approx 7%) could be explained by an incomplete network structure between egg and meat proteins, surrounded by non-incorporated liquid. A similar pattern was obtained for the NE pressurized samples (approx 4%).

### 3.3. Colour

The NE and MTGase samples pressurized at 700 and 900 MPa showed similar  $L^*$  values. All samples treated at 500 MPa were darker than were those treated at 700 MPa, 900 MPa and the heat-treated samples (Table 2). This shows that lightening depends mainly on the pressure applied, not on the enzyme. There were no differences in redness or yellowness in NE and MTGase samples treated at 700 and 900 MPa but MTGase samples, treated at 500 MPa, showed the highest  $a^*$  and  $b^*$  values, while pressurized samples kept the redness better than did heated ones.

It is well known that myoglobin is responsible for the intensity of muscle colour and that the application of HP, even at 5–10 °C, induces drastic changes. The discoloration through pressure-processing may result from a “whitening” effect in the range 200–350 MPa, due to globin denaturation and/or to heme displacement or release, and to the oxidation of ferrous myoglobin to ferric metmyoglobin above 400 MPa (Cheftel & Culioli, 1997). Jung, Ghoul, and de Lamballerie-Anton (2003) found that, in beef meat, the pressure intensity is more significant than is the holding time for redness, total colour difference and metmyoglobin

content and that pressure above 300 MPa induces changes in colour parameters, such as a decrease of the total colour difference.

There are no references about the effect of MTGase on meat colour when it is applied simultaneously with HP; however, some studies have been conducted at atmospheric pressure. Tseng et al. (2000) found that addition of 1% pig plasma TGase did not produce significant differences in the colour of low-salt chicken meat balls cooked at 71 °C. Kilic (2003) reported non-significant differences between samples of döner kebab treated with MTGase and sodium caseinate and Lee and Park (2003) observed no changes in restructured meat. Nevertheless, we found an increase in yellowness of MTGase samples treated at 500 MPa, which agrees with Pietrasik (2003), who reported that, while the enzyme addition (0.5%) had no significant influence on the  $L^*$  and  $a^*$  values of beef gels processed by heat, the presence of egg white increased the  $b^*$  parameter.

### 3.4. Textural properties

Pressured MTGase gels were the hardest and presented the highest chewiness and cutting force of all; moreover, there were no significant differences between gels obtained at 700 and 900 MPa, which registered the highest values. MTGase samples, treated at 700 and 900 MPa, were the most cohesive and resistant to cutting. All gels (NE and MTGase) obtained at 500 MPa had the lowest cohesiveness (Table 3).

In a previous study, pressure treatments at 500 MPa in the presence of MTGase produced more protein crosslinks than did MTGase at 0.1 MPa (Trespalacios & Pla, 2007). Our results suggest that higher pressure levels applied on meat and egg proteins in the presence of MTGase induced a larger number of intra and inter molecular  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine bonds. It seems that the increase in hardness, chewiness, and cohesiveness is due to the formation of a heterologous complex. Pressurization (300 MPa), prior to setting of turkey pastes with MTGase, induced gelation at 40 or 50 °C but not at 4 °C (Ashie & Lanier, 1999). Chupleau et al. (2004) did not find changes in the secondary structure of myofibrillar proteins after processing from

Table 2

Hunter Lab values of chicken meat and egg gels without phosphates; obtained by heat (75 °C/30 min), by pressure (NE) (500 MPa, 700 MPa or 900 MPa) and by pressure and microbial transglutaminase (0.3%) (MTGase)

Sample	Pressure (MPa)	Temperature (°C)	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Heat	0.1	75	77.09 ± 0.33 b	2.64 ± 0.04 d	14.96 ± 0.16 b
NE	500	40	72.35 ± 0.45 c	4.20 ± 0.27 b	15.24 ± 0.15 b
NE	700	40	76.91 ± 0.62 b	3.22 ± 0.24 c	13.58 ± 0.13 c
NE	900	40	78.08 ± 0.35 a	3.16 ± 0.06 c	13.49 ± 0.08 c
MTGase	500	40	74.77 ± 0.28 c	5.14 ± 0.31 a	16.56 ± 0.11 a
MTGase	700	40	78.22 ± 0.15 a	3.25 ± 0.02 c	15.39 ± 0.15 b
MTGase	900	40	78.07 ± 0.17 a	3.21 ± 0.04 c	15.31 ± 0.08 b

$L^*$  = Lightness,  $a^*$  = Redness,  $b^*$  = Yellowness.

Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



Table 3

Textural properties of chicken meat and egg gels without phosphates; obtained by heat (75 °C/30 min), by pressure (NE) (500 MPa, 700 MPa or 900 MPa) and by pressure and microbial transglutaminase (0.3%) (MTGase)

Sample	Pressure (MPa)	Temperature (°C)	Hardness (N)	Springiness (mm)	Cohesiveness (dimensionless)	Chewiness (N mm)	Cutting force (N)
Heat	0.1	75	36.05 ± 0.59 c	6.99 ± 0.24 b	0.538 ± 0.00 cd	135.77 ± 4.09 c	7.26 ± 0.11 bc
NE	500	40	30.48 ± 1.34 d	7.40 ± 0.20 ab	0.515 ± 0.00 f	116.38 ± 5.88 d	5.82 ± 0.43 d
NE	700	40	36.70 ± 2.41 c	7.32 ± 0.19 ab	0.545 ± 0.00 c	146.63 ± 9.65 c	6.03 ± 0.19 c
NE	900	40	36.19 ± 1.39 c	7.25 ± 0.13 ab	0.547 ± 0.00 c	143.61 ± 3.25 c	6.42 ± 0.47 c
MTGase	500	40	44.63 ± 1.45 b	7.57 ± 0.21 a	0.527 ± 0.01 e	178.02 ± 4.68 b	7.98 ± 1.19 b
MTGase	700	40	55.43 ± 4.05 a	7.32 ± 0.08 ab	0.573 ± 0.00 a	232.85 ± 16.39 a	11.5 ± 0.71 a
MTGase	900	40	57.58 ± 2.62 a	7.32 ± 0.14 ab	0.558 ± 0.00 b	235.50 ± 9.29 a	11.4 ± 0.85 a

Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

50 to 600 MPa at 20 °C for 10 min; however, there was aggregation at pressures above 300 MPa.

Ovalbumin is stable until 60 °C and remains fairly stable when pressurized at 400 MPa for 30 min, which may be due to the presence of a single disulfide bond (SS), four sulfhydryl (SH) groups and strong non-covalent interactions stabilizing the three dimensional structure (Galazka, Dickinson, & Ledward, 2000). HP induces structural changes on native ovalbumin, exposing glutamyl and lysyl residues, which may be buried inside its tertiary structure, making them accessible to MTGase. However, the lower hardness of gels obtained at 500 MPa suggests that the crosslinks with myosin were insufficient, as a result of incomplete ovalbumin unfolding.

Recently, Menéndez, Rawel, Schwarzenbolz, and Henle (2006) found a 50% MTGase residual activity after 12 min at 600 MPa/40 °C, caused by the destruction of  $\alpha$ -helix elements; nevertheless, at atmospheric pressure, the inactivation is achieved after 2 min at 80 °C. Consequently, the notable differences found in hardness and chewiness, between NE and MTGase gels obtained at 700 MPa, indicate that certain enzymatic activity remains at that pressure.

NE gels obtained by HP showed a pattern of texture parameters similar to those with MTGase and pressure (but to a lower extent). In this study, the NE samples treated at 500 MPa were the softest and showed the lowest values for chewiness and cutting force of all samples. However, the NE samples treated at 700 or 900 MPa showed similar values of hardness and chewiness to those treated by heat, indicating that these pressure levels produce a complete gel formation of egg and myofibrillar proteins. It is important to consider that the enzyme inactivation (75 °C/5 min) applied in the process may have consequences for the textural parameters. All pressurized samples (NE and MTGase) had more springiness than had heated ones and those produced at 500 MPa showed the highest values. Van der Plancken, Van Loey, and Hendrickx (2005b) observed a decrease in total SH content in ovalbumin treated under severe conditions (above 70 °C at 0.1 MPa or between 500 and 600 MPa, depending on the temperature). The high degree of exposure of sulfhydryl groups, and subsequent oxidation and sulfhydryl-disulfide

bond exchange reactions, resulted in soluble aggregates, which explains why pressure-induced egg white gels are softer and more elastic than are heat-induced ones.

Several authors have studied the effect of TGase on the texture of different materials treated by heat at 0.1 MPa. Meat products, such as low-salt chicken meat-balls (Tseng et al., 2000), chicken döner kebab (Kilic, 2003) or chicken sausages (Muguruma et al., 2003) increased the gel strength. Beef gels exhibited higher hardness, springiness and chewiness when they were treated with TGase; furthermore, the cohesiveness was increased only in samples containing egg albumen (Pietrasik, 2003). MTGase favourably increased hardness and chewiness of pork gels. This increment was bigger for the higher-salt gels and significant linear effects were observed for enzyme concentration (0–0.6%) on hardness and springiness (Pietrasik & Li-Chan, 2002b; Pietrasik & Jarmoluk, 2003). Recently, Küttemeyer, Froeck, Werlein, and Watkinson (2005) demonstrated that the addition of monovalent ions increased the enzymatic activity and the thermal stability of MTGase. The results confirmed that NaCl and KCl had a synergistic effect on the activity, while bivalent ions had only a slight influence ( $MgCl_2$ ) or reduced the activity and thermal stability of the enzyme ( $CaCl_2$ ).

### 3.5. Microstructure

Confocal microphotographs of pressurized samples, with and without MTGase, are shown in Fig. 2. MTGase gels had a more uniform network structure, which correlates with the firmest texture observed. The NE gels obtained at 500 MPa were coarser, with a loose appearance, and were the most fragile and soft of all. In pressure gels, pore size was greater in NE than in MTGase gels and the pressure intensity caused changes in the gel characteristics. MTGase gels obtained at 700 and 900 MPa showed a more compact structure and smaller pore diameter, with lower expressible moisture than had gels obtained at 500 MPa.

Tseng et al. (2000) and Muguruma et al. (2003) reported that low-salt chicken meat balls and chicken sausages with TGase at atmospheric pressure, had more regular network structures. In a previous study, in pressure meat gels with

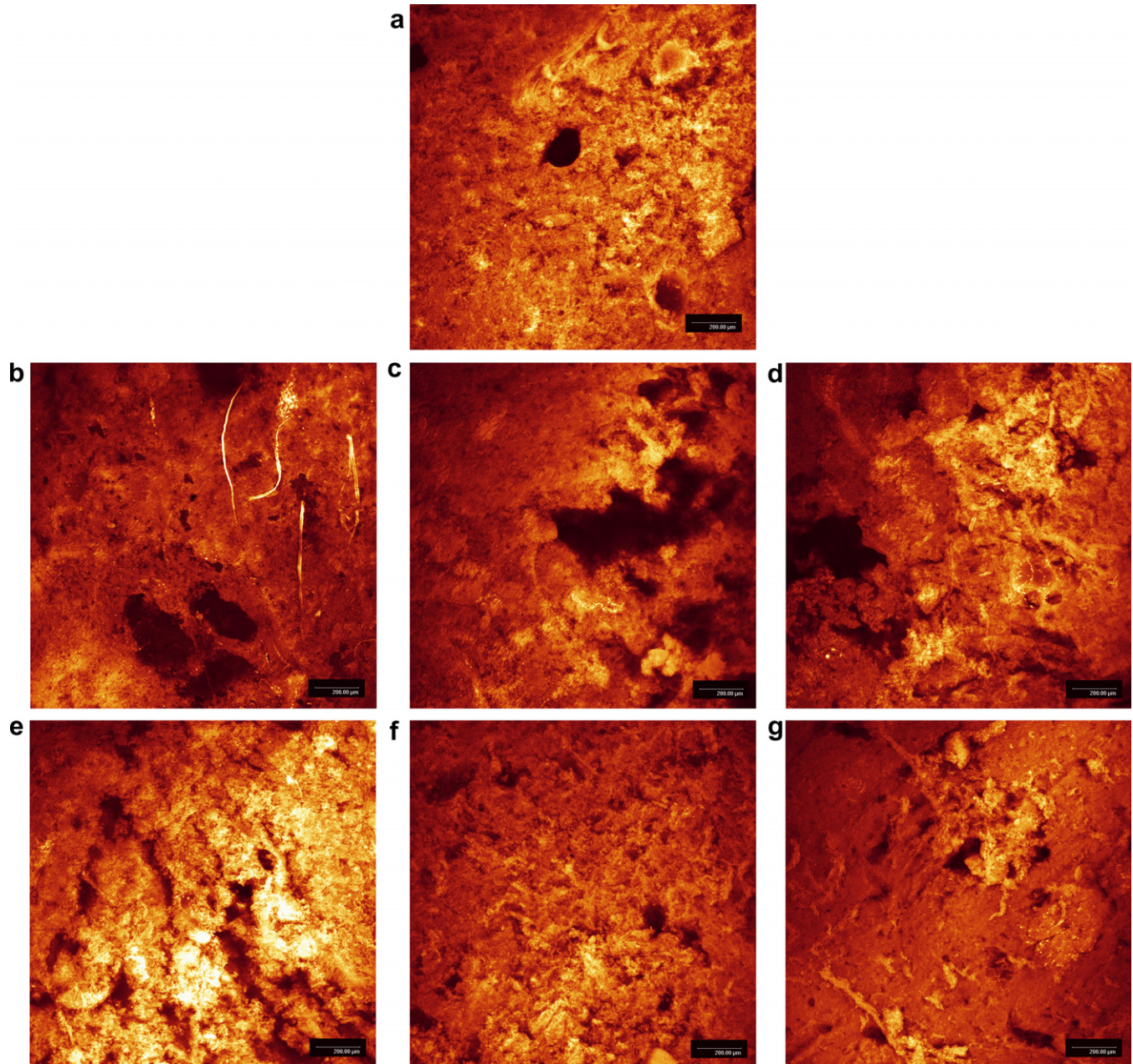


Fig. 2. Microstructure of low-fat and low-salt chicken gels without phosphates: heat gels obtained at 75 °C/30 min (a) or pressure gels (NE) obtained at 500 MPa (b), 700 MPa (c) or 900 MPa (d) and pressure and MTGase gels (MTGase) obtained at 500 MPa (e), 700 MPa (f) or 900 MPa (g). Bar = 200 µm.

phosphates, we also found a more compact and homogeneous structure when MTGase was included in the formulation (Trespalacios & Pla, 2007).

### 3.6. DSC

Differential scanning calorimetry was used to clarify the role of heat or pressure-induced gelation on texture formation of processed meat products. The thermograms of the raw materials used in the chicken meat batter, egg white and egg yolk (Fig. 3) show several peaks of  $T_m$ . The first and last transitions for chicken leg muscle at 59.5 and 84.2 °C were due to myosin and actin and the intermediate

peaks are mainly due to sarcoplasmic proteins and connective tissue at 63.4, 65.2 and 68.8 °C with a total  $\Delta H$  of 14.08 J/g. These results agree with Kijowski and Mast (1988) who reported that thigh chicken meat exhibited three major transitions at 59.6, 65.6 and 75.8 °C. The specific transition temperature depends mainly on muscle type and pH.

The dried egg white showed two main peaks, at 65.8 and 83.16 °C, corresponding to conalbumin and ovalbumin, respectively. The thermogram of fresh egg yolk showed two transitions at 42.1 and 92.4 °C and two endothermic peaks at 28.1 and 84.5 °C; however, when it was lyophilized, only two peaks at 64.2 and 83.2 °C were observed

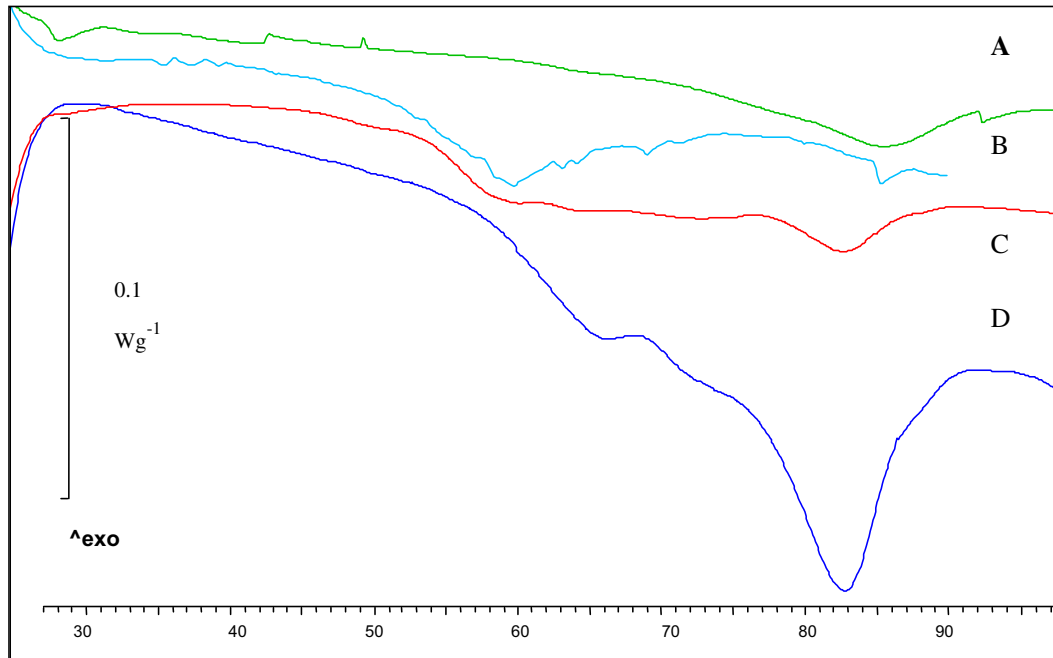


Fig. 3. Thermograms of raw materials and batter: (A) Egg yolk, (B) Chicken meat, (C) Batter before treatments, (D) Egg white.

(curve not shown). Although the chicken batters were inherently complex, they gave characteristic thermograms, which are interpreted in terms of thermal denaturation of the major proteins, with two main peaks at 60.2 and 82.8 °C and total  $\Delta H$  of 11.48 J/g (35–95 °C, spline baseline).

The heat gel exhibited an almost complete protein denaturation (97.0%) but an endothermic peak at 84.0 °C was observed, with a minimal enthalpy of 0.34 J/g, possibly

due to the residual ovalbumin that presented a higher thermal stability. When HP was applied (Fig. 4), NE gels obtained at 500 MPa gave a total  $\Delta H$  of 4.14 J/g (63.9% of denaturation) with two peaks at 78.1 and 83.4 °C, but MTGase gels showed a transition at 67.5 °C and an endothermic peak at 83.5 °C with a total  $\Delta H$  of 1.26 J/g (88.5% of denaturation) (range 66–90 °C, spline baseline). There were no differences in  $T_m$  corresponding to egg proteins between NE and MTGase gels, but the MTGase addition

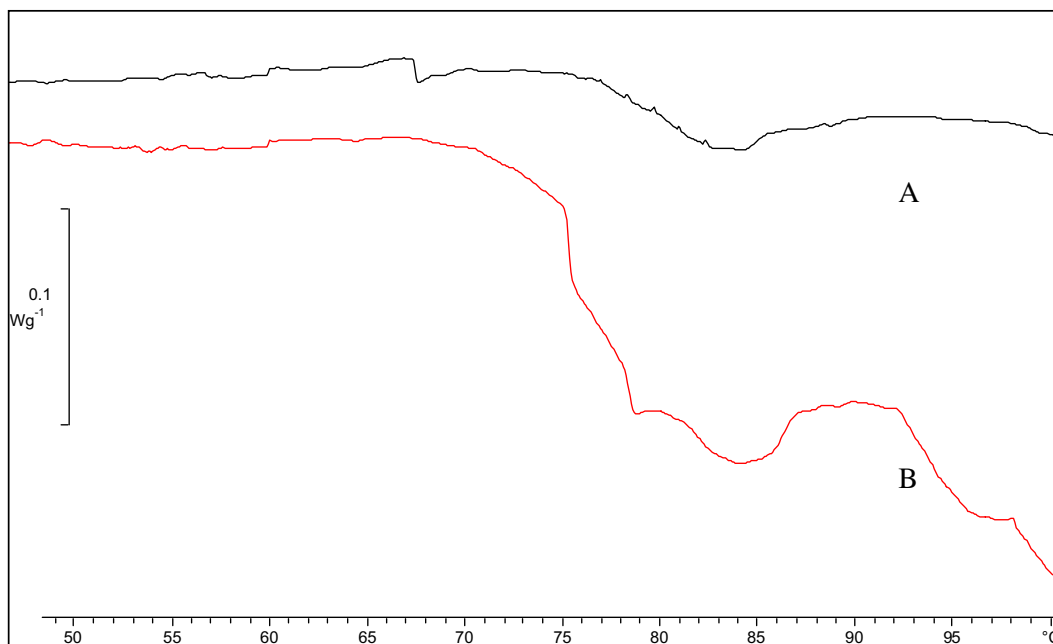


Fig. 4. DSC normalized (dry matter) profiles of chicken meat and egg gels without phosphates; obtained by pressure at 500 MPa: (A) with microbial transglutaminase (0.3%); (B) without enzyme added.

induced an enthalpy difference of near to 70% between them at 500 MPa. This decrease suggests a higher protein denaturation, due mainly to the unfolded ovalbumin, which requires less heat energy to denature completely and to form a larger complex between the myofibrillar and egg proteins mediated by MTGase. It has been reported that application of pressure at non-denaturing temperatures caused some changes of protein conformation, increasing exposure of hydrophobic residues, which favoured protein–protein aggregation interaction and a subsequent heating led to the formation of stronger gel structures (Carballo, Cofrades, Fernández Martín, & Jiménez Colmenero, 2001).

NE and MTGase gels obtained at 700 and 900 MPa gave similar patterns, with loss of 1.0 J/g (more than 91.3% of denaturation) in both cases, suggesting that treatments at these pressure levels were almost as denaturing as was heat treatment. Hayakawa, Linko, and Linko (1996) showed that pressurization of ovalbumin to more than 400 MPa for 15 min induced a protein denaturation dissimilar to that resulting from heating at 80 °C for 10 min; however, denaturation by pressure up to 1000 MPa was found to be more severe than thermal denaturation. Van der Plancken et al. (2005a) reported that no residual denaturation enthalpy could be observed after 20 min at 700 MPa over a temperature range of 10–60 °C.

#### 4. Conclusions

Simultaneous application of MTGase and HP at 40 °C on chicken meat batters with egg proteins, with reduced content of salt and without phosphates, produced gels with substantially more enhanced textural properties than samples subjected only to pressure or those obtained by traditional heat treatment.

The gel obtained at 500 MPa was the most fragile and soft of all. At higher pressures (700–900 MPa), the hardness values were comparable to heat-treated (75 °C/30 min) gels, but these were still softer than those with MTGase and pressure. The increase in cutting force, hardness and chewiness of gels suggests that a heterologous complex of meat and egg proteins was formed when HP processing and MTGase were combined. Although the enzyme and higher pressure at 700 and 900 MPa considerably improved the yield, colour and texture, there were no differences between the two pressure levels. Thermal analysis showed that pressure levels above 700 MPa were as denaturing as was heat treatment; at 500 MPa, 63.9 and 88.5% enthalpy reductions were observed in NE and MTGase gels, respectively.

The synergistic effect of combining enzymatic crosslinking with high pressure treatment at 700 MPa is of interest for food manufacturers, in order to generate high quality products, which exhibit many desirable characteristics that satisfy the consumer's demands, such as low-fat, low-sodium content, phosphate-free and improved sensorial

attributes, while assuring the nutritive value and microbiological safety.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by the Secretaría General del Plan Nacional de I+D (AGL2000-0357) of Spain and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of México. The authors would like to thank Melissa Edwards for the manuscript proofreading and Ajinomoto Co. Inc. and Degussa Texturant Systems, for providing the additives and ingredients used in this study.

#### References

- Angsupanich, K., Edde, M., & Ledward, D. A. (1999). Effects of high pressure on the myofibrillar proteins of cod and turkey muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 92–99.
- Ashie, I. N. A., & Lanier, T. C. (1999). High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 64(4), 704–708.
- Association of Official Analytical Chemists (1990). Meat and meat products. In K. Helrich (Ed.), *Official methods of analysis* (15th ed., pp. 931–948). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- Barbut, S. (2002). *Poultry products processing: An industry guide*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Carballo, J., Cofrades, S., Fernández Martín, F., & Jiménez Colmenero, F. (2001). Pressure-assisted gelation of chemically modified poultry meat batters. *Food Chemistry*, 75(2), 203–209.
- Chapleau, N., Mangavel, C., Compoint, J. P., & de Lamballerie-Anton, M. (2004). Effect of high-pressure processing on myofibrillar protein structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(1), 66–74.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46(3), 211–236.
- de Lamballerie-Anton, M., Taylor, R., & Culioli, J. (2002). High pressure processing of meat. In Josep Kerry, John Kerry, & David Ledward (Eds.), *Meat processing* (pp. 313–331). Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Fernández Martín, F., Cofrades, S., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2002). Salt and phosphate effects on the gelling process of pressure/heat treated pork batters. *Meat Science*, 61(1), 15–23.
- Fernández, P., Cofrades, S., Solas, M. T., Carballo, J., & Jiménez Colmenero, F. (1998). High pressure-cooking of chicken meat batters with starch, egg white, and iota carrageenan. *Journal of Food Science*, 63(2), 267–271.
- Galazka, V. B., Dickinson, E., & Ledward, D. A. (2000). Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3–4), 182–187.
- Hammer, G. F. (1998). Microbial transglutaminase and diphosphate in finely comminuted cooked sausage. *Fleischwirtschaft*, 78(11), 1155–1156, 1159–1162, 1186.
- Hayakawa, I., Linko, Y. Y., & Linko, P. (1996). Mechanism of high pressure denaturation of proteins. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 29(8), 756–762.
- Jiménez Colmenero, F. (2002). Muscle protein gelation by combined use of high pressure/temperature. *Trends in Food Science & Technology*, 13(1), 22–30.
- Jung, S., Ghoul, M., & de Lamballerie-Anton, M. (2003). Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 36(6), 625–631.
- Kijowski, J. M., & Mast, M. G. (1988). Thermal properties of proteins in chicken broiler tissues. *Journal of Food Science*, 53(2), 363–366.
- Kilic, B. (2003). Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken döner kebab. *Meat Science*, 63(3), 417–421.

- Kuraishi, C., Yamazaki, K., & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17(2), 221–246.
- Kütemeyer, C., Froeck, M., Werlein, H. D., & Watkinson, B. M. (2005). The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. *Food Control*, 16, 735–737.
- Lan, Y. H., Novakofski, J., Mccusker, R. H., Brewer, M. S., Carr, T. R., & Mckeith, F. K. (1995). Thermal gelation of pork, beef, fish, chicken and turkey muscles as affected by heating rate and pH. *Journal of Food Science*, 60(5), 936–940, 945.
- Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H., & Henle, T. (2001). Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 213(4–5), 273–276.
- Lee, E. Y., & Park, J. (2002). Pressure inactivation kinetics of microbial transglutaminase from *Streptovorticillum mobaraense*. *Journal of Food Science*, 67(3), 1103–1107.
- Lee, E. Y., & Park, J. (2003). Microbial transglutaminase induced cross-linking of a selected comminuted muscle system: Processing conditions for physical properties of restructured meat. *Food Science and Biotechnology*, 12(4), 365–370.
- Menéndez, O., Rawel, H., Schwarzenbolz, U., & Henle, T. (2006). Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1716–1721.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., & Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins: Structure Function and Genetics*, 24(1), 81–91.
- Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., et al. (2003). Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Science*, 63(2), 191–197.
- Nonaka, M., Ito, R., Sawa, A., Motoki, M., & Nio, N. (1997). Modification of several proteins by using Ca<sup>2+</sup> independent microbial transglutaminase with high-pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 11(3), 351–353.
- Pietrasik, Z. (2003). Binding and textural properties of beef gels processed with kappa-carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase. *Meat Science*, 63(3), 317–324.
- Pietrasik, Z., & Jarmoluk, A. (2003). Effect of sodium caseinate and kappa-carrageenan on binding and textural properties of pork muscle gels enhanced by microbial transglutaminase addition. *Food Research International*, 36(3), 285–294.
- Pietrasik, Z., & Li-Chan, E. C. Y. (2002a). Binding and textural properties of beef gels as affected by protein, kappa-carrageenan and microbial transglutaminase addition. *Food Research International*, 35(1), 91–98.
- Pietrasik, Z., & Li-Chan, E. C. Y. (2002b). Response surface methodology study on the effects of salt, microbial transglutaminase and heating temperature on pork batter gel properties. *Food Research International*, 35(4), 387–396.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., & Motoki, M. (1994). Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *Journal of Food Science*, 59(4), 866–871.
- Smith, D., Galazka, V. B., Wellner, N., & Sumner, I. G. (2000). High pressure unfolding of ovalbumin. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(4), 361–370.
- Trespalacios, P., & Pla, R. (2007). Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. *Food Chemistry*, 100(1), 264–272.
- Tseng, T. F., Liu, D. C., & Chen, M. T. (2000). Evaluation of transglutaminase on the quality of low-salt chicken meat-balls. *Meat Science*, 55(4), 427–431.
- Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2005a). Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 11–20.
- Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. G. (2005b). Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5726–5733.
- Xiong, Y. L., Cantor, A. H., Pescatore, A. J., Blanchard, S. P., & Straw, M. L. (1993). Variations in muscle chemical-composition, pH, and protein extractability among eight different broiler crosses. *Poultry Science*, 72(3), 583–588.
- Yuste, J., Mor-Mur, M., Capellas, M., Guamis, B., & Pla, R. (1999). Mechanically recovered poultry meat sausages manufactured with high hydrostatic pressure. *Poultry Science*, 78(6), 914–921.



## **V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**



La discusión de los resultados se realiza considerando el efecto de cada una de las variables de los experimentos en las características fisicoquímicas y los atributos de los geles, como son: la composición química, el pH, las pérdidas durante el procesamiento y las propiedades ligantes, el color, la textura y la microestructura, así como el comportamiento térmico de las materias primas y de los geles obtenidos.

### **1. Composición química y pH**

Como uno de los principales objetivos fue el de rentabilizar los productos avícolas infravalorados por la industria, se utilizaron piernas de pollo a pesar de que el músculo rojo de ave presenta mayores desventajas tecnológicas que la carne blanca como son: menor capacidad de retención de agua, color más oscuro, mayor contenido de grasa y oxidación de lípidos.

La adición de albumen como sustituto de grasa incrementó notablemente el contenido proteico (47.2% para las pastas con 10% de albumen y 100% para las pastas con 20% de albumen). La incorporación de yema incrementó el contenido de lípidos de 6.8% a 8.7%, que aportó mayor palatabilidad, mejor emulsificación y manejo adecuado de la pasta durante el mezclado y embutido. El pH de la pasta aumentó debido a la presencia del albumen, lo cual repercutió favorablemente en las propiedades ligantes de los geles.

La composición química de los geles adicionados con MTGasa, sin fosfatos y obtenidos por alta presión (700 MPa a 40 °C durante 30 min), tuvieron 68.7% de humedad, 20.5% de proteínas, 8.7% de grasa y 2.1% de cenizas. Esto cumple con uno de los requisitos de este trabajo de tesis.

### **2. Pérdidas durante el procesamiento y capacidad de retención de agua**

Las pérdidas debidas al proceso fueron mínimas en ambos tratamientos de presión o calor. Los geles con albumen mostraron un rendimiento entre 99.5 y 99.9%, sin embargo, los geles sin albumen obtenidos por calor tuvieron un rendimiento de 96.4% y los obtenidos por presión oscilaron entre 95.1 y 97.3%.



Entre estos últimos, los obtenidos a 500 MPa a 40 °C tuvieron más alto rendimiento que los de 60 °C a la misma presión y que los obtenidos a 400 MPa a ambas temperaturas, e inclusive más que los obtenidos por calor (Artículo 1, Tabla 2). Esto es debido a que hay un parcial desdoblamiento de las proteínas miofibrilares, lo cual ocurre a más bajas temperaturas cuando están sometidas a presión, mostrando un efecto antagónico entre ambos parámetros.

La presencia de albumen (10 y 20%) en los geles obtenidos por calor incrementó de manera notable la capacidad de retención de agua (11 y 13.6%, respectivamente).

Existen resultados contradictorios acerca del efecto del albumen en las propiedades de hidratación y textura de los productos cárnicos. Algunos investigadores opinan que las proteínas del albumen ayudan a estabilizar las emulsiones cárnicas y contribuyen a la formación de una red proteica que mejora las propiedades ligantes (Fisher, 1994), sin embargo hay autores que consideran que el albumen no tiene ningún efecto positivo debido a que no participa en la estructura proteica y produce geles más suaves y con peores propiedades de retención de agua (Hammer, 1992). No hay datos en la bibliografía sobre mezclas de carne y albumen tratadas a presiones superiores a 400 MPa y, por debajo de esta presión, las discrepancias encontradas se deben principalmente a las condiciones de temperatura y presión utilizadas en los diferentes estudios.

La adición de 0.3% de MTGasa disminuyó notablemente las pérdidas de agua tanto en los geles obtenidos a 20 como a 40 °C a presión atmosférica, en 15% y 23% respectivamente, en relación con los geles que no contenían la enzima (Artículo 2, Tabla 1). Los geles obtenidos a 500 MPa/40 °C tuvieron menores pérdidas de agua con la enzima (19.1%) que sin la enzima (24.2%) o que aquellos que si llevaban enzima y fueron obtenidos a 40 °C bajo presión atmosférica (32.5%). Por lo tanto, se observó un claro efecto sinérgico cuando la acción de la enzima se desarrolla bajo condiciones de presión. Asimismo, estos resultados demuestran que la enzima mantiene su actividad aún a 500 MPa. La formación de enlaces cruzados intra e intermoleculares produjo geles con mejor capacidad de retención de agua, a pesar de la reducción del contenido de NaCl a 1% (Artículo 2). A presión atmosférica, los datos disponibles sobre el efecto de la

---

---

adición de la enzima en las propiedades ligantes de los productos cárnicos son divergentes.

En los geles sin fosfatos y con 1% de NaCl se obtuvieron rendimientos diferentes, los geles de presión a 40 °C tuvieron un rendimiento mayor (99 a 99.8%) que los geles de calor a 75 °C (97.7%) y que los de presión con la enzima (94.2 a 95.4%) (Artículo 3, Figura 1). Ello se debe a que el calor genera estructuras estabilizadas principalmente por enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas, mientras que la alta presión promueve los enlaces de hidrógeno, los cuales proporcionan mejores propiedades de hidratación. Los enlaces covalentes cruzados formados entre las proteínas miofibrilares y las del albumen produjeron geles más firmes y compactos, de acuerdo a los datos de textura, pero con menor espacio interno en la red como se observa en la microestructura, lo que pudo provocar una menor retención de agua. Sin embargo, nuestros resultados de retención de agua proporcionaron valores superiores a los publicados por otros investigadores sobre el efecto de la transglutaminasa a presión atmosférica.

A 500 MPa hay una estructura de red incompleta entre la miosina y la ovoalbúmina de acuerdo con el análisis térmico y a presiones de 700 MPa se produce una desnaturalización similar a la producida por el tratamiento por calor. Los geles con la enzima obtenidos a 700 y 900 MPa no mostraron diferencias entre sí, y tuvieron una menor pérdida de agua que la observada en los geles obtenidos a 500 MPa, también con la enzima.

### 3. Color

En los resultados obtenidos en la primera etapa, se apreció que el contenido de albumen influye notablemente en la claridad de los geles obtenidos a 75 °C a presión atmosférica, obteniéndose el valor más alto de  $L^*$  y más bajo de  $a^*$  para el porcentaje mayor de albumen (20%). Sin embargo, en los geles de presión a 60 °C se observó el efecto contrario: los geles sin albumen mostraron valores de  $L^*$  más elevados, tanto a 400 MPa como a 500 MPa, que los obtenidos en las mismas condiciones pero con 20% de albumen. En cambio, a 40 °C no hubo diferencias (Artículo 1, Tabla 2). La presencia de albumen en los geles de presión originó un efecto protector sobre la desnaturalización de la mioglobina porque, a

pesar de que su contenido es menor al aumentar el porcentaje de albumen al 20%, los geles presentaron valores de  $a^*$  más altos y fueron más oscuros que los que contenían mayor proporción de carne en las mismas condiciones de tratamiento.

La intensidad de presión también tuvo efectos sobre la claridad de los geles, la cual se vio incrementada al aumentar la presión, a la misma temperatura, pero los valores de  $L^*$  fueron menores que los detectados en los tratamientos por calor para idéntica proporción de albumen. En las pastas sin albumen, la aplicación de presión (500 MPa), tanto a 40 como a 60 °C, redujo drásticamente el color rojo, en relación con todos los demás geles, incluidos los de calor.

En la III etapa de esta tesis, tanto la adición de MTGasa y de yema de huevo como la reducción del contenido de sal (de 1.5 a 1.0%) dieron lugar a algunos cambios en los parámetros del color.

La presurización de las muestras con o sin la enzima mantuvo más estable los colores rojo y amarillo en relación con las de calor, sin embargo, la claridad de los geles de ambos tratamientos fue similar. La adición de enzima provocó que los geles obtenidos por presión (500 MPa/40 °C) fueran ligeramente más claros y menos amarillos pero no tuvo ningún efecto sobre el color rojo (Artículo 2, Tabla 2).

En todos los geles con o sin enzima, al eliminar fosfatos e incrementar la presión a 700 y 900 MPa se observó que, en general, no hubo diferencias en los parámetros de color entre ambas presiones, pero sí fueron diferentes a los de los geles de 500 MPa, por lo que la claridad depende, a esas magnitudes, de la intensidad de presión más que de la presencia de enzima, posiblemente porque la MTGasa es inactivada a presiones superiores a 700 MPa. Sin embargo, los geles obtenidos a 500 MPa con MTGasa fueron los más oscuros y mostraron los valores más altos de  $a^*$  y  $b^*$  (Artículo 3, Tabla 2). No existen referencias bibliográficas acerca del efecto de la MTGasa y la alta presión en el color de la carne o de productos cárnicos.

---

---

#### 4. Textura

La adición de albumen tuvo un efecto positivo en los geles obtenidos por calor, se incrementó notablemente la dureza, la cohesividad, la masticabilidad, la fuerza al corte y la fuerza de compresión de los geles, aunque disminuyó la elasticidad. Lo anterior demuestra que las proteínas del albumen sí interaccionan con las proteínas miofibrilares y participan en la formación de una red más firme, proporcionando mejores características texturales a los geles, además de las propiedades ligantes. También en los geles obtenidos por presión se vieron mejoradas algunas de estas características, sin embargo, fueron menos firmes y cohesivos que los obtenidos por calor.

Mediante la metodología de superficie de respuesta se observó que los tres factores experimentales analizados (% de albumen, presión y temperatura) influyeron en las variables de respuesta. Para la dureza, los factores más influyentes fueron la interacción albumen-presión ( $P = 0.010$ ) y la temperatura ( $P = 0.043$ ). En la fuerza al corte, influyó la elasticidad ( $P = 0.0029$ ) y la interacción albumen-presión ( $P = 0.017$ ), además de un término cuadrático para el albumen ( $P = 0.032$ ). En la fuerza de compresión, el factor principal fue el albumen ( $P = 0.001$ ).

Se establecieron los siguientes modelos ajustados y validados, con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de 98.2 %, 89.8% y 79.6% respectivamente:

- **Dureza** =  $\exp \{1.67869 - 0.403297 \text{ albumen} - 0.592112 \text{ presión} + 0.0249053 \text{ temperatura} + 0.00852444 \text{ albumen} * \text{ presión} + 0.00268092 \text{ albumen} * \text{ temperatura}\}$
- **Fuerza al corte** =  $\exp \{1.13924 - 0.311761 \text{ albumen} - 0.0440152 \text{ presión} + 0.0472346 \text{ temperatura} + 0.00481812 \text{ albumen}^2 + 0.00521161 \text{ albumen} * \text{ presión}\}$
- **Compresión** =  $\exp \{-1.29009 + 0.0831681 \text{ albumen} + 0.0495039 \text{ presión} + 0.0256764 \text{ temperatura}\}$

La adición de 10 y 20% de albumen tuvo un efecto lineal a escala logarítmica en los geles de presión sobre las tres variables dependientes.

En los geles sin albumen se observó que la dureza y la resistencia al corte disminuyeron al aumentar la presión. Este efecto ha sido observado por otros investigadores en carne (Ma y Ledward, 2004), y en pollo (Zamri *et al.*, 2006), quienes también encontraron que a temperaturas mayores de 50 °C, la dureza disminuye notablemente al aumentar la presión por encima de 200 MPa. Sin embargo, a temperaturas entre 20 y 50 °C, la presión y la temperatura actúan de forma sinérgica para incrementar la dureza del tejido muscular hasta 800 MPa, con un mayor incremento entre 200 y 400 MPa. El significativo incremento de la dureza a partir de los 200 o 400 MPa se debe, posiblemente, al desdoblamiento de las proteínas miofibrilares, en especial de la miosina, cuya compresión de los filamentos gruesos en la línea Z del músculo está relacionada con el incremento de la dureza en los tratamientos por alta presión (Iwasaki *et al.*, 2006).

Nuestras observaciones también están relacionadas con la desnaturalización de las proteínas del huevo por presión, cuyo efecto es mayor a bajas temperaturas (entre 10 y 40 °C), contrario a lo observado por el efecto de la temperatura a presión atmosférica, por lo que se considera que hay un efecto antagónico entre presión y temperatura, lo cual coincide con datos publicados recientemente (van der Plancken, van Loey y Hendrickx, 2007).

La adición de la enzima modificó notablemente la textura de los geles obtenidos sin presión a 40 °C, pero no a 20 °C, debido al corto tiempo del tratamiento a esa temperatura, ya que se requiere un tiempo más prolongado (superior a 70 min) para que la enzima actúe a temperatura ambiente.

Los geles con la enzima obtenidos a 40 °C a presión atmosférica mostraron mayor dureza, cohesividad, masticabilidad y elasticidad que los obtenidos a la misma temperatura y presión, pero sin la enzima, debido a la formación de enlaces  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina. Varios autores han publicado resultados similares al mejorar una o varias características de la textura en diversos productos, aplicando diversas concentraciones de enzima (0.1 a 1.0%) y diferentes temperaturas, principalmente aquellas más utilizadas para la obtención de geles por calor, sin embargo, no se obtienen buenos resultados en muestras con bajo contenido de NaCl a presión atmosférica.

---

---

La combinación de presión (500 MPa) con la enzima produjo geles con mayor dureza, cohesividad, masticabilidad y elasticidad en relación con los obtenidos a la misma presión pero sin enzima o los obtenidos a presión atmosférica con enzima a la misma temperatura de 40 °C, e inclusive que los geles obtenidos por calor. Se observa claramente un efecto sinérgico al combinar la enzima y la presión (Artículo 2, Tabla 3).

Por otro lado, la fuerza al corte de los geles obtenidos por calor y la de los geles de presión con enzima fue muy similar (6.98 N y 6.81 N respectivamente), sin embargo, la dureza de los primeros fue de 35 N y la de los últimos fue de 42.4 N. Estas divergencias son debidas al diferente mecanismo de gelificación, ya que en los geles de presión la transmisión es instantánea en todos los puntos del gel y en los geles de calor la parte externa llega a estar sobreexpuesta a la temperatura.

El incremento en los parámetros texturales de los geles en la aplicación simultánea de la MTGasa y presión a 500 MPa es debido posiblemente a que la ovoalbúmina, desdoblada de forma parcial durante el estado de glóbulo fundido, permite que los aminoácidos glutamina y lisina queden más accesibles al sitio activo de la enzima bajo condiciones de presión y se creen enlaces cruzados más fácilmente con las proteínas miofibrilares de la carne para producir compuestos heterólogos. La formación de enlaces cruzados por la aplicación simultánea de presión y enzima produce una estructura de red con mejores propiedades texturales que las de los geles obtenidos por el tratamiento convencional por calor. Este comportamiento es característico de la gelificación de tipo químico, cuyos enlaces covalentes son más fuertes y difíciles de romper.

En la IV etapa, se mantuvo el nivel de NaCl (1%) y se eliminaron los fosfatos. Al aplicar presiones a 500, 700 y 900 MPa, se observó que los geles con MTGasa fueron los más firmes, cohesivos y elásticos de todos, con relación a los obtenidos sólo por presión o por calentamiento. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre los geles obtenidos a 700 y 900 MPa con o sin MTGasa, pero los valores texturales fueron mucho más altos en los geles con la enzima (Artículo 3, Tabla 3). Nuestros resultados sugieren que esos niveles más altos de presión, aplicados a la carne y al huevo a temperaturas bajas o moderadas, promueven la

formación de un mayor número de enlaces  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina tanto inter como intramoleculares, pero que a partir de 700 MPa la enzima puede ser inactivada.

Los geles sin enzima obtenidos por presión (700 y 900 MPa) mostraron un patrón muy similar a los que sí llevaban enzima, pero en menor medida, y tampoco mostraron diferencias con los obtenidos por calor en cuanto a dureza y masticabilidad pero dieron valores similares en cuanto a cohesividad y fuerza al corte. A 500 MPa y sin enzima los geles fueron los menos firmes y tuvieron los valores más bajos de cohesividad, masticabilidad y fuerza al corte de todos los geles. Esto es debido posiblemente a que en la ovoalbúmina se forman agregados solubles originados por el alto grado de exposición de los grupos sulfhidrilo y la subsiguiente oxidación e intercambio de reacciones entre grupos SH y SS que ocurre alrededor de 500 a 600 MPa y explican porqué los geles de ovoalbúmina por presión resultaron más suaves y más elásticos que los inducidos por calor.

## 5. Microestructura

Las enzimas pueden proporcionar modificaciones altamente específicas en la microestructura de los biopolímeros, lo cual induce cambios significativos en las propiedades macroscópicas. Las fotomicrografías muestran que los geles sin enzima obtenidos por presión tienen una estructura más suelta, con huecos irregulares y más grandes (Artículo 2, Figura 1 a) y (Artículo 3, Figuras 2 b, c y d) mientras que los geles con MTGasa tienen una estructura más compacta y homogénea (Artículo 2, Figura 1 b) y (Artículo 3, Figuras 2 e, f, y g). Estos datos se correlacionan con las características texturales y las propiedades ligantes expuestas previamente. Los geles con enzima obtenidos a 700 y 900 MPa tuvieron poros más pequeños y mayor retención de agua que los de 500 MPa, con una apariencia similar a los obtenidos por calor (Artículo 3, Figura 2 a).

## 6. Análisis térmico

Los termogramas de las materias primas utilizadas en la elaboración de los geles (carne de pollo, albumen y yema de huevo), proporcionaron las temperaturas de desnaturalización ( $T_m$ ) de las proteínas presentes (Artículo 3, Figura 3 b) (Artículo 3, Figura 3 d) (Artículo 3, Figura 3 a). Aunque las pastas de la

---

---

mezcla de ingredientes fueron inherentemente complejas, debido a la diversidad de proteínas aportadas por cada una de las materias primas, dieron un termograma característico de las principales proteínas a 60.2 y 82.8 °C con una entalpía total de 11.48 J/g (Artículo 3, Figura 3 c).

Los geles obtenidos por calor mostraron una casi completa desnaturalización de todas las proteínas (97.0%), con una mínima entalpía a 84.0 °C debido posiblemente a ovoalbúmina residual con una mayor estabilidad térmica.

En los geles obtenidos por presión a 500 MPa, sin adición de enzima, se produjeron dos picos a 78.1 y 83.4 °C y una desnaturalización de 63.9% ( $\Delta H = 4.14$  J/g), mientras que los geles con enzima mostraron una transición térmica a 67.5 °C y un pico a 83.5 °C, con un  $\Delta H$  de 1.26 J/g y 88.5% de desnaturalización. La  $T_m$  correspondiente a la ovoalbúmina en ambos geles no mostró diferencias, pero hubo una disminución de la entalpía cercana al 70% (Artículo 3, Figuras 4 a y b). Este notable decremento sugiere una mayor desnaturalización de la ovoalbúmina debido a su desdoblamiento, la cual requiere menos energía para desnaturalizarse completamente y formar polímeros entre las proteínas miofibrilares y la ovoalbúmina a través de la MTGasa. La aplicación de presiones a temperaturas moderadas y no desnaturalizantes provoca cambios en la conformación de las proteínas, incrementando la exposición de los residuos hidrofóbicos los cuales favorecen la interacción proteína-proteína y la aplicación de un calentamiento posterior permite la formación de geles más fuertes, sin embargo este efecto no es tan pronunciado como el observado por la acción de la MTGasa que produce enlaces covalentes  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina.

Los geles con y sin enzima obtenidos a 700 y 900 MPa proporcionaron patrones muy similares con entalpías menores de 1.0 J/g en ambos casos (más de 91.3% de desnaturalización), sugiriendo que los tratamientos a esos niveles de presión son casi tan desnaturalizantes como el tratamiento habitual por calor.





## **VI. CONCLUSIONES**

1. La adición de albumen deshidratado (10 a 20%) como sustituto de grasa en la formulación de pastas cárnicas para obtener geles repercute favorablemente en el rendimiento del proceso, en las características de retención de agua y en las propiedades texturales, tanto de los geles obtenidos por calor a presión atmosférica (75 °C por 30 min) como de los obtenidos por presión a 500 MPa (40 y 60 °C durante 30 min).
2. En los geles sin albumen, la combinación de temperatura (40 °C a 60 °C) y presión (400 MPa a 500 MPa) tiene un efecto antagónico, contrario al efecto característico de la temperatura (75 °C) observado a presión atmosférica. De manera que se consigue un mayor rendimiento en los geles obtenidos a 500 MPa/40 °C que a 400 MPa/60 °C y, además, al incrementar la presión, la dureza y la fuerza al corte de los geles disminuyen a ambas temperaturas.
3. Se observó un efecto protector del albumen frente al cambio de color de los geles obtenidos entre 400 y 500 MPa, principalmente a 60 °C.
4. A presión atmosférica, la adición de 0.3% de MTGasa disminuye notablemente las pérdidas de agua y mejora la textura de los geles, aún con un bajo contenido de NaCl (1%), tanto a 40 °C como a 20 °C; lo cual corrobora la acción de la MTGasa y la importancia de la temperatura en la formación de una estructura más compacta originada por los enlaces  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina.
5. Se demuestra un efecto sinérgico de la aplicación simultánea de la MTGasa y la presión (500 MPa/40 °C/ 30 min) en las características de retención de agua y de textura, cuyo incremento fue muy significativo en relación con el efecto de la enzima o de la presión utilizadas independientemente. En las características texturales se observa un patrón muy similar al tratamiento de la enzima sin presión, pero de mayor magnitud.
6. El incremento de la presión (500, 700 y 900 MPa/40 °C/30 min) en combinación con la enzima potencia la estructura tridimensional entre las

proteínas del albumen y las proteínas miofibrilares. Los geles obtenidos fueron más firmes y cohesivos, con relación a los obtenidos a los mismos niveles de presión pero sin la enzima, o con los obtenidos por calentamiento (75 °C) a presión atmosférica.

7. El aumento de la presión de 700 a 900 MPa no tiene efecto en la textura ni en el color de los geles, en presencia o no de la MTGasa.
8. Dadas las características de las propiedades texturales y de microestructura, podemos afirmar que la MTGasa desarrolla actividad a alta presión entre 500 y 700 MPa, y existe un efecto sinérgico entre ambos parámetros.
9. Unas condiciones adecuadas para elaborar productos tipo salchicha sin fosfatos, bajos en grasa y en sal, mediante alta presión son: 700 MPa, a 40 °C durante 30 min y con la adición de MTGasa (0.3%).



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- 
- Aeschlimann, D. y Thomazy, V. (2000). Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: The role of transglutaminases. *Connective Tissue Research*, 41(1), 1-27.
- Ahmed, J., Ramaswamy, H. S., Alli, I. y Ngadi, M. (2003). Effect of high pressure on rheological characteristics of liquid egg. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36(5), 517-524.
- Akamittath, J. G. y Ball, H. R., Jr. (1992). Transglutaminase mediated polymerization of crude actomyosin refined from mechanically deboned poultry meat. *Journal of Muscle Foods*, 3(1), 1-14.
- Almdal, K., Dyre, J., Hvidt, S. y Kramer, O. (1993). Towards a phenomenological definition of the term "Gel". *Polymer Gels and Networks*, 1, 5-17.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. y Motoki, M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2613-2617.
- Andres, A. I., Adamsen, C. E., Moller, J. K. S., Ruiz, J. y Skibsted, L. H. (2006). High-pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 222(5-6), 486-491.
- Anema, S. G., Lauber, S., Lee, S. K., Henle, T. y Klostermeyer, H. (2005). Rheological properties of acid gels prepared from pressure- and transglutaminase-treated skim milk. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 879-887.
- Angsupanich, K., Edde, M. y Ledward, D. A. (1999). Effects of high pressure on the myofibrillar proteins of cod and turkey muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 92-99.
- Anton, M., Le Denmat, M., Beaumal, V. y Pilet, P. (2001). Filler effects of oil droplets on the rheology of heat-set emulsion gels prepared with egg yolk and egg yolk fractions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21(1-3), 137-147.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaurnal, V., David-Briand, E. y Rabesona, H. (2003). Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83(2), 175-183.

- Armbrust, C., Werlein, H. D. y Watkinson, B. M. (2003). Transglutaminase - Application and properties in fish products. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 99(5), 181-187.
- Asagami, T., Ogiwara, M., Wakameda, A. y Noguchi, S. F. (1995). Effect of microbial transglutaminase on the quality of frozen surimi made from various kinds of fish species. *Fisheries Science*, 61(2), 267-272.
- Asghar, A., Samejima, K. y Yasui, T. (1985). Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat-products. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22(1), 27-106.
- Ashie, I. N. A. y Lanier, T. C. (1999). High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 64(4), 704-708.
- Ashie, I. N. A., Simpson, B. K. y Ramaswamy, H. (1997). Changes in texture and microstructure of pressure-treated fish muscle tissue during chilled storage. *Journal of Muscle Foods*, 8, 13-32.
- Ashie, I. N. A., Simpson, B. K. y Ramaswamy, H. S. (1996). Control of endogenous enzyme activity in fish muscle by inhibitors and hydrostatic pressure using RSM. *Journal of Food Science*, 61(2), 350-356.
- Awade, A. C. (1996). On hen egg fractionation: Applications of liquid chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 202(1), 1-14.
- Babin, H. y Dickinson, E. (2001). Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. *Food Hydrocolloids*, 15(3), 271-276.
- Balci, A. T. y Wilbey, R. A. (1999). High pressure processing of milk - the first 100 years in the development of a new technology. *International Journal of Dairy Technology*, 52(4), 149-155.
- Balny, C. (2006). What lies in the future of high-pressure bioscience? *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1764(3), 632-639.
- Balny, C. y Masson, P. (1993). Effects of high-pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9(4), 611-628.

- 
- Barbut, S. (2002a). Poultry meat processing and product technology. *Poultry Products Processing. An Industry Guide* (Chap. 1), 1-30. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- Barbut, S. (2002b). Poultry products - formulations and gelation. *Poultry Products Processing. An Industry Guide* (Chap. 9), 249-288. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- Barbut, S. (2004). Other poultry preservation techniques. En: G.C.Mead, (Ed.). *Poultry meat processing and quality* (Chap. 9), 207-210. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Bauer, N., Koehler, P., Wieser, H. y Schieberle, P. (2003). Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat II. Rheological properties. *Cereal Chemistry*, 80(6), 787-790.
- Beltran, E., Pla, R., Capellas, M., Yuste, J. y Mor-Mur, M. (2004). Lipid oxidation and colour in pressure- and heat-treated minced chicken thighs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1285-1289.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J. y Mor-Mur, M. (2003). Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science*, 64(1), 19-25.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T. y Mackey, B. (1999). Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1564-1569.
- Beveridge, T., Jones, L. y Tung, M. A. (1984). Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean, and albumin protein gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(2), 307-313.
- BOE 292. (1992). Real Decreto, de 6 de noviembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria que regula la producción y comercialización de los ovoproductos. *Boletín Oficial del Estado*. Real Decreto 1348, 41548-41555. Ministerio de la Presidencia, España. 5/Nov/1992.
- Bridgman, P. W. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *Journal of Biological Chemistry*, 19, 511-512.
- Broersen, K., van Teeffelen, A. M. M., Vries, A., Voragen, A. G. J., Hamer, R. J. y de Jongh, H. H. J. (2006). Do sulfhydryl groups affect aggregation and gelation

- properties of ovalbumin? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5166-5174.
- Brown, P., Meyer, R., Cardone, F. y Pocchiari, M. (2003). Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: A practical method to prevent human infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 6093-6097.
- Butz, P., Fister, H., Losch, S. y Tauscher, B. (1996). Response of immobilized *Bacillus subtilis* alpha-amylase to high pressure treatment. *Food Biotechnology*, 10(2), 93-103.
- Butz, P., Funtenberger, S., Haberditzl, T. y Tauscher, B. (1996). High pressure inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29(5-6), 404-410.
- Butz, P. y Tauscher, B. (2000). Recent studies on pressure-induced chemical changes in food constituents. *High Pressure Research*, 19(1-6), 401-408.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Gervilla, R., Yuste, J. y Guamis, B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiology*, 17(6), 633-641.
- Carballo, J., Ayo, J. y Colmenero, F. J. (2006). Microbial transglutaminase and caseinate as cold set binders: Influence of meat species and chilling storage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39(6), 692-699.
- Cardone, F., Brown, P., Meyer, R. y Pocchiari, M. (2006). Inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents in food products by ultra high pressure-temperature treatment. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1764(3), 558-562.
- Carlez, A., Rosec, J. P., Richard, N. y Cheftel, J. C. (1993). High-pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 26(4), 357-363.
- Carlez, A., Veciana-Nogues, T. y Cheftel, J. C. (1995). Changes in color and myoglobin of minced beef meat due to high-pressure processing. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28(5), 528-538.
- Casadei, M. A., Manas, P., Niven, G., Needs, E. y Mackey, B. M. (2002). Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5965-5972.



- 
- Castelló, J. A. (2002). La industria del pollo para carne. En: Real Escuela de Avicultura, (Ed.). *Producción de carne de pollo* 2a. ed. (Cap.1), 15-36. Barcelona:
- Chan, J. K., Gill, T. A. y Paulson, A. T. (1992). The dynamics of thermal-denaturation of fish myosins. *Food Research International*, 25(2), 117-123.
- Chapleau, N., Mangavel, C., Compoin, J. P. y de Lamballerie-Anton, M. (2004). Effect of high-pressure processing on myofibrillar protein structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(1), 66-74.
- Chapleau, N. J. y de Lamballerie-Anton, M. I. (2003). Changes in myofibrillar proteins interactions and rheological properties induced by high-pressure processing. *European Food Research and Technology*, 216(6), 470-476.
- Charles, D. R. (2003). Poultry meat: a food for today. *FoodInfo Online Features*. IFIS Publishing. Disponible en URL: <http://www.foodsciencecentral.com/fsc/ixid11702>. Acceso: 13/06/2003.
- Chawla, S. P., Venugopal, V. y Nair, P. M. (1996). Gelation of proteins from washed muscle of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) under mild acidic conditions. *Journal of Food Science*, 61(2), 362-366.
- Cheah, P. B. y Ledward, D. A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43(2), 123-134.
- Cheah, P. B. y Ledward, D. A. (1997). Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *Journal of Food Science*, 62(6), 1135-1138.
- Cheftel, J. C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. C.Balny, R.Hayashi, K.Heremans y P.Masson, (Ed.). 195-209.
- Cheftel, J. C. y Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46(3), 211-236.
- Chéret, R. (2005). Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson. École Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires. Université de Nantes, France. Thèse de Doctorat.
- Chin, K. B. y Chung, B. K. (2003). Utilization of transglutaminase for the development of low-fat, low-salt sausages and restructured meat products

- manufactured with pork hams and loins. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(2), 261-265. Abstract.
- Clarke, D. D., Mycek, M. J., Neidle, A. y Waelsch, H. (1959). The Incorporation of Amines Into Protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79, 338-354.
- Cofrades, S., Ayo, J., Serrano, A., Carballo, J. y Jiménez Colmenero, F. (2006). Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 458-466.
- Comisión del Codex Alimentarius.(2006). Inventario de coadyuvantes de elaboración. Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos. Reporte CX/FAC/06/38/13. Roma, Italia: Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias.
- Cortez, J., Bonner, P. L. R. y Griffin, M. (2004). Application of transglutaminases in the modification of wool textiles. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 64-72.
- Crawford, Y. J., Murano, E. A., Olson, D. G. y Shenoy, K. (1996). Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogenes* spores in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 59(7), 711-715.
- Davis, C. y Reeves, R. (2002). High value opportunities from the chicken egg. *Rural Industries Research and Development Corporation*, Report No.02/094. Sidney, Australia: Australian Government.
- de Jong, G. A. H. y Koppelman, S. J. (2002). Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications. *Journal of Food Science*, 67(8), 2798-2806.
- de Jong, G. A. H., Wijngaards, G., Boumans, H., Koppelman, S. J. y Hessing, M. (2001). Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and *Streptoverticillium mobaraense*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3389-3393.
- de Jong, G. A. H., Wijngaards, G. y Koppelman, S. J. (2003). Transglutaminase inhibitor from milk. *Journal of Food Science*, 68(3), 820-825.
- de Lamballerie-Anton, M., Delepine, S. y Chapleau, N. (2002). High pressure effect on meat and lupin protein digestibility. *High Pressure Research*, 22(3-4), 649-652.

- 
- de Lamballerie-Anton, M., Taylor, R. y Culioli, J. (2002). High pressure processing of meat. En: J.Kerry, J.Kerry y D.Ledward, (Ed.). *Meat processing* (Chap. 16), 313-331. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC.
- Dickinson, E. (1992). An introduction to food colloids. 66-70. Oxford: University Press.
- Dickinson, E. (1997). Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends in Food Science and Technology*, 8(10), 334-339.
- Dissing, J., Bruun-Jensen, L. y Skibsted, L. H. (1997). Effect of high-pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 205(1), 11-13.
- Dondero, M., Curotto, E. y Figueroa, V. (2002). Transglutaminase effects on gelation of jack mackerel surimi *Trachurus murphyi*. *Food Science and Technology International*, 8(1), 49-54.
- Dondero, M., Figueroa, V., Morales, X. y Curotto, E. (2006). Transglutaminase effects on gelation capacity of thermally induced beef protein gels. *Food Chemistry*, 99(3), 546-554.
- Donovan, J. W., Mapes, C. J., Davis, J. G. y Garibaldi, J. A. (1975). Differential scanning calorimetric study of stability of egg-white to heat denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(1), 73-83.
- Dumay, E., Lambert, C., Funtenberger, S. y Cheftel, J. C. (1996). Effects of high pressure on the physico-chemical characteristics of dairy creams and model oil/water emulsions. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29(7), 606-625.
- Dumay, E. M., Kalichevsky, M. T. y Cheftel, J. C. (1998). Characteristics of pressure-induced gels of beta-lactoglobulin at various times after pressure release. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 31(1), 10-19.
- Dumoulin, M., Ozawa, S. y Hayashi, R. (1998). Textural properties of pressure-induced gels of food proteins obtained under different temperatures including subzero. *Journal of Food Science*, 63(1), 92-95.
- Earnshaw, R. (1996). High pressure food processing. *Nutrition and Food Science*, 2, 8-11.

- Egelandsdal, B. (1986). Conformation and structure of mildly heat-treated ovalbumin in dilute solutions and gel formation at higher protein concentrations. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 28(6), 560-568.
- Faergemand, M., Sorensen, M. V., Jorgensen, U., Budolfsen, G. y Qvist, K. B. (1999). Transglutaminase: effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. *Milchwissenschaft*, 54(10), 563-566.
- FAO Departamento de Desarrollo Económico y Social. (2006). Evolución de la población mundial. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. Disponible en URL: [http://www.fao.org/es/spanish/index\\_es.htm](http://www.fao.org/es/spanish/index_es.htm). Acceso: 21/11/2006.
- FAO Dirección de Estadística. (2007a). Análisis global del mercado. Carne y productos cárnicos. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. Disponible en URL: <http://www.fao.org/docrep/010/ah864e/ah864e09.htm>. Acceso: 03/06/2007a.
- FAO Dirección de Estadística. (2007b). Principales productores de alimentos y productos agrícolas: carne de pollo. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. Disponible en URL: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=es&item=1094&year=2005>. Acceso: 14/01/2007b.
- FAO Dirección de Estadística. (2007). Principales productores de alimentos y productos agrícolas: huevos de gallina. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. Disponible en URL: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?item=1062&lang=es&year=2005>. Acceso: 10/01/2007.
- FAPRI Food and Agricultural Policy Research Institute. (2007). Commodities database: Consumption *per capita* of broiler. *Searchable Outlook Database*. Iowa State University. Disponible en URL: <http://www.fapri.iastate.edu/tools/outlook.aspx>. Acceso: 15/04/2007.
- Farr, D. (1990). High pressure technology in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 1990(1), 14-16.
- Ferry, J. D. (1948). Protein gels. *Advances in Protein Chemistry*, 4, 1-78.
- Fesus, L. y Piacentini, M. (2002). Transglutaminase 2: An enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(10), 534-539.

- 
- Findlay, C. F. Y Barbut, S. (1990). Differential scanning calorimetry of meat. En: V.R.Harwalkar y C.Ma, (Ed.). *Thermal analysis of foods*, 92-125. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Fisher, A. (1994). Tecnología de elaboración y producción de productos cárnicos. En: O. Prändl, (Ed.). *Tecnología e Higiene de la Carne* (Cap 4), 511-625. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Flanagan, J., Gunning, Y. y Fitzgerald, R. J. (2003). Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. *Food Research International*, 36(3), 267-274.
- Foegeding, E. A. Y Hamman, D. D. (1992). Physicochemical aspects of muscle tissue behavior. En: H.G.Schwartzberg y R.W.Hartel, (Ed.). *Physical Chemistry of Foods*, 423-441. New York: Marcel Dekker.
- Folk, J. E. y Chung, S. I. (1985). Transglutaminases. *Methods in Enzymology*, 113, 358-375.
- Friedman, M. y Finot, P. A. (1990). Nutritional improvement of bread with lysine and gamma-glutamyllysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(11), 2011-2020.
- Funtenberger, S., Dumay, E. y Cheftel, J. C. (1997). High pressure promotes beta-lactoglobulin aggregation through SH/SS interchange reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 912-921.
- Galazka, V. B., Dickinson, E. y Ledward, D. A. (2000). Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5(3-4), 182-187.
- Galazka, V. B. y Ledward, D. A. (1998). Functional properties of food macromolecules. S.E.Hill, D.A.Ledward y J.R.Mitchell (Ed.). 278-301. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- Galazka, V. B., Smith, D., Ledward, D. A. y Dickinson, E. (1999). Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chemistry*, 64(3), 303-310.
- Galazka, V. B., Sumner, I. G. y Ledward, D. A. (1996). Changes in protein-protein and protein-polysaccharide interactions induced by high pressure. *Food Chemistry*, 57(3), 393-398.

- Galluzzo, S. J. y Regenstein, J. M. (1978a). Emulsion capacity and timed emulsification of chicken breast muscle myosin. *Journal of Food Science*, 43(6), 1757-1760.
- Galluzzo, S. J. y Regenstein, J. M. (1978b). Role of chicken breast muscle proteins in meat emulsion formation: Myosin, actin and synthetic actomyosin. *Journal of Food Science*, 43(6), 1761-1765.
- Garcia, A. F., Heindl, P., Voigt, H., Büttner, M., Butz, P., Tauber, N., Tauscher, B. y Pfaff, E. (2005). Dual nature of the infectious prion protein revealed by high pressure. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 9842-9847.
- Garcia, A. F., Heindl, P., Voigt, H., Büttner, M., Wienhold, D., Butz, P., Starke, J., Tauscher, B. y Pfaff, E. (2004). Reduced proteinase K resistance and infectivity of prions after pressure treatment at 60 degrees C. *Journal of General Virology*, 85, 261-264.
- Gekko, K. y Koga, S. (1983). The effect of pressure on thermal-stability and *in vitro* fibril formation of collagen. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(5), 1027-1033.
- Gerrard, J. A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science and Technology*, 13(12), 391-399.
- Gerrard, J. A., Fayle, S. E., Brown, P. A., Sutton, K. H., Simmons, L. y Rasiah, I. (2001). Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. *Journal of Food Science*, 66(6), 782-786.
- Gerrard, J. A. y Sutton, K. H. (2005). Addition of transglutaminase to cereal products may generate the epitope responsible for coeliac disease. *Trends in Food Science and Technology*, 16(11), 510-512.
- Gilleland, G. M., Lanier, T. C. y Hamann, D. D. (1997). Covalent bonding in pressure-induced fish protein gels. *Journal of Food Science*, 62(4), 713-716, 733.
- Gillin, E. D. (2002a). World egg production, trade and supply: Present and future. En: E.Fallou, editores. *International Network for Family Poultry Development Newsletter*. 11, 2-9. Disponible en URL: <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/infpd/documents/newsletters/Infpd112.pdf>. Acceso: 27/02/2007a.

- 
- Gillin, E. D. (2002b). World meat production, trade and supply: Present and future. En: E.Fallou, editores. *International Network for Family Poultry Development Newsletter*. 12, 3-7. Disponible en URL: <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/infpd/documents/newsletters/Infpd121.pdf>. Acceso: 27/02/2007b.
- Gomes, M. R. A., Clark, D. C. y Ledward, D. A. (1998). Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours. *Food Chemistry*, 63(3), 363-372.
- Gómez-Guillén, M. C., Montero, P., Solas, M. T. y Pérez-Mateos, M. (2005). Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel *Trachurus spp.* muscle under high pressure. *Food Research International*, 38(1), 103-110.
- Gordon, A. y Barbut, S. (1990). The role of the interfacial protein film in meat batter stabilization. *Food Structure*, 9(2), 77-90.
- Gordon, A. y Barbut, S. (1992). Mechanisms of meat batter stabilization: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(4), 299-332.
- Gould, G. W. y Sale, A. J. H. (1970). Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology*, 60, 335-346.
- Gross, M. y Jaenicke, R. (1994). Proteins under pressure: The influence of high hydrostatic-pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European Journal of Biochemistry*, 221(2), 617-630.
- Gutiérrez, M. A., Takahashi, H. y Juneja, L. R. (1997). Nutritive evaluation of hen eggs. En: T.Yamamoto, L.R.Juneja, H.Hatta y M.Kim, (Ed.). *Hen eggs: Their basic and applied science* (Chap. 3), 25-35. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- Hammer, G. F. (1992). Sustancias aditivas y aditivos. En: F. Wirth, (Ed.). *Tecnología de los Embutidos Escaldados* (Chap. 5), 83-106. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Hammer, G. F. (1998). Microbial transglutaminase and diphosphate in finely comminuted cooked sausage. *Fleischwirtschaft*, 78(11), 1155-1156, 1159-1162, 1186.
- Han, G. D. (2006). Heat and high-pressure treatments on in vitro digestibility and allergenicity of beef extract. *Food Science and Biotechnology*, 15(4), 523-528.

- Han, X. Q. y Damodaran, S. (1996). Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1211-1217.
- Handa, A., Hayashi, K., Shidara, H. y Kuroda, N. (2001). Correlation of the protein structure and gelling properties in dried egg white products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3957-3964.
- Hayakawa, I., Kajihara, J., Morikawa, K., Oda, M. y Fujio, Y. (1992). Denaturation of bovine serum-albumin (BSA) and ovalbumin by high-pressure, heat and chemicals. *Journal of Food Science*, 57(2), 288-292.
- Hayakawa, I., Linko, Y. Y. y Linko, P. (1996). Mechanism of high pressure denaturation of proteins. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29(8), 756-762.
- Hayashi, R., Kawamura, Y., Nakasa, T. y Okinaka, O. (1989). Application of high-pressure to food-processing: pressurization of egg-white and yolk, and properties of gels formed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), 2935-2939.
- Heindl, P., Garcia, A. F., Butz, P., Pfaff, E. y Tauscher, B. (2006). Protein conformation determines the sensibility to high pressure treatment of infectious scrapie prions. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1764(3), 552-557.
- Heinze, V. y Kortzchack, F. (2002). Method for modifying the protein structure of a PrP<sup>Sc</sup> in a targeted manner. German Patent Application. (G P WO 02/49460, EP 1343391).
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., van der Broeck, I. y Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9(5), 197-203.
- Heremans, K. (1982). High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering*, 11, 1-21.
- Heremans, K. y Smeller, L. (1997). Pressure versus temperature behaviour of proteins. *European Journal of Solid State and Inorganic Chemistry*, 34(7-8), 745-758.
- Heremans, L. y Heremans, K. (1989). Raman-spectroscopic study of the changes in secondary structure of chymotrypsin: Effect of pH and pressure on the salt bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 999(2), 192-197.



- 
- Hermansson, A. M. (1978). Denaturation and aggregation reactions involved in gel formation. *American Chemical Society*, 175(3), 17.
- Hewson, P. F. S. (1986). Origin and development of the british poultry industry: the first hundred years. *British Poultry Science*, 27, 525-539.
- Hirose, M. (1993). Molten globule state of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4(2), 48-51.
- Hongsprabhas, P. y Barbut, S. (1997). Protein and salt effects on Ca<sup>2+</sup> induced cold gelation of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 62(2), 382-385.
- Hoover, D. G. (1993). Pressure effects on biological systems. *Food Technology*, 47(6), 150-155.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F. y Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic-pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43(3), 99-107.
- Howell, W. H., McNamara, D. J., Tosca, M. A., Smith, B. T. y Gaines, J. A. (1997). Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: A meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65(6), 1747-1764.
- Hu, F. B., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Manson, J. E., Ascherio, A., Colditz, G. A., Rosner, B. A., Spiegelman, D., Speizer, F. E., Sacks, F. R., Hennekens, C. H. y Willett, W. C. (1999). A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *Journal of the American Medical Association*, 281(15), 1387-1394.
- Hugas, M., Garriga, M. y Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62(3), 359-371.
- Iametti, S., Donnizzelli, E., Pittia, P., Rovere, P. P., Squarcina, N. y Bonomi, F. (1999). Characterization of high-pressure-treated egg albumen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3611-3616.
- Iametti, S., Donnizzelli, E., Vecchio, G., Rovere, P. P., Gola, S. y Bonomi, F. (1998). Macroscopic and structural consequences of high-pressure treatment of ovalbumin solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3521-3527.

- Ibarz, A., Sangronis, E., Barbosa-Canovas, G. V. y Swanson, B. G. (1999). Texture of egg gels induced by high hydrostatic pressure. *Food Science and Technology International*, 5(3), 191-201.
- Ikeuchi, Y., Tanji, H., Kim, K. y Suzuki, A. (1992). Mechanism of heat-induced gelation of pressurized actomyosin: Pressure-induced changes in actin and myosin in actomyosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1756-1761.
- Ikura, K., Goto, M., Yoshikawa, M., Sasaki, R. y Chiba, H. (1984). Use of transglutaminase: Reversible blocking of amino-groups in substrate proteins for a high-yield of specific products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(9), 2347-2354.
- Ikura, K., Kometani, T., Sasaki, R. y Chiba, H. (1980). Crosslinking of soybean-7S and soybean-11S proteins by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(12), 2979-2984. Abstract.
- Imm, J. Y., Lian, P. y Lee, C. M. (2000). Gelation and water binding properties of transglutaminase-treated skim milk powder. *Journal of Food Science*, 65(2), 200-205.
- Isbarn, S., Buckow, R., Himmelreich, A., Lehmacher, A. y Heinz, V. (2007). Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 70(3), 667-673.
- Ishimaru, D., Sa-Carvalho, D. y Silva, J. L. (2004). Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. *Vaccine*, 22(17-18), 2334-2339.
- Iwasaki, T., Noshiroya, K., Saitoh, N., Okano, K. y Yamamoto, K. (2006). Studies of the effect of hydrostatic pressure pretreatment on thermal gelation of chicken myofibrils and pork meat patty. *Food Chemistry*, 95(3), 474-483.
- Iwasaki, T. y Yamamoto, K. (2002). Effect of high hydrostatic pressure on chicken myosin subfragment-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30(5), 227-232.
- Jarmoluk, A. y Pietrasik, Z. (2003). Response surface methodology study on the effects of blood plasma, microbial transglutaminase and kappa-carrageenan on pork batter gel properties. *Journal of Food Engineering*, 60(3), 327-334.
- Jiménez Colmenero, F. (2002). Muscle protein gelation by combined use of high pressure/temperature. *Trends in Food Science and Technology*, 13(1), 22-30.

- 
- Johnson, T. M. y Zabik, M. E. (1981). Ultrastructural examination of egg-albumin protein foams. *Journal of Food Science*, 46(4), 1237-1240.
- Jones, K. W. y Mandigo, R. W. (1982). Effects of chopping temperature on the microstructure of meat emulsions. *Journal of Food Science*, 47(6), 1930-1935.
- Jung, S. (2000). Etude de l'effet des hautes pressions sur la texture, l'ultrastructure et un système enzymatique de viande bovine. Université de Nantes, France. Thèse de Doctorat.
- Jung, S., de Lamballerie-Anton, M. y Ghouli, M. (2000a). Modifications of ultrastructure and myofibrillar proteins of *post-rigor* beef treated by high pressure. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 33(4), 313-319.
- Jung, S., de Lamballerie-Anton, M. y Ghouli, M. (2000b). Textural changes in bovine meat treated with high pressure. *High Pressure Research*, 19(1-6), 459-464.
- Jung, S., Ghouli, M. y de Lamballerie-Anton, M. (2003). Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36(6), 625-631.
- Jurkiewicz, E., Billasboas, M., Silva, J. L., Weber, G., Hunsmann, G. y Clegg, R. M. (1995). Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic-pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), 6935-6937.
- Kalichevsky, M. T., Knorr, D. y Lillford, P. J. (1995). Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science and Technology*, 6(8), 253-259.
- Kamath, G. G., Lanier, T. C., Foegeding, E. A. y Hamann, D. D. (1992). Nondisulfide covalent cross-linking of myosin heavy-chain in setting of alaska pollock and atlantic croaker surimi. *Journal of Food Biochemistry*, 16(3), 151-172.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M. y Shimonishi, Y. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* Sp Strain-S-8112. *Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11565-11572.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. y Suzuki, E. (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44252-44260.

- Katayama, K., Chin, K. B., Yoshihara, S. y Muguruma, M. (2006). Microbial transglutaminase improves the property of meat protein and sausage texture manufactured with low-quality pork loins. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(1), 102-108. Abstract.
- Kato, A., Ibrahim, H. R., Watanabe, H., Honma, K. y Kobayashi, K. (1990). Structural and gelling properties of dry-heating egg-white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 32-37.
- Kato, A., Komatsu, K., Fujimoto, K. y Kobayashi, K. (1985). Relationship between surface functional-properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(5), 931-934.
- Kato, A., Wada, T., Kobayashi, K., Seguro, K. y Motoki, M. (1991). Ovomucin food protein conjugates prepared through the transglutaminase reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(4), 1027-1031.
- Kaufman, S. P., Hosney, R. C. y Fennema, O. (1986). Dough rheology: A review of structural models and the role of disulfide interchange reactions. *Cereal Foods World*, 31(11), 820-824.
- Kennedy, O. B., Stewart-Knox, B. J., Mitchell, P. C. y Thurnham, D. I. (2004). Consumer perceptions of poultry meat: A qualitative analysis. *Nutrition and Food Science*, 34, 122-129.
- Kerver, J. M., Bianchi, L. J., McNamara, D. J. y Song, W. O. (2000). The nutritional contributions of eggs to the american diet in the 90's. *Faseb Journal*, 14(4), A220.
- Kijowski, J. M. y Mast, M. G. (1988). Thermal properties of proteins in chicken broiler tissues. *Journal of Food Science*, 53(2), 363-366.
- Kilic, B. (2003). Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken döner kebab. *Meat Science*, 63(3), 417-421.
- Kimura, I., Sugimoto, M., Toyoda, K., Seki, N., Arai, K. y Fujita, T. (1991). A study on the cross-linking reaction of myosin in kamaboko suwari gels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(7), 1389-1396. Abstract.
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 56(3), 242-258.
- Kiosseoglou, V. (2003). Egg yolk protein gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8(4-5), 365-370.

- 
- Kiosseoglou, V. y Paraskevopoulou, A. (2005). Molecular interactions in gels prepared with egg yolk and its fractions. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 527-532.
- Knorr, D., Heinz, V. y Buckow, R. (2006). High pressure application for food biopolymers. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1764(3), 619-631.
- Kumazawa, Y., Sakamoto, H., Kawajiri, H., Seguro, K. y Motoki, M. (1996). Determination of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine in several fish eggs and muscle proteins. *Fisheries Science*, 62(2), 331-332.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J. y Soeda, T. (1997). Cheese production using transglutaminase and milk clotting enzyme giving large amount of cheese curd yielding cheese of good flavour and appearance. Ajinomoto Co.Inc, assignee. United States Patent Application. (US Patent 5681598).
- Kuraishi, C., Sakamoto, J. y Soeda, T. (1998). Application of transglutaminase for meat processing. *Fleischwirtschaft*, 78(6), 657-662.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C. y Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62(3), 488-490, 515.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. y Susa, Y. (2001). Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17(2), 221-246.
- Kurth, L. y Rogers, P. J. (1984). Transglutaminase Catalyzed Cross-Linking of Myosin to Soya Protein, Casein and Gluten. *Journal of Food Science*, 49(2), 573-576.
- Kwan, S. W. y Easa, A. M. (2003). Comparing physical properties of retort-resistant glucono-delta-lactone tofu treated with commercial transglutaminase enzyme or low levels of glucose. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36(6), 643-646.
- Lambert, Y., Demazeau, G., Largeau, A. y Bouvier, J. M. (1999). Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment. *Food Chemistry*, 67, 7-16.
- Lantto, R., Plathin, P., Niemisto, M., Buchert, J. y Autio, K. (2006). Effects of transglutaminase, tyrosinase and freeze-dried apple pomace powder on gel forming and structure of pork meat. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39(10), 1117-1124.

- Lauber, S., Henle, T. y Klostermeyer, H. (2000). Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, 210(5), 305-309.
- Lauber, S., Krause, I., Klostermeyer, H. y Henle, T. (2003). Microbial transglutaminase crosslinks beta-casein and beta-lactoglobulin to heterologous oligomers under high pressure. *European Food Research and Technology*, 216(1), 15-17.
- Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H. y Henle, T. (2001a). Oligomerization of beta-lactoglobulin by microbial transglutaminase during high pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 213(3), 246-247.
- Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H. y Henle, T. (2001b). Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 273-276.
- Le Bail, A., Hamadami, N. y Bahuaud, S. (2006). Effect of high-pressure processing on the mechanical and barrier properties of selected packagings. *Packaging Technology and Science*, 19(4), 237-243.
- Le Denmat, M., Anton, M. y Gandemer, G. (1999). Protein denaturation and emulsifying properties of plasma and granules of egg yolk as related to heat treatment. *Journal of Food Science*, 64(2), 194-197.
- Ledward, D. A. (1986). Gelation of gelatin. En: J.R.Mitchell y D.A.Ledward, (Ed.). *Functional properties of food macromolecules*, 171-201. London: Elsevier Applied Science.
- Ledward, D. A. (2000). Effects of pressure on protein structure. *High Pressure Research*, 19(1-6), 391-400.
- Lee, D. U. (2002). Application of combined non-thermal treatments for the processing of liquid whole egg. Fakultät III. Technischen Universität Berlin, Deutschland. Doktorarbeit.
- Lee, D. U., Heinz, V. y Knorr, D. (1999). Evaluation of processing criteria for the high pressure treatment of liquid whole egg: Rheological study. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 32(5), 299-304.
- Lee, E. Y. y Park, J. (2002). Pressure inactivation kinetics of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Journal of Food Science*, 67(3), 1103-1107.

- 
- Lee, E. Y. y Park, J. (2003). Microbial transglutaminase induced cross-linking of a selected comminuted muscle system: Processing conditions for physical properties of restructured meat. *Food Science and Biotechnology*, 12(4), 365-370.
- Lee, H. G., Lanier, T. C., Hamann, D. D. y Knopp, J. A. (1997). Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *Journal of Food Science*, 62(1), 20-24.
- Lesiow, T. y Xiong, Y. L. (2003). Chicken muscle homogenate gelation properties: effect of pH and muscle fiber type. *Meat Science*, 64(4), 399-403.
- Linnemann, A. R., Meerdink, G., Meulenbergh, M. T. G. y Jongen, W. M. F. (1998). Consumer-oriented technology development. *Trends in Food Science and Technology*, 9(11-12), 409-414.
- López, T. J., Roig, A. X., Capellas, M., Trujillo, A. J., Hernández, M. y Guamis, B. (2003). Evaluation of the importance of germinative cycles for destruction of *Bacillus cereus* spores in miniature cheeses. *High Pressure Research*, 23(1-2), 81-85.
- López, T. J., Roig, A. X., Trujillo, A. J., Capellas, M. y Guamis, B. (2003). Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3075-3081.
- Lorenzen, P. C. (2000). Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. *Milchwissenschaft*, 55(12), 667-670.
- Lorenzen, P. C., Mautner, A. y Schlimme, E. (1999). Effect of enzymatic crosslinking of milk proteins on the resulting properties of yoghurt products. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 51(1), 89-97.
- Lorenzen, P. C., Schlimme, E. y Roos, N. (1998). Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. *Nahrung-Food*, 42(3-4), 151-154.
- Lu, G. H. y Chen, T. C. (1999). Application of egg white and plasma powders as muscle food binding agents. *Journal of Food Engineering*, 42(3), 147-151.
- Lucey, J. A. y Singh, H. (1998). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30(7), 529-542.
- Ma, H. J. y Ledward, D. A. (2004). High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. *Meat Science*, 68(3), 347-355.

- Mandava, R. Y Hoogenkamp, H. (2001). El papel de los productos procesados en la industria de la carne de aves. En: R.I.Richardson y G.C.Mead, (Ed.). *Ciencia de la carne de ave*. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Mariniello, L., Di Pierro, P., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P. y Porta, R. (2003). Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 102(2), 191-198.
- Marmar, W. N., Brown, E. M., Taylor, M. M. y Cabeza, L. F. (2001). Enzymatic treatment of proteinaceous animal by-product materials to impart cohesion and strength. The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture, assignee. United States Patent Application. (US P 6200789-B1).
- Massaux, C., Bitar, C., Bera, F., Sindic, M. y Deroanne, C. (2000). High pressure-induced gel formation of chicken meat patties. *High Pressure Research*, 19(1-6), 465-473. Abstract.
- Matsumura, Y., Lee, D. S. y Mori, T. (2000). Molecular weight distributions of alpha-lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. *Food Hydrocolloids*, 14(1), 49-59.
- Matsumura, Y. Y Mori, T. (1996). Gelation. En: G.M.Hall, (Ed.). *Methods of testing protein functionality* (Chap. 4), 76-109. London: Chapman and Hall.
- Mayer, R. S. (2000). Ultra high pressure, high temperature food preservation process. R.S.Mayer, assignee. United States Patent Application. (US P 6177115).
- Menéndez, O., Rawel, H., Schwarzenbolz, U. y Henle, T. (2006). Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high-pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1716-1721.
- Messens, W., VanCamp, J. y Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 8(4), 107-112.
- Metrick, C., Hoover, D. G. y Farkas, D. F. (1989). Effects of high hydrostatic-pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54(6), 1547.
- Milkowski, A. y Sosniki, A. A. (1999). Method for treating PSE meat with transglutaminase. Kraft Foods, I., assignee. United States Patent Application. (US P 5928689).



- 
- Millar, S., Wilson, R., Moss, B. W. y Ledward, D. A. (1994). Oxymyoglobin formation in meat and poultry. *Meat Science*, 36(3), 397-406.
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg-white protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 6(7), 225-232.
- Mine, Y. (1997). Effect of dry heat and mild alkaline treatment on functional properties of egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2924-2928.
- Mine, Y. (2002). Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World's Poultry Science Journal*, 58(1), 31-39.
- Mine, Y., Noutomi, T. y Haga, N. (1991). Emulsifying and structural-properties of ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 443-446.
- Montero, P., López-Caballero, M. E., Pérez-Mateos, M., Solas, M. T. y Gómez-Guillén, M. C. (2005). Transglutaminase activity in pressure-induced gelation assisted by prior setting. *Food Chemistry*, 90(4), 751-758.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P. y Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73-S86.
- Motoki, M., Okiyama, A., Nonaka, M., Tanaka, H., Uchio, R., Matsuura, A., Ando, H. y Umeda, K. (1990). Novel transglutaminase. Ajinomoto Co.Inc y Amano Pharmaceutical Co.Ltd., assignee. European Patent Application. (E P 0379606 A1).
- Motoki, M. y Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9(5), 204-210.
- Mozhaev, V. V., Bec, N. y Balny, C. (1994). Pressure effects on enzyme-reactions in mainly organic media - alpha-chymotrypsin in reversed micelles of aerosol OT in octane. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34(1), 191-199.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. y Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins: Structure Function and Genetics*, 24(1), 81-91.
- Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., Sathe, S. K. y Soeda, T. (2003). Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Science*, 63(2), 191-197.

- Mujoo, R. y Ng, P. K. W. (2003). Identification of wheat protein components involved in polymer formation on incubation with transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 80(6), 703-706.
- Nakahara, C., Nozawa, P. y Seki, N. (1999). A comparison of cross-linking of fish myofibrillar proteins by endogenous and microbial transglutaminases. *Fisheries Science*, 65(1), 138-144.
- Nakai, S. (1983). Structure function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(4), 676-683.
- Nakai, S., Hayakawa, S. y Li-Chan, E. (1984). Effects of hydrophobicity, charge and molecular-structure on solubility of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(4), 656.
- Nakayama, T., Niwa, E. y Hamada, I. (1983). New type of myosin gel induced by salts. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(2), 227-233.
- Ngapo, T. M., Wilkinson, B. H. P. y Chong, R. (1996). 1,5-Glucono-delta-lactone-induced gelation of myofibrillar protein at chilled temperatures. *Meat Science*, 42(1), 3-13.
- Ngarize, S., Adams, A. y Howell, N. (2005). A comparative study of heat and high pressure induced gels of whey and egg albumen proteins and their binary mixtures. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 984-996.
- Ngarize, S., Herman, H., Adams, A. y Howell, N. (2004). Comparison of changes in the secondary structure of unheated, heated, and high-pressure-treated ss-lactoglobulin and ovalbumin proteins using Fourier transform Raman spectroscopy and self-deconvolution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6470-6477.
- Nio, N., Motoki, M. y Takinami, K. (1986). Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(4), 851-855.
- Nisbet, A. D., Saundry, R. H., Moir, A. J. G., Fothergill, L. A. y Fothergill, J. E. (1981). The Complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *European Journal of Biochemistry*, 115(2), 335-345.
- Noguchi, K., Ishikawa, K., Yokoyama, K., Ohtsuka, T., Nio, N. y Suzuki, E. (2001). Crystal structure of red sea bream transglutaminase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12055-12059.

- 
- Noguchi, T., Tanimoto, H. y Mori, M. (1992). A promoting material for absorption of materials and compositions containing it. Japan Kokai Tokkyo Koho, asignee. Japanese Patent Application. (J P 04349869).
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (1992). Enzyme Nomenclature. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. World wide web material prepared by G. P. Moss, Department of Chemistry, University of London. Disponible en URL: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Acceso: 09/03/2007.
- Nonaka, M., Ito, R., Sawa, A., Motoki, M. y Nio, N. (1997). Modification of several proteins by using  $\text{Ca}^{2+}$  independent microbial transglutaminase with high-pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 11(3), 351-353.
- Nonaka, M., Matsuura, Y. y Motoki, M. (1996). Incorporation of lysine- and lysine dipeptides into alpha-(S1)-casein by  $\text{Ca}^{2+}$  independent microbial transglutaminase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60(1), 131-133.
- Nonaka, M., Sakamoto, H., Toiguchi, S., Yamagiwa, K., Soeda, T. y Motoki, M. (1996). Retort-resistant tofu prepared by incubation with microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 10(1), 41-44.
- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K. y Matsuura, A. (1989). Polymerization of several proteins by  $\text{Ca}^{2+}$  independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2619-2623.
- Nonaka, M., Toiguchi, S., Sakamoto, H., Kawajiri, H., Soeda, T. y Motoki, M. (1994). Changes caused by microbial transglutaminase on physical-properties of thermally-induced soy protein gels. *Food Hydrocolloids*, 8(1), 1-8.
- Nys, Y. y Sauveur, B. (2004). The nutritional value of eggs. *Productions Animales*, 17(5), 385-393.
- O'Connell, J. E. y de Kruif, C. G. (2003). Beta-casein micelles; cross-linking with transglutaminase. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 216(1-3), 75-81.
- O'Sullivan, M. M., Kelly, A. L. y Fox, P. F. (2002). Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *Journal of Dairy Research*, 69(3), 433-442.
- Oh, J. H., Wang, B., Field, P. D. y Aglan, H. A. (2004). Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with

- transglutaminase. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(3), 287-294.
- Ohgushi, M. y Wada, A. (1983). "Molten globule state": a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *Febs Letters*, 164(1), 21-24.
- Ohmiya, K., Kajino, T., Shimizu, S. y Gekko, K. (1989). Effect of pressure on the association states of enzyme-treated caseins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(1), 1-7.
- Ohmori, T., Shigehisa, T., Taji, S. y Hayashi, R. (1991). Effect of high-pressure on the protease activities in meat. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(2), 357-361.
- Ohshima, T., Ushio, H. y Koizumi, C. (1993). High-pressure processing of fish and fish products. *Trends in Food Science and Technology*, 4(11), 370-375.
- Okamoto, M., Kawamura, Y. y Hayashi, R. (1990). Application of high-pressure to food-processing: Textural comparison of pressure-induced and heat-induced gels of food proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 183-189.
- Olsen, K., Kristiansen, K. R. y Skibsted, L. H. (2003). Effect of high hydrostatic pressure on the steady-state kinetics of tryptic hydrolysis of beta-lactoglobulin. *Food Chemistry*, 80(2), 255-260.
- Orlien, V., Hansen, E. y Skibsted, L. H. (2000). Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research and Technology*, 211(2), 99-104.
- Özrenk, E. (2006). The use of transglutaminase in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 59(1), 1-7.
- Paardekooper, E. J. C. y Wijngaards, G. (1988). Composite meat product and method for the manufacture thereof. Nederlandse Centrale Organisatie Voor Toegepast, asignee. United States Patent Application. (US P 4741906, EP 0201975 B1).
- Palou, E., López Malo, A., Barbosa Canovas, G., Welti, C. J. y Swanson, B. G. (1999). Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *Journal of Food Science*, 64(1), 42-45.

- 
- Paraskevopoulou, A. y Kiosseoglou, V. (1997). Texture profile analysis of heat-formed gels and cakes prepared with low cholesterol egg yolk concentrates. *Journal of Food Science*, 62(1), 208-211.
- Paraskevopoulou, A., Kiosseoglou, V., Aleviopoulos, S. y Kasapis, S. (2000). Small deformation measurements of single and mixed gels of low cholesterol yolk and egg white. *Journal of Texture Studies*, 31(2), 225-244.
- Park, S. W., Sohn, K. H., Shin, J. H. y Lee, H. J. (2001). High hydrostatic pressure inactivation of *Lactobacillus viridescens* and its effects on ultrastructure of cells. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), 775-781.
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J. T., Robenek, I. R., Wolf, S. y Fuchsbaauer, H. L. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. Purification, characterisation and sequence of the zymogen. *European Journal of Biochemistry*, 257(3), 570-576.
- Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1400-1409.
- Pedersen, M. H., Hansen, T. K., Sten, E., Seguro, K., Ohtsuka, T., Morita, A., Bindslev-Jensen, C. y Poulsen, L. K. (2004). Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO Decision Tree. *Molecular Nutrition and food Research*, 48(6), 434-440.
- Pérez-Mateos, M., Gómez-Guillén, M. C., Hurtado, J. L., Solas, M. T. y Montero, P. (2002). The effect of rosemary extract and omega-3 unsaturated fatty acids on the properties of gels made from the flesh of mackerel *Scomber scombrus* by high pressure and heat treatments. *Food Chemistry*, 79(1), 1-8.
- Pietrasik, Z. (2003). Binding and textural properties of beef gels processed with kappa-carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase. *Meat Science*, 63(3), 317-324.
- Pietrasik, Z. y Jarmoluk, A. (2003). Effect of sodium caseinate and kappa-carrageenan on binding and textural properties of pork muscle gels enhanced by microbial transglutaminase addition. *Food Research International*, 36(3), 285-294.
- Pietrasik, Z. y Li-Chan, E. C. Y. (2002). Binding and textural properties of beef gels as affected by protein, kappa-carrageenan and microbial transglutaminase addition. *Food Research International*, 35(1), 91-98.

- Pietrasik, Z. y Li-Chan, E. C. Y. (2002). Response surface methodology study on the effects of salt, microbial transglutaminase and heating temperature on pork batter gel properties. *Food Research International*, 35(4), 387-396.
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G. y Taoukis, P. S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60(1), 21-29.
- Poulsen, L. K. (2004). Allergy assessment of foods or ingredients derived from biotechnology, gene-modified organisms, or novel foods. *Molecular Nutrition and food Research*, 48(6), 413-423.
- Powrie, W. D. Y Nakai, S. (2000). Características de los alimentos líquidos de origen animal: Huevos. En: O.Fennema, (Ed.). *Química de los Alimentos 2a. Ed.* (Cap. 14), 931-959. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Priglinger, S. G., Alge, C. S., Neubauer, A. S., Kristin, N., Hirneiss, C., Eibl, K., Kampik, A. y Welge-Lussen, U. (2004). TGF-beta 2-induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(3), 955-963.
- Pszczola, D. E. (2002). Beefing up innovations for meat and poultry ingredients. *Food Technology*, 56(3), 54, 56, 58, 60, 62-66, 79.
- Ramírez, J., Uresti, R., Téllez, S. y Vázquez, M. (2002). Using salt and microbial transglutaminase as binding agents in restructured fish products resembling hams. *Journal of Food Science*, 67(5), 1778-1784.
- Rasanayagam, V., Balasubramaniam, V. M., Ting, E., Sizer, C. E., Bush, C. y Anderson, C. (2003). Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science*, 68(1), 254-259.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K. y Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69-112.
- Reddy, N. R., Solomon, H. M., Fingerhut, G. A., Rhodehamel, E. J., Balasubramaniam, V. M. y Palaniappan, S. (1999). Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. *Journal of Food Safety*, 19(4), 277-288.
- Reddy, N. R., Tetzloff, R. C., Solomon, H. M. y Larkin, J. W. (2006). Inactivation of *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B spores by high pressure processing

- at moderate to elevated high temperatures. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7(3), 169-175.
- Reiner, R., Pasternack, R. y Zotzel, J. (2006). Protein layers to be used e.g. in the production of photographic film are crosslinked with (especially microbial) transglutaminase. N zyme biotech GmbH, assignee. European Patent Application. (E P 1645907-A1).
- Renerre, M. (1990). Factors involved in the discoloration of beef meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 25(6), 613-630.
- Riffero, L. M. y Holmes, Z. A. (1983). Characteristics of pre-rigor pressurized versus conventionally processed beef cooked by microwaves and by broiling. *Journal of Food Science*, 48(2), 346.
- Ritz, M., Tholozan, J. L., Federighi, M. y Pilet, M. F. (2001). Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2240-2247.
- Ruiz-Carrascal, J. y Regenstein, J. (2002). Emulsion stability and water uptake ability of chicken breast muscle proteins as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 67(2), 734-739.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Kawajiri, H. y Motoki, M. (1995). Epsilon-(gamma-glutamyl)lysine cross-link distribution in foods as determined by improved method. *Journal of Food Science*, 60(2), 416-419.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Toiguchi, S., Seguro, K., Soeda, T. y Motoki, M. (1995). Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *Journal of Food Science*, 60(2), 300-304.
- San Martin, M. F., Barbosa-Canovas, G. V. y Swanson, B. G. (2002). Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(6), 627-645.
- Sancho, F., Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., Bouvier, J. M. y Narbonne, J. F. (1999). Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. *Journal of Food Engineering*, 39(3), 247-253.
- Sato, K., Tanaka, C., Kotaru, M., Yoshikawa, H., Kawabata, M., Ikeuchi, T., Sato, K., Nakamura, Y. y Ohtsuki, K. (2001). Different arrangement of epsilon(gamma-glutamyl)lysine cross-linking in Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) surimi proteins by *Streptoverticillium* and endogenous

- transglutaminases during suwari process. *Journal of Food Biochemistry*, 25(5), 397-409.
- Scheibenzuber, M., Grim, V., Blümelhuber, G., Behrendt, H., Ring, J. y Meyer-Pitroff, R. (2002). Influence of high pressure treatment on the allergenicity of foods. En: R.Winter, (Ed.). *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, 363-366. Berlin: Springer Verlag.
- Schut, J. (1976). Meat emulsions. En: S.E.Friberg y K.Larsson, (Ed.). *Food Emulsions 3a*. Ed., 385-458. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Seguro, K., Kumazawa, Y., Kuraishi, C., Sakamoto, H. y Motoki, M. (1996). The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is an available source of lysine for rats. *Journal of Nutrition*, 126(10), 2557-2562.
- Seki, N., Uno, H., Lee, N. H., Kimura, I., Toyoda, K., Fujita, T. y Arai, K. (1990). Transglutaminase activity in alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin-B. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(1), 125-132. Abstract.
- Sharma, R., Zakora, M. y Qvist, K. B. (2002). Susceptibility of an industrial alpha-lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*, 12(12), 1005-1012.
- Sherry, A. E., Patterson, M. F. y Madden, R. H. (2004). Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal, high-pressure and irradiation stress. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 887-893.
- Shimada, K. y Matsushita, S. (1980). Relationship between thermocoagulation of proteins and amino-acid compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(2), 413-417.
- Shimba, N., Yokoyama, Y. y Suzuki, E. (2002). NMR-based screening method for transglutaminases: Rapid analysis of their substrate specificities and reaction rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1330-1334.
- Shoji, T., Saeki, H., Wakameda, A. y Nonaka, M. (1994). Influence of ammonium salt on the formation of pressure-induced gel from walleye pollack surimi. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 60(1), 101-109. Abstract.
- Siegel, D. G., Church, K. E. y Schmidt, G. R. (1979). Gel structure of non-meat proteins as related to their ability to bind meat pieces. *Journal of Food Science*, 44(5), 1276-1279.



- 
- Silva, J. L., Cordeiro, Y. y Foguel, D. (2006). Protein folding and aggregation: Two sides of the same coin in the condensation of proteins revealed by pressure studies. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1764(3), 443-451.
- Silva, J. L. y Weber, G. (1993). Pressure stability of proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, 44, 89-113.
- Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9(4), 152-158.
- Smith, D., Galazka, V. B., Wellner, N. y Sumner, I. G. (2000). High pressure unfolding of ovalbumin. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(4), 361-370.
- Smyth, A. B., O'Neill, E. y Smith, D. M. (2001). Propiedades funcionales de las proteínas musculares de los productos de ave procesados. En: R.I.Richardson y G.C.Mead, (Ed.). *Ciencia de la carne de ave* (Cap. 18), 421-443. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S. A.
- Smyth, A. B., Smith, D. M., Vega-Warner, V. y O'Neill, E. (1996). Thermal denaturation and aggregation of chicken breast muscle myosin and subfragments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 1005-1010.
- Soeda, T. (2000). Cheese whey protein having improved texture, process for producing the same and use thereof. Ajinomoto Co.Inc, assignee. European Patent Application. (E P 0966887 A1).
- Soeda, T., Hokazono, A., Ozawa, T. y Fujiwara, H. (2005). Characteristics and mechanism of binding of foods by microbial transglutaminase. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 52(5), 207-211. Abstract.
- Soeda, T., Kasagi, T., Hokazono, A., Yamazaki, K. y Muguruma, M. (2006). Effects of salt and polyphosphate on physical properties of meat gel treated with microbial transglutaminase. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 53(2), 109-113. Abstract.
- Sorensen, E. S., Rasmussen, L. K. y Petersen, T. E. (1999). Component PP3 from bovine milk is a substrate for transglutaminase. Sequence location of putative crosslinking sites. *Journal of Dairy Research*, 66(1), 145-150.
- Speroni, F., Puppo, M. C., Chapleau, N., de Lamballerie, M., Castellani, O., Añón, M. C. y Anton, M. (2005). High-pressure induced physicochemical and

- functional modifications of low-density lipoproteins from hen egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5719-5725.
- Suzuki, A. (2000). Effects of heat and high pressure treatments on antigenicity of beef T. En: R.Hayashi, (Ed.). *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology* (19), 365-374. Kyoto:
- Suzuki, A., Suzuki, N., Ikeuchi, Y. y Saito, M. (1991). Effects of high-pressure treatment on the ultrastructure and solubilization of isolated myofibrils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(10), 2467-2473.
- Tabilo-Munizaga, G. y Barbosa-Canovas, G. V. (2004). Ultra high pressure technology and its use in surimi manufacture: An overview. *Food Science and Technology International*, 10(4), 207-222.
- Takagaki, Y., Narakawa, K. y Uchio, R. (1991). Coating of vegetables and fruits with transglutaminase and proteins for preservation. Japan Kokai Tokkyo Koho, asignee. Japanese Patent Application. (J P 03272639).
- Taylor, M. M., Marmer, W. N. y Brown, E. M. (2004). Molecular weight distribution and functional properties of enzymatically modified commercial and experimental gelatins. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 99(3), 133-144.
- Téllez-Luis, S. J., Uresti, R. M., Ramírez, J. A. y Vázquez, M. (2002). Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 953-959.
- Tewari, G., Jayas, D. S. y Holley, R. A. (1999). High pressure processing of foods: an overview. *Sciences des Aliments*, 19(6), 619-661.
- Thakur, B. R. y Nelson, P. E. (1998). High-pressure processing and preservation of food. *Food Reviews International*, 14(4), 427-447.
- Thébaudin, J. Y. Y Lefevre, A. C. (1994). L'oeuf et les ovoproduits utilisés en tant qu'ingrédients. En: J.L.Thapón y C.M.Bourgeois, (Ed.). *L'oeuf et les ovoproduits*, 300-314. Paris: Technique et Documentation Lavoisier.
- Torrent, J., Balny, C. y Lange, R. (2006). High pressure modulates amyloid formation. *Protein and Peptide Letters*, 13(3), 271-277.
- Totosaus, A., Gault, N. F. S. y Guerrero, I. (2000). Dynamic rheological behavior of meat proteins during acid-induced gelation. *International Journal of Food Properties*, 3(3), 465-472.

- 
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A. y Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(6), 589-601.
- Traoré, F. y Meunier, J. C. (1992). Cross-linking activity of placental F-XIIIa on whey proteins and caseins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(3), 399-402.
- Truong, V. D., Clare, D. A., Catignani, G. L. y Swaisgood, H. E. (2004). Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1170-1176.
- Tsai, G. J., Lin, S. M. y Jiang, S. T. (1996). Transglutaminase from *Streptovercillium ladakanum* and application to minced fish product. *Journal of Food Science*, 61(6), 1234-1238.
- Tsai, R., Cassens, R. G. y Briskey, E. J. (1972). Emulsifying properties of purified muscle proteins. *Journal of Food Science*, 37(2), 286-288.
- Tsao, C. Y., Kao, Y. C., Hsieh, J. F. y Jiang, S. T. (2002). Use of soy protein and microbial transglutaminase as a binder in low-sodium restructured meats. *Journal of Food Science*, 67(9), 3502-3506.
- Tsou, C. L. (1986). Location of the active-sites of some enzymes in limited and flexible molecular regions. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(10), 427-429.
- Tsukamasa, Y., Miyake, Y., Ando, M. y Makinodan, Y. (2002). Total activity of transglutaminase at various temperatures in several fish meats. *Fisheries Science*, 68(4), 929-933.
- Tsutsui, T. (1988). Functional-properties of heat-treated egg-yolk low-density lipoprotein. *Journal of Food Science*, 53(4), 1103-1106.
- Ueno, Y., Ikeuchi, Y. y Suzuki, A. (1999). Effects of high pressure treatments on intramuscular connective tissue. *Meat Science*, 52, 143-150.
- Ulmer, H. M., Ganzle, M. G. y Vogel, R. F. (2000). Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3966-3973.
- Uresti, R. M., Ramírez, J. A., López-Arias, N. y Vázquez, M. (2003). Negative effect of combining microbial transglutaminase with low methoxyl pectins on the

- mechanical properties and colour attributes of fish gels. *Food Chemistry*, 80(4), 551-556.
- Uresti, R. M., Velazquez, G., Vázquez, M., Ramírez, J. A. y Torres, J. A. (2006). Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chemistry*, 94(2), 202-209.
- US Department of Agriculture. (2006). National nutrient database for standard reference. *Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory Home Page*. Release 19 and 14. Disponible en URL: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acceso: 28/03/2007.
- van der Plancken, I., van Loey, A. y Hendrickx, M. E. (2005a). Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5726-5733.
- van der Plancken, I., van Loey, A. y Hendrickx, M. E. (2005b). Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(1), 11-20.
- van der Plancken, I., van Loey, A. y Hendrickx, M. E. (2007). Kinetic study on the combined effect of high pressure and temperature on the physico-chemical properties of egg white proteins. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 206-216.
- Verbeke, W. y Viaene, J. (1999). Beliefs, attitude and behaviour towards fresh meat consumption in Belgium: Empirical evidence from a consumer survey. *Food Quality and Preference*, 10(6), 437-445.
- Verbeken, D., Neirinck, N., van der Meeren, P. y Dewettinck, K. (2005). Influence of kappa-carrageenan on the thermal gelation of salt-soluble meat proteins. *Meat Science*, 70(1), 161-166.
- Visschers, R. W. y de Jongh, H. H. J. (2005). Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnology Advances*, 23(1), 75-80.
- Voldrich, M., Dobias, J., Ticha, L., Cerovsky, M. y Kratka, J. (2004). Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. *Journal of Food Engineering*, 61(4), 541-543.
- Walkenstrom, P. y Hermansson, A. M. (1997). High-pressure treated mixed gels of gelatin and whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 11(2), 195-208.

- Wang, C. H. y Damodaran, S. (1990a). Thermal gelation of globular-proteins - Weight-average molecular-weight dependence of gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1157-1164.
- Wang, C. H. y Damodaran, S. (1991b). Thermal gelation of globular-proteins: Influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 433-438.
- Wang, S. F. y Smith, D. M. (1994a). Dynamic rheological properties and secondary structure of chicken breast myosin as influenced by isothermal heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1434-1439.
- Wang, S. F. y Smith, D. M. (1994b). Poultry muscle proteins and heat-induced gelation. *Poultry Science*, 5, 145-167.
- Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Hirose, S., Matsuura, A., Takagi, H., Motoki, M. y Takeuchi, K. (1994). Molecular-cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58(1), 82-87.
- Weemaes, C., Ludikhuyze, L., van der Broeck, I. y Hendrickx, M. (1998). High pressure inactivation of polyphenoloxidases. *Journal of Food Science*, 63(5), 873-877.
- West, B. y Zhou, B. X. (1989). Did chickens go north? New evidence for domestication. *World's Poultry Science Journal*, (45), 205-218.
- Wicker, L., Lanier, T. C., Hamann, D. D. y Akahane, T. (1986). Thermal transitions in myosin-ANS fluorescence and gel rigidity. *Journal of Food Science*, 51(6), 1540.
- Wilhelm, B., Meinhardt, A. y Seitz, J. (1996). Transglutaminases: Purification and activity assays. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 684(1-2), 163-177.
- Windhorst, H. W. (2003). Patrones regionales de la producción europea y mundial de broilers y del comercio de la carne de pollo. *Selecciones Avícolas*, 45(1), 9-21.
- Wu, J. Q., Hamann, D. D. y Foegeding, E. A. (1991). Myosin gelation kinetic-study based on rheological measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(2), 229-236.

- Xiong, Y. L., Brekke, C. J. y Leung, H. K. (1987). Thermal-denaturation of muscle proteins from different species and muscle types as studied by differential scanning calorimetry. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 20(5), 357-362.
- Xiong, Y. L. y Kinsella, J. E. (1990). Mechanism of urea-induced whey-protein gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(10), 1887-1891.
- Yamamoto, K., Hayashi, S. y Yasui, T. (1993). Hydrostatic pressure-induced aggregation of myosin molecules in 0.5 M KCl at pH 6.0. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57(3), 383-389.
- Yamamoto, K., Miura, T. y Yasui, T. (1990). Gelation of myosin filament under high hydrostatic-pressure. *Food Structure*, 9(4), 269-277.
- Yamamoto, K., Yoshida, Y., Morita, J. y Yasui, T. (1994). Morphological and physicochemical changes in the myosin molecules induced by hydrostatic-pressure. *Journal of Biochemistry*, 116(1), 215-220.
- Yamauchi, K., Uenikawa, S., Enomoto, A., Tanimoto, H., Oohata, K. y Motoki, M. (1991). Transglutaminase for reducing allergenicity of food proteins and/or peptides and method of reducing their allergenicity. Japan Kokai Tokkyo Koho, asignee. Japanese Patent Application. (J P 0327253).
- Yee, V. C., Pratt, K. P., Cote, H. C. F., Letrong, I., Chung, D. W., Davie, E. W., Stenkamp, R. E. y Teller, D. C. (1997). Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the gamma chain of human fibrinogen. *Structure*, 5(1), 125-138.
- Yildirim, M. y Hettiarachchy, N. S. (1997). Biopolymers produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. *Journal of Food Science*, 62(2), 270-275.
- Yokoyama, K., Nio, N. y Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 447-454.
- Yuste, J., Raszl, S. y Mor-Mur, M. (1998). Microscopic changes in poultry breast muscle treated with high hydrostatic pressure. *Proceedings of 44th International Congress of Meat Science and Technology*, 550-551. Barcelona, Spain.
- Zamri, A. I., Ledward, D. A. y Frazier, R. A. (2006). Effect of combined heat and high-pressure treatments on the texture of chicken breast muscle (*Pectoralis fundus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2992-2996.

Zhang, H. K., Li, L. y Tatsumi, E. (2005). Influence of high pressure treatment on ovalbumin and its mixture with polysaccharide. *Journal of Food Science and Technology*, 42(1), 40-43.

Zhu, Y., Bol, J., Rinzema, A. y Tramper, J. (1995). Microbial transglutaminase. A review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(3-4), 277-282.

Ziegler, G. R. y Acton, J. C. (1984). Mechanisms of gel formation by proteins of muscle-tissue. *Food Technology*, 38(5), 77-80, 82.