



## TESIS DOCTORAL

Obtención y caracterización de fitoquímicos del salvado de arroz (*Oryza sativa* L.). Aplicación como aditivo alimentario y en envase activo

Sara Martillanes Costumero

Programa en Modelización y Experimentación  
en Ciencia y Tecnología

2020





## TESIS DOCTORAL

Obtención y caracterización de fitoquímicos del salvado de arroz (*Oryza sativa* L.). Aplicación como aditivo alimentario y en envase activo

Sara Martillanes Costumero

Programa en Modelización y Experimentación en Ciencia y Tecnología

Conformidad de los directores:

Jonathan Delgado Adámez

M<sup>a</sup> Victoria Gil Álvarez

M<sup>a</sup> Concepción Ayuso Yuste

2020



## Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todos aquellos que de algún modo han participado en este trabajo:

A mis directores, los doctores Jonathan Delgado Adámez, María Victoria Gil Álvarez y María Concepción Ayuso Yuste. A Conchi, por tu disposición para ayudarme siempre en todo lo posible y la rapidez de tus correcciones. A Victoria, por introducirme en el mundo de la investigación y acompañarme en el camino durante todos estos años. A Chapi, por ser referente, por las infinitas cosas que me has enseñado en este tiempo y la confianza en mi trabajo. Sin vuestras correcciones, experiencia y consejos no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis.

A la Fundación Fernando Valhondo Calaff, que me ha concedido el contrato predoctoral que me ha permitido dedicarme a la realización de este trabajo.

Al Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CICYTEX-INTAEX), por haber puesto a mi disposición los medios y equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

Ao Professor Luis Pinto, da Associação Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA) de Castelo Branco, por me dar a oportunidade de conhecer outras realidades e às minhas colegas de laboratório Mafalda Resende e Helena Beato pelo carinho com que me acolheram e por tudo o que aprendi com eles.

A Luis Fano, por su contribución en la elaboración de la portada.

A mis compañeros: Javi, Raquel, Jaime, Julián, Lola, Sonia, María e Irene por su ayuda en la realización de este trabajo y los buenos momentos dentro y fuera de los laboratorios. A Charo, Jesús y Olivia, por su disposición y ayuda, y su contribución en las muestras tratadas por alta presión. A Verónica y María, que fueron un apoyo fundamental en las primeras etapas de este trabajo.

A mis amigos, que en mayor o menor medida se han interesado por mi trabajo a lo largo de todos estos años, en especial a Mónica.

A mi familia, especialmente a mis padres, que siempre han creído en mí y me han dejado elegir mi propio camino. A Jaime, mi compañero de vida, por su comprensión y ayuda incondicional, esta tesis también es mérito tuyo.



Índice





## Índice

I. Antecedentes generales .....	23
1.1 Producción agronómica del arroz .....	23
1.2 Salvado de arroz. Obtención y composición .....	24
1.2.1 Compuestos fenólicos.....	25
1.2.2 Oryzanol .....	27
1.3 Definición de extracto natural. Métodos de obtención actuales.....	28
1.3.1 Definición de extracto. Oportunidades de la agroindustria en la obtención de extractos .....	28
1.3.2 Métodos actuales de obtención de extractos .....	29
1.3.3 Enzimas en la mejora del proceso de extracción .....	31
1.4 Biodisponibilidad y bioactividad .....	32
1.4.1 Definiciones. Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	32
1.4.2 Biodisponibilidad y bioactividad de compuestos fenólicos y $\gamma$ -oryzanol.....	33
1.5 Propiedades funcionales de los extractos vegetales.....	34
1.5.1 Actividad antimicrobiana .....	34
1.5.2 Actividad antioxidante .....	36
1.6 Aplicación de extractos en alimentación.....	36
1.6.1 Uso de extractos vegetales como aditivos alimentarios en la conservación de alimentos .....	38
1.6.2 Envasado activo.....	39
1.7 Tecnologías de conservación alternativas: Altas presiones hidrostáticas .....	42
1.8 Matrices alimentarias utilizadas.....	43
1.8.1 Emulsiones tipo mayonesa .....	43
1.8.2 Carne picada, hamburguesa y <i>burger meat</i> .....	45
1.8.3 Jamón ibérico loncheado .....	45
II. Justificación y Objetivos.....	49
III. Diseño experimental .....	56

3.1 Obtención de compuestos bioactivos a partir de salvado de arroz: caracterización, biofuncionalidad y biodisponibilidad de los extractos.....	56
3.1.1 Diseño de experimentos y metodología de superficie de respuesta.....	56
3.2 Mejora en la extracción con asistencia enzimática .....	57
3.2.1 Diseño experimental para la optimización de variables.....	57
3.3 Evaluación de los extractos como aditivo en diferentes matrices alimentarias ..	58
3.3.1 Aplicación en emulsiones de tipo mayonesa.....	58
3.3.2 Aplicación en una matriz cárnica.....	59
3.3.3 Aplicación en envase activo para la conservación de jamón ibérico loncheado .....	59
3.3.4 Aplicación en envases activos biodegradables basados en quitosano, en combinación con altas presiones hidrostáticas para la eliminación de <i>Listeria monocytogenes</i> en jamón ibérico loncheado .....	59
IV. Materiales y Métodos .....	63
4.1 Obtención de compuestos bioactivos a partir de salvado de arroz .....	63
4.1.1 Obtención del material vegetal.....	63
4.1.2 Extracción de compuestos bioactivos .....	63
4.1.3 Extracción con enzimas .....	63
4.2 Análisis funcionales: caracterización y biofuncionalidad de los extractos .....	63
4.2.1 Determinación de compuestos fenólicos totales.....	63
4.2.2 Determinación de compuestos bioactivos mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD).....	64
4.2.3 Actividad antioxidante. Ensayo del radical ABTS .....	64
4.2.4 Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	65
4.3 Biodisponibilidad de compuestos bioactivos de los extractos: Digestión <i>in vitro</i>	66
4.4 Elaboración y tratamiento de las matrices alimentarias .....	67
4.4.1 Elaboración de emulsión tipo mayonesas .....	67
4.4.2 Elaboración de <i>burger meat</i> .....	68
4.4.3 Jamón envasado en envase activo .....	69
4.4.4 Elaboración de envasado basado en quitosano.....	69

4.5 Métodos analíticos aplicados en matrices alimentarias .....	70
4.5.1 Análisis microbiológico.....	70
4.5.2 Color instrumental.....	71
4.5.3 Medidas de pH.....	72
4.5.4 Análisis microscópico.....	72
4.5.5 Medida del valor de peróxidos .....	72
4.5.6 Oxidación lipídica. Medida de TBA-RS .....	72
4.5.7 Medida de la oxidación proteica.....	73
4.5.8 Análisis sensorial .....	73
4.5.9 Análisis estadístico .....	74
V. Resultados .....	81
5.1 Bioavailability, composition and functional characterization of extracts from.....	81
<i>Oryza sativa</i> L. bran .....	81
5.1.1 Optimization of the extraction process .....	81
5.1.2 Digestion process of optimized extract.....	87
5.1.3 Antioxidant activity .....	88
5.1.4 Conclusions .....	90
5.2 Cellulase-Assisted Extraction of Phenolic Compounds: Process optimization and characterization.....	93
5.2.1 Enzyme selection.....	93
5.2.2 Optimization of the EAE of phenolic compounds with cellulase enzyme and antioxidant activity .....	93
5.2.3 Conclusions .....	100
5.3 Antioxidant and antimicrobial evaluation of rice bran ( <i>Oryza sativa</i> L.) extract in a mayonnaise-type emulsion.....	103
5.3.1. Characterization of rice bran extracts.....	103
5.3.3. Instrumental colour of emulsions.....	104
5.3.4. Microscopic analysis of emulsions .....	105
5.3.5. Peroxide value of emulsions .....	108
5.3.6. Microbiological counts of emulsions .....	108

5.3.7. Discussion .....	110
5.3.8. Conclusion .....	113
5.4 Effect of rice bran extract on the preservation of pork burger treated with high pressure processing .....	117
5.4.1 Characterization of RBE.....	117
5.4.2 Microbiological analysis of burgers.....	117
5.4.3 Chromatic parameters of burgers.....	120
5.4.4 Lipid and protein oxidation in burgers.....	122
5.4.5 Sensory analysis.....	124
5.4.6 Conclusion .....	125
5.5 Effect of an active packaging with rice bran extract and high-pressure processing on the preservation of sliced dry-cured ham from Iberian pigs.....	129
5.5.1 Effect on microbiological changes of sliced Iberian dry-cured ham .....	129
5.5.2 Effect of HPP and active packaging on chromatic parameters of dry-cured Iberian ham.....	131
5.5.3 Effect of HPP and active packaging on oxidative status of dry-cured Iberian ham .....	133
5.5.4 Effect of HPP and active packaging on sensory parameters of dry-cured Iberian ham.....	135
5.5.5 Conclusion .....	139
5.6 Control of <i>Listeria monocytogenes</i> in sliced dry-cured Iberian ham by high pressure processing in combination with an eco-friendly packaging based on chitosan, nisin and phytochemicals from rice bran.....	143
5.6.1 High pressure processing optimization.....	143
5.6.2 Multibarrier effect of high pressure processing and active packaging.....	144
5.6.3 Discussion .....	149
5.6.4 Conclusion .....	152
VI. Discusión general.....	155
VII. Conclusiones.....	165
Bibliografía.....	171

<b>Listado de acrónimos</b>	
<b>AAT</b>	Actividad antioxidante total
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DAD</b>	Detector diode-array
<b>EAE</b>	Extracción asistida por enzimas
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HPP</b>	Altas presiones hidrostáticas
<b>LAB</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>RSM</b>	Metodología de superficie de respuesta
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante equivalente al trolox
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible



Resumen





## Resumen

Actualmente en el mercado existe una creciente demanda de productos alimenticios seguros y de alta calidad, preferiblemente libres de conservantes y antioxidantes de origen sintético. En este contexto, algunos extractos naturales obtenidos a partir de subproductos de la industria alimentaria muestran un prometedor futuro debido en parte a su inocuidad, así como a sus procedimientos de extracción seguros y sencillos, los cuales reúnen algunos de los doce principios de la Química Verde.

En este sentido, la industria del arroz (*Oryza sativa* L.), uno de los cultivos con más auge de Extremadura tanto en extensión como en producción, genera el salvado de arroz, subproducto obtenido en la producción del arroz blanco. Este salvado contiene una gran cantidad de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados por sus propiedades, tanto de forma directa como aditivo alimentario, así como indirecta mediante su inclusión en el envasado activo.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral reside en el aislamiento y caracterización de extractos de salvado de arroz, así como la evaluación de sus propiedades para su posterior uso en la conservación de alimentos.

Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la optimización del proceso extractivo de los principales fitoquímicos evaluando, mediante superficie de respuesta, los factores que intervienen en este proceso: temperatura, tiempo y disolvente extractor. Asimismo, se optimizó el proceso de extracción asistido por enzimas.

De este estudio se obtuvieron dos fracciones; una acuosa, rica en compuestos fenólicos y otra etanólica, que principalmente presentó  $\gamma$ -oryzanol en su composición. Ambas fracciones fueron caracterizadas mediante modelos *in vitro* determinando su biodisponibilidad, su capacidad antioxidante y sus propiedades antimicrobianas.

A continuación, empleando una emulsión tipo mayonesa, se realizaron ensayos en un modelo *in vivo*, que nos permitió verificar los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* en un modelo real. A la vista de estos resultados y dadas sus mejores características de aplicabilidad al sector cárnico - objeto de estudio - se optó por el extracto etanólico.

Las aplicaciones a matrices cárnicas se realizaron empleando el extracto como aditivo alimentario en *burger meat* y, para la conservación del jamón ibérico loncheado, sobre el envase activo -tanto en plásticos como en biopolímeros-. En ambos casos se investigó el efecto de la estrategia multibarrera aplicando de forma conjunta las altas presiones hidrostáticas.

Los resultados de esta investigación mostraron que las extracciones, regidas por algunos principios de la Química Verde, son óptimas para la obtención de extractos ricos en fitoquímicos altamente bioactivos. Los dos extractos obtenidos presentaron una considerable actividad antioxidante y antimicrobiana, exhibiendo diferente biodisponibilidad; mientras que el extracto rico en compuestos fenólicos presentó biodisponibilidad y conservó parte de su actividad antioxidante, el  $\gamma$ -oryzanol del extracto liposoluble no se encontró biodisponible en ninguna etapa de la digestión. Los procesos extractivos asistidos por enzimas promovieron un mayor rendimiento, sin embargo, esta mejora careció de interés desde el punto de vista de la aplicabilidad industrial.

Ambos extractos ensayados en la emulsión de tipo mayonesa proporcionaron mejoras tanto en parámetros físico-químicos como microbiológicos, sin embargo, se observó una mejor conservación en las emulsiones enriquecidas con el extracto etanólico, por lo que se optó por la aplicación de éste como aditivo alimentario en *burger meat*. En esta matriz, el extracto aportó beneficios tanto en la conservación de la calidad como en la ampliación de su vida útil, mostrando ser un posible sustituto de los aditivos sintéticos utilizados tradicionalmente. Del mismo modo, su aplicación en envases activos, tanto impregnando un film plástico como formando parte del biopolímero, permitió mejorar la inocuidad del alimento, así como la conservación de la calidad del jamón ibérico loncheado.

Por todo ello, los extractos de salvado de arroz suponen una alternativa viable a los compuestos empleados actualmente en la industria alimentaria como conservantes, y abre la posibilidad de nuevas tecnologías de conservación en las que el aditivo no se añade al alimento, sino que va incorporado al envase activo, con las ventajas que ello supone. En ambos casos, la evaluación se llevó a cabo con la combinación de altas presiones hidrostáticas, obteniéndose buenos resultados tanto en el retraso de la oxidación de lípidos y proteínas como en la alteración por microorganismos. Se puede concluir, por tanto, que los fitoquímicos extraídos pueden utilizarse, de acuerdo a las tendencias de consumo actuales, como aditivo alimentario.

**Palabras claves:** Salvado de arroz; compuestos bioactivos; aditivo alimentario; envase activo

**Abstract**

Nowadays, there is a growing demand for safe and high-quality food products, mainly free from synthetic preservatives and antioxidants. In this context, some natural extracts obtained from by-products of the food industry have a promising future, due in part to their safety, as well as to their safe and simple extraction procedures, which bring together some of the twelve principles of Green Chemistry.

In this sense, the rice industry (*Oryza sativa* L.), one of the most important crops in Extremadura both in terms of extension and production, generates rice bran, a by-product obtained during white rice production. This bran contains a large quantity of bioactive compounds that can be used due to their properties, both directly as a food additive, and indirectly through their inclusion in active packaging.

Thus, the general objective of this PhD thesis was the isolation and characterization of rice bran extracts, as well as the evaluation of their properties for their subsequent use in food preservation.

To this purpose, firstly, the optimization of the extraction process of the main phytochemicals was carried out by evaluating, by means of response surface, the factors involved in this process: temperature, time and extraction solvent. The enzyme-assisted extraction process was also optimised.

Two fractions were obtained in this study; an aqueous one, rich in phenolic compounds and an ethanolic one, which mainly presented  $\gamma$ -oryzanol in its composition. Both fractions were characterized by *in vitro* models determining their bioavailability, antioxidant capacity and antimicrobial properties.

Then, using a mayonnaise-type emulsion, assays were made in an *in vivo* model, which allowed us to verify the results obtained from the *in vitro* studies in a real model.

The applications to meat matrices were carried out using the extract as a food additive in burger meat and, for the conservation of sliced Iberian ham, on the active packaging - in both plastics and biopolymers. In both cases the effect of the multi-barrier strategy was investigated by combining high hydrostatic pressures.

The results of this research showed that the extractions, guided by some principles of Green Chemistry, were optimal for obtaining extracts rich in highly bioactive phytochemicals. The two extracts obtained showed considerable antioxidant and antimicrobial activity, exhibiting different bioavailability; while the extract rich in phenolic compounds was bioavailable and retained some of its antioxidant activity, the  $\gamma$ -oryzanol of the fat-soluble extract was not found to be bioavailable at any stage of digestion.

Enzyme-assisted extraction processes promoted higher yields; however, this improvement was of no interest from the point of view of industrial applicability.

Both extracts tested in the mayonnaise-type emulsion provided improvements in both physical-chemical and microbiological parameters. However, better preservation was observed in the emulsions enriched with the ethanolic extract, so the latter was chosen as a food additive in burger meat. In this matrix, the extract provided benefits both in terms of preserving quality and extending shelf life, proving to be a possible substitute for the synthetic additives traditionally used. Likewise, its application in active packaging, both by impregnating a plastic film and by forming part of the biopolymer, made it possible to improve food safety and to preserve the quality of sliced Iberian ham.

For all these reasons, rice bran extracts provide a viable alternative to the compounds currently used in the food industry as preservatives, and they open up the possibility of new conservation technologies in which the additive is not added to the food, but is incorporated into the active packaging, with the advantages that this involves. In both cases, the evaluation was carried out with the combination of high hydrostatic pressure, obtaining good results both in the delay of lipid and protein oxidation and in the alteration by microorganisms. It can be concluded, therefore, that the extracted phytochemicals can be used, according to the current consumption trends, as a food additive.

**Keywords:** Rice bran; bioactive compounds; food additive; active packaging

Antecedentes generales



## I. Antecedentes generales

Esta introducción tiene como objetivo ofrecer una visión general de los conceptos relacionados con el trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral y que permitirán un mejor entendimiento del porqué de su abordaje. En ella, se describen aspectos relacionados con la composición química del salvado de arroz, la obtención de extractos y propiedades bioactivas de los mismos, así como su biodisponibilidad. Por otro lado, se exponen los posibles usos como aditivo alimentario y en envase activo, para lo cual se describen las matrices alimentarias a las que se aplican los extractos, así como las tecnologías de conservación complementarias.

### 1.1 Producción agronómica del arroz

El cultivo del arroz comenzó posiblemente en la India, hace aproximadamente 10.000 años, aunque su desarrollo tuvo lugar en China. A pesar de que se considera una única planta, existen dos especies de arroz cultivadas y ambas han seguido su propio camino de domesticación. En la variedad asiática se han seleccionado y buscado granos de mayor tamaño hasta obtener la especie *Oryza sativa* L., que ha dado lugar a tres ramas diferentes (índica, japónica y javática). La variedad africana, *Oryza glaberrima* Steud. presenta menos diversidad y se ha obtenido a partir de dos especies silvestres (Franquet Bernis & Borràs Pàmies, 2004).

El arroz (*Oryza sativa* L.) es un cereal de primordial importancia para la alimentación humana, fin al que se destina el 95% de su producción. Constituye un alimento básico en muchas partes del mundo, especialmente en los países asiáticos, donde es el cultivo más importante (Shao & Bao, 2015). En la Unión Europea se dedican, aproximadamente, 475.000 hectáreas al arroz, con una producción de unos 3.2 millones de toneladas de arroz cáscara. El arroz es el segundo cereal más producido en el mundo, siendo tan sólo superado por el maíz. Su cultivo en España se concentra en las comunidades autónomas de Andalucía, Extremadura, Cataluña, Comunidad Valenciana y Aragón, cultivándose también, de manera testimonial, en Navarra y Murcia, entre otras (Tabla 1.1).

Extremadura se ha reafirmado, en los últimos años, como la segunda región, a nivel estatal, en el cultivo de arroz, con más de 20.000 hectáreas, muy concentradas en las Vegas Altas del Guadiana. Extremeña de Arroces agrupa a la mayor parte del sector arrocero de la región, formado con el objeto de integrar y coordinar todas las actividades de almacenamiento, acondicionamiento, transformación y comercialización del arroz de sus socios. Se encuentra constituida por cinco cooperativas (Acorex y Acopaex de Mérida, Casat de Don Benito, La Encina de Palazuelo y San Juan de Puebla de

Alcollarín) con un potencial productivo cercano a las 75.000 toneladas de arroz. La superficie total que engloba es, aproximadamente, de 15.000 hectáreas.

**Tabla 1.1.** Superficies correspondientes a la ayuda asociada al cultivo del arroz para la campaña 2019. (Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020).

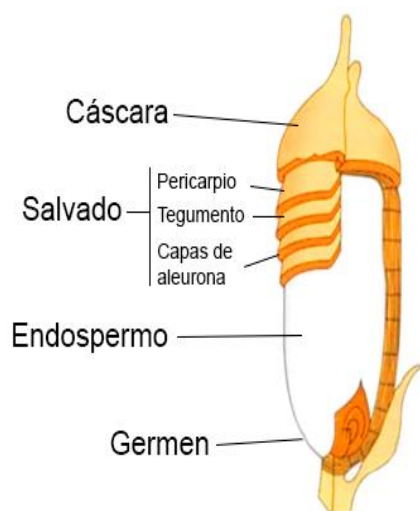
<b>Comunidad Autónoma</b>	<b>Superficie (ha)</b>	<b>Superficie (%)</b>
Andalucía	38.591	37,676
<b>Extremadura</b>	<b>21.342</b>	<b>20,836</b>
Cataluña	20.651	20,162
Comunidad Valenciana	14.550	14,205
Aragón	4.573	4,465
Navarra	2.231	2,179
Región de Murcia	296,55	0,290
Castilla y León	84,65	0,083
Castilla-La Mancha	82,68	0,081
Islas Baleares	24,99	0,024
Madrid	1,26	0,001
<b>Total España</b>	<b>102.429</b>	<b>100</b>

Los principales arroces envasados en Extremadura son el arroz blanco de grano redondo y vaporizado de grano largo, siendo los rendimientos medios de unas ocho y siete toneladas por hectárea, respectivamente.

### 1.2 Salvado de arroz. Obtención y composición

El grano de arroz posee una cubierta protectora exterior, la cáscara y el fruto de arroz (denominado arroz integral o arroz cargo). El arroz integral está conformado por las capas exteriores (pericarpio, tegumento y capas de aleurona), germen o embrión y endospermo (Figura 1.1). El pigmento del arroz se reduce al pericarpio (Juliano, 1994).





**Figura 1.1** Partes del grano de arroz

El salvado de arroz es la capa marrón más externa del grano de arroz integral y se obtiene como subproducto en el proceso de pulido del arroz blanco. Está compuesto principalmente por el pericarpio, tegumento y aleurona, así como de pequeñas cantidades de endospermo roto, comprendiendo, de forma aproximada, el 10 % del grano total de arroz (Sung-Min, Hyun-Jung, & Lim, 2014).

El salvado se considera un subproducto, por lo que suele utilizarse para alimentación animal o es descartado como material de desecho; sin embargo, contiene una importante cantidad de nutrientes como proteínas y lípidos, así como fibra dietética. Además, posee una concentración notable de minerales como potasio, hierro, calcio y magnesio (Sharif, Butt, Anjum, & Khan, 2014), si bien, sus propiedades beneficiosas están ligadas, principalmente, a dos grupos particulares de fitoquímicos, los compuestos fenólicos y el  $\gamma$ -oryzanol.

### 1.2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, denominados comúnmente polifenoles, son sustancias que poseen al menos un anillo de benceno unido a uno o más grupos hidroxilo, pudiendo contener, además, otros grupos funcionales como éster, ácido, etc. Estos compuestos están distribuidos por todo el reino vegetal, siendo la forma más frecuente de encontrarlos en la naturaleza conjugados con uno o más residuos de carbohidrato. En ocasiones, pueden encontrarse unidos a ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Del Rio et al., 2013; Mataix Verdú & Martínez de Victoria, 1988).

Se trata de productos del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos, donde desarrollan diversas funciones que abarcan desde la protección frente a influencias externas (radiación UV, lesiones por herbívoros

y plantas, y ataques fúngicos y víricos) a los mecanismos de polinización, olor, color y tolerancia al frío (Stevenson & Hurst, 2007). La composición polifenólica en las plantas es muy variada y es dependiente de la especie vegetal, variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), condiciones agroclimáticas del cultivo, así como de aspectos tecnológicos relacionados con el procesado y conservación de los productos que los contienen.

Se han llegado a identificar más de 8.000 compuestos fenólicos con estructura muy variada (Dreosti, 2000); así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples hasta polímeros complejos como los taninos condensados. Se clasifican en cuatro familias o grupos en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004): ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos, siendo las dos primeras familias las más interesantes desde el punto de vista bioactivo o funcional. En la Tabla 1.2 se recogen los grupos y subgrupos en los que se clasifican esta familia de compuestos.

**Tabla 1.2.** Principales familias de compuestos fenólicos

<b>Grupo</b>	<b>Subgrupo</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>	Ácidos hidroxibenzoicos
	Ácidos hidroxicinámicos
<b>Flavonoides</b>	Proantocianidinas
	Flavonoles
	Flavanonas
	Flavanoles
	Flavonas
	Antocianidinas
	Isoflavonas
<b>Estilbenos</b>	
<b>Lignanos</b>	

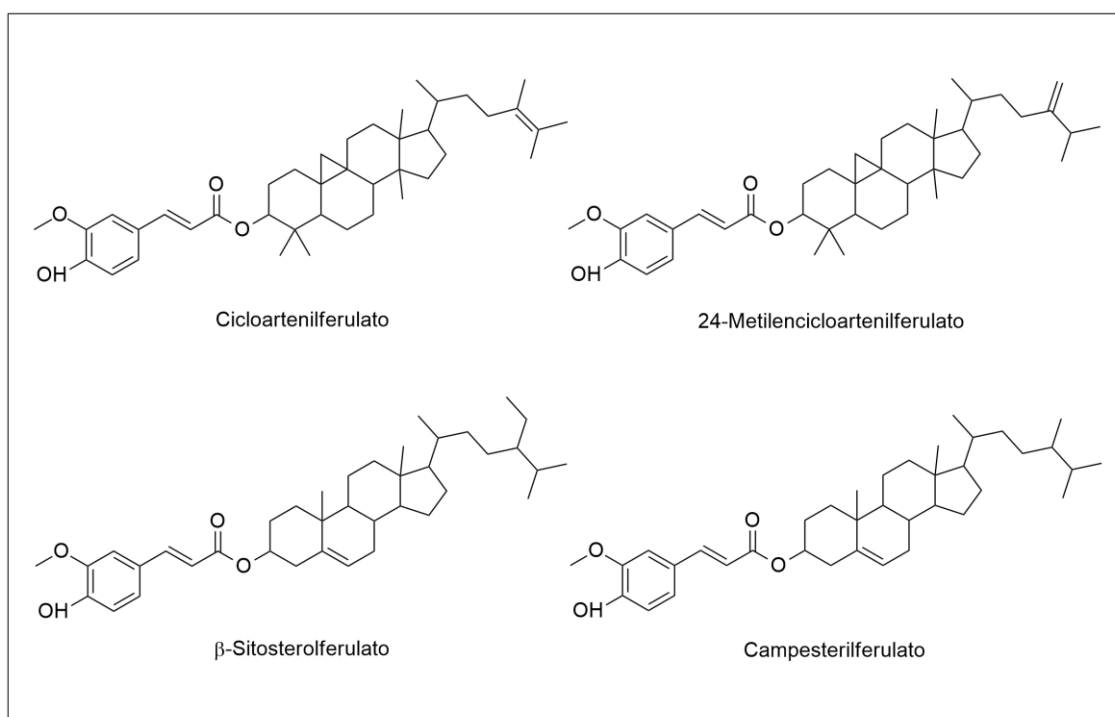
Los ácidos fenólicos se caracterizan por la presencia de un anillo aromático unido a un grupo carboxílico. Los más abundantes en la naturaleza son los derivados del ácido benzoico y cinámico. Pueden presentar actividad antioxidante en virtud, entre otros factores, de su capacidad donadora de electrones, es decir, de su carácter reductor,

debida a la presencia de grupos hidroxilo en el anillo aromático (White & Xing, 1997). El arroz, y especialmente su salvado, es una fuente importante de este tipo de compuestos, que no suelen encontrarse en cantidades significativas en otros vegetales o frutas (Adom & Liu, 2002).

Los compuestos fenólicos presentes en el salvado de arroz se encuentran de forma libre, formando conjugados solubles e insolubles; entre éstos el ácido ferúlico es el compuesto que se encuentra en una mayor concentración, seguido del ácido *p*-cumárico (Wang et al., 2015).

### 1.2.2 Oryzanol

Se conoce como  $\gamma$ -oryzanol a la mezcla compuesta principalmente por ésteres de ácido *trans*-ferúlico (ácido *trans*-hidroxicinámico) y fitoesteres (esteres y alcoholes triterpénicos). Se encuentra constituido por, al menos, veinticinco compuestos diferentes, si bien, alrededor del 95% del total está formado por los ésteres del ácido *trans*-ferúlico con cicloartenol,  $\beta$ -sitosterol, 24-metilencicloartenol y campesterol. Las estructuras químicas de los *trans*-ferulatos derivados de estos cuatro fitoesteres se muestran en la Figura 1.2 (Lerma-García, Herrero-Martínez, Simó-Alfonso, Mendonça, & Ramis-Ramos, 2009).



**Figura 1.2.** Estructura química de los principales constituyentes del  $\gamma$ -oryzanol

Al  $\gamma$ -oryzanol se le han atribuido numerosas propiedades, como su capacidad de reducir los niveles de colesterol en sangre o tratar el desequilibrio nervioso. Se ha descrito además su uso como antioxidante y conservante (Imsanguan et al., 2008), de hecho, se conoce que la actividad antioxidante de esta fracción es alrededor de diez veces mayor que la de los tocoferoles, siendo el 24-metilencicloartenilferulato el que mayor actividad antioxidante exhibe (Goufo & Trindade, 2014).

Aunque el  $\gamma$ -oryzanol reside predominantemente en el salvado de arroz, se encuentra también, aunque en menores concentraciones, en el grano completo, cáscara y endospermo. Además, pese a que se ha encontrado en trigo, maíz, centeno y cebada, el arroz es el cereal que muestra las concentraciones más altas de esta familia de compuestos (Mandak & Nyström, 2012).

### 1.3 Definición de extracto natural. Métodos de obtención actuales

#### 1.3.1 Definición de extracto. Oportunidades de la agroindustria en la obtención de extractos

Se entiende por extracto a la mezcla de compuestos obtenida, a partir de una fuente vegetal, mediante un proceso de extracción y posterior concentración de dichos compuestos. Tradicionalmente se han empleado plantas medicinales, aromáticas y condimentarias por su elevado contenido en sustancias o principios activos con propiedades químicas, bioquímicas u organolépticas, como materia vegetal o sus preparados con fines terapéuticos, aromáticos y dietético-gastronómicos. Sin embargo, en la última década, el cambio globalizado en los sistemas productivos hacia una economía circular o bioeconomía, junto al desarrollo científico-tecnológico han propiciado que muchas especies vegetales industriales, así como los subproductos o los coproductos de ellas, se destinen a la obtención de principios activos para los fines tradicionales mencionados, así como para nuevos usos como conservantes en el envasado activo, aditivos alimentarios, etc.

En este sentido, los residuos de la agroindustria suponen una fuente óptima para la obtención de estos compuestos bioactivos, dado que se trata de una materia prima de bajo coste y su reaprovechamiento permite obtener un rendimiento económico, a la vez que un beneficio ecológico.

En la actualidad, la industria de los extractos naturales de plantas mueve millones de euros a nivel mundial ya que se conocen, aproximadamente, 250.000 especies de plantas que contienen una gran diversidad de compuestos bioactivos. De hecho, en los últimos años, las investigaciones se han centrado en la extracción de antioxidantes naturales y de bajo coste a partir de las plantas, que pueden sustituir a ciertos aditivos

de origen sintético como el butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), los cuales generan rechazo entre aquellos consumidores que se han dejado influenciar por las directrices quimiofóbicas emergentes, ampliamente utilizadas por empresas del sector en sus estrategias de marketing. Así, es una tendencia creciente, como alternativa a los antimicrobianos y antioxidantes sintéticos, la utilización de extractos de plantas para combatir patógenos de origen alimentario e inhibir la oxidación lipídica, permitiendo prolongar la vida útil de los alimentos.

Puede decirse que el sector de los extractos naturales va paralelo a los intereses de las grandes agroindustrias, nacionales y regionales, por lo que el futuro se presenta muy prometedor y totalmente abierto a nuevas iniciativas de producción, diseño y aplicación, en la búsqueda de una demanda que hoy en día presenta signos más que evidentes de expansión. Tanto es así, que en los últimos años son numerosas las iniciativas que han optado por el estudio de extractos vegetales para la aplicación en alimentos (Abdel-Naeem & Mohamed, 2016; Li, Kim, Li, Lee, & Rhee, 2014; Muíño et al., 2017; Munekata, Paseto Fernandes, de Melo, Trindade, & Lorenzo, 2016) o en los envases activos (Amaro-Blanco, Delgado-Adámez, Martín, & Ramírez, 2018; Jongberg, Skov, Tørrngren, Skibsted, & Lund, 2011). Este hecho viene reforzado por la creciente demanda de los consumidores que abogan por una menor utilización de conservantes y antioxidantes sintéticos en la industria alimentaria, así pues, la tendencia actual está dirigida a la sustitución de éstos por compuestos de origen natural obtenidos a partir de plantas.

### 1.3.2 Métodos actuales de obtención de extractos

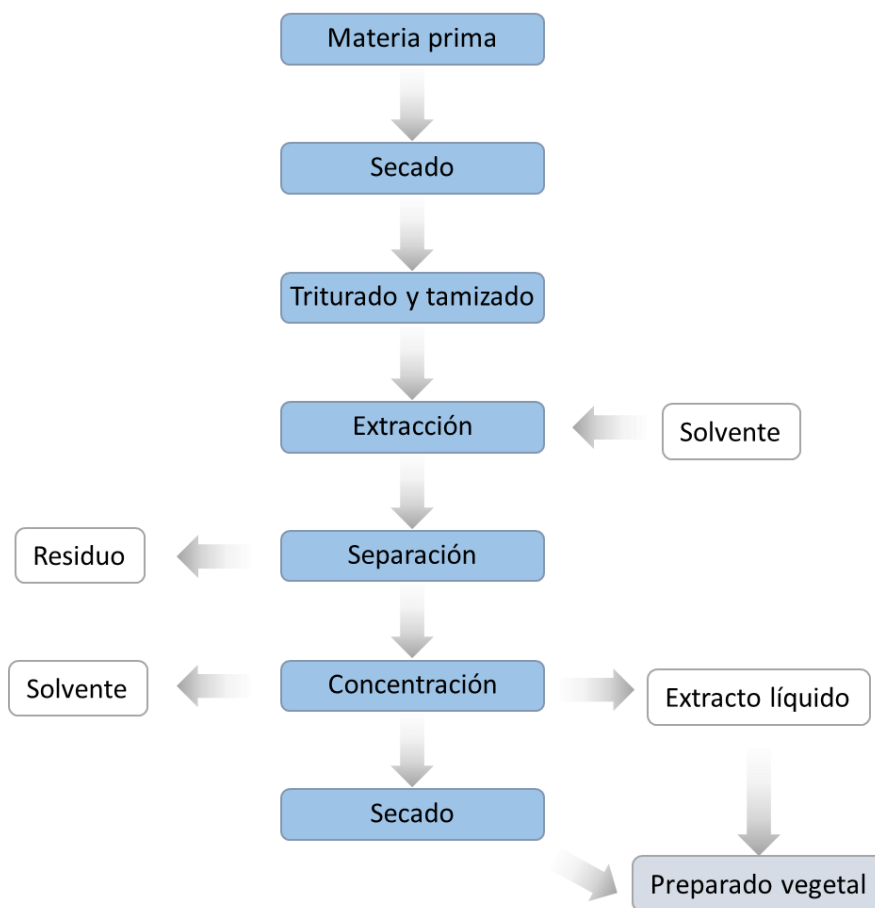
El proceso extractivo es un proceso unitario de transferencia de materia por difusión de una fase original a otra que será parte del extracto. La creación de una fase nueva a menudo se produce por el agregado de una fase inmiscible (disolvente). Las dos fases que intervienen en este proceso de extracción pueden ser sólida y líquida, en cuyo caso se trata de una extracción sólido-líquido; o bien dos fases líquidas (extracción líquido-líquido). En este proceso hay una fase que se enriquece en los compuestos de interés, denominada extracto, y otra que se empobrece, denominada marco o refinado, según corresponda a una extracción sólido-líquido o a una extracción líquido-líquido.

Para la obtención de fitoquímicos se han desarrollado numerosos métodos de extracción que dependen tanto del tipo de matriz (sólida o líquida) como del tipo de molécula extraída, así como del uso posterior al que va destinado el extracto. Los procesos de extracción más habituales son la destilación por arrastre en corriente de vapor y la extracción con disolventes.

La destilación por arrastre en corriente vapor es el método más común para la obtención de aceites esenciales. Se trata de un proceso de separación por el cual, mediante el uso de vapor de agua, se vaporizan los componentes volátiles de la materia vegetal.

El procedimiento radica en hacer pasar un flujo de vapor a través del material vegetal, de modo que arrastra consigo los aceites esenciales. Posteriormente, estos vapores se enfrían y condensan, dando lugar al destilado líquido formado por dos fases inmiscibles, la acuosa y la orgánica que contiene el aceite de interés, las cuales pueden ser posteriormente separadas por diferentes procedimientos.

Por otro lado, se han desarrollado numerosas técnicas de extracción mediante disolventes, si bien todas ellas tienen en común el diagrama de flujo mostrado en la Figura 1.3.



**Figura 1.3** Diagrama de flujo en la obtención de extractos vegetales

Las técnicas convencionales de extracción incluyen maceración, cocción y decocción, percolación o lixiviación y extracción con Soxhlet, entre otras (Carciochi et al., 2017). Sin embargo, se han desarrollado otras técnicas de extracción encaminadas a reducir

el impacto ambiental, aumentar el rendimiento de la extracción o disminuir la energía usada en el proceso (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3** Métodos de extracción actuales y principio del método

<b>Método de extracción</b>	<b>Principio del método</b>
<b>Extracción asistida con ultrasonidos (UAE)</b>	El fenómeno de cavitación crea e implosiona microburbujas de gas disueltas en el medio extractor
<b>Extracción asistida con microondas (MAE)</b>	El rápido calentamiento que ocurre dentro de los sólidos donde se lleva a cabo la extracción
<b>Extracción asistida por enzimas (EAE)</b>	La capacidad de las enzimas para degradar paredes celulares y membranas, incrementando la permeabilidad
<b>Extracción con fluidos supercríticos (SFE)</b>	Las propiedades intermedias entre gas y líquido de los fluidos supercríticos favorecen su penetración en diferentes matrices
<b>Extracción con líquidos presurizados (PLE)</b>	La solubilidad aumenta y la transferencia mejora
<b>Procesos de extracción combinados</b>	El posible efecto sinérgico de las diferentes técnicas

Junto al proceso de extracción se llevan a cabo procesos complementarios, como son la purificación, concentración y estabilización de los compuestos presentes antes de obtener el producto final.

### 1.3.3 Enzimas en la mejora del proceso de extracción

La extracción asistida por enzimas (EAE, por sus siglas en inglés) es un procedimiento ampliamente utilizado para la mejora de la eficiencia de la extracción de diversos compuestos presentes en matrices de origen vegetal (Boulila et al., 2015). Se basa en el tratamiento previo de la matriz con la enzima correspondiente, seguido de un proceso de extracción con disolventes (Özkan & Bilek, 2015). Esta tecnología es respetuosa con el medio ambiente, ya que permite mejorar el rendimiento de extracción a la vez que se disminuye la cantidad de disolvente utilizado en el proceso. Esto es posible gracias a que las enzimas hidrolíticas pueden catalizar las reacciones de degradación de paredes celulares y membranas, compuestas principalmente por grandes estructuras poliméricas altamente complejas, como celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina,

incrementando la permeabilidad de los compuestos bioactivos y permitiéndoles su liberación al medio de extracción (Boulila et al., 2015; Özkan & Bilek, 2015).

Esta técnica puede ser ensayada y optimizada a escala de laboratorio; además, el empleo de enzimas comunes con grado alimentario supone un bajo coste en la extracción. Sin embargo, algunas limitaciones técnicas en su aplicación a nivel industrial son el alto coste de la inversión y la dificultad de optimizar el proceso a escala industrial (Carciochi et al., 2017).

La extracción asistida por enzimas se ha probado en la extracción de carotenoides a partir de residuos de tomate (Prokopov, Nikolova, Dobrev, & Taneva, 2017), así como en la recuperación de polifenoles de piel de granada (Mushtaq, Sultana, Anwar, Adnan, & Rizvi, 2015), pieles de cítricos (Li, Smith, & Hossain, 2006), subproductos de la industria del vino (de Camargo, Regitano-d'Arce, Biasoto, & Shahidi, 2016), y hojas de coliflor (Huynh, Smaghe, Gonzales, Van Camp, & Raes, 2014), entre otros.

#### 1.4 Biodisponibilidad y bioactividad

##### 1.4.1 Definiciones. Modelos *in vitro* e *in vivo*

La digestión se define como “*el proceso de transformación de los nutrientes de los alimentos, previamente ingeridos, en sustancias más sencillas para ser absorbidas*” (Fernández León, 2015). El proceso de digestión en los animales y algunas plantas tiene lugar a nivel multicelular, celular y subcelular. Este proceso se lleva a cabo en el aparato digestivo, tracto gastrointestinal o canal alimentario. Cuando se consume un alimento, los nutrientes que contiene se liberan de la matriz, pasan al torrente sanguíneo y se transportan hasta las diferentes partes del organismo. Sin embargo, no todos los nutrientes se absorben del mismo modo, es decir, su biodisponibilidad varía.

La biodisponibilidad se refiere a la fracción de una sustancia que alcanza la circulación sistémica a partir del tracto gastrointestinal y que está disponible para promover su acción dentro del organismo. La bioaccesibilidad, por su parte, se puede definir como la fracción máxima que puede liberarse de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal. Ambos parámetros se ven afectados por el tipo de alimento y su composición, las condiciones del tracto gastrointestinal y las condiciones fisiológicas del consumidor. Por otro lado, la bioactividad o bioeficacia se define como la actividad biológica que poseen algunos de los componentes del alimento a su llegada al tejido o célula diana (Holst & Williamson, 2008).

Para estudiar la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos, los modelos *in vivo* son los que arrojan resultados más exactos y adecuados a la finalidad que se busca, si bien son lentos y por lo general bastante caros. Por ello, se han destinado numerosos



esfuerzos en desarrollar métodos de digestión *in vitro* que resultan más sencillos y rápidos, además de suponer un coste mucho menor. Un modelo *in vitro* ideal debe proporcionar resultados altamente precisos en un corto periodo de tiempo (Coles, Moughan, & Darragh, 2005), aunque, en la práctica, es imposible conseguir el nivel de exactitud que se alcanza con los primeros, debido a la complejidad inherente de los métodos *in vivo*, ya que dependen de muchos factores asociados al alimento, su estructura, su composición y las características enzimáticas (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011).

Durante los últimos años, se han utilizado una serie de modelos de digestión *in vitro* para poner a prueba los cambios estructurales y químicos que ocurren en diferentes alimentos, sometiendo a éstos a las mismas condiciones que se producen en el tracto gastrointestinal. Tradicionalmente, los modelos *in vitro* consisten en un sistema de digestión simulado en dos etapas en las que se establece una etapa gástrica con un pH bajo y pepsina, y una fase intestinal posterior, con un pH neutro y enzimas intestinales. Sin embargo, no se han considerado las etapas de digestión oral, intrínseca en el cuerpo humano y necesaria para los estudios *in vitro*.

La digestión oral, como primer paso de la digestión de alimentos, conlleva dos acciones simultáneas: masticar para proporcionar molienda mecánica e hidrólisis enzimática de almidón mediada por la saliva. Una vez que los alimentos se trituran en trozos pequeños y se mezclan con la saliva, la amilasa presente en ésta es capaz de actuar sobre el almidón del alimento (Tamura, Okazaki, Kumagai, & Ogawa, 2017).

Además, un modelo de digestión *in vitro* realista debe incluir la etapa de digestión en el intestino grueso, ya que los alimentos se someten a la acción de enterobacterias que pueden alterar la composición y, por tanto, la absorción de numerosos nutrientes. Diversos estudios han descrito la interacción entre la microbiota existente en el colon y diferentes compuestos como los polifenoles, por lo que esta fase debe ser incluida a posteriori de la simulación gastrointestinal (Lee, Lee, Chung, & Hur, 2016).

#### 1.4.2 Biodisponibilidad y bioactividad de compuestos fenólicos y $\gamma$ -oryzanol

Existe una gran controversia acerca de la biodisponibilidad de compuestos fenólicos en humanos, y aún se conoce poco sobre las formas bioactivas de los polifenoles *in vivo*, así como sobre los mecanismos mediante los cuales estas sustancias pueden contribuir en la prevención de enfermedades.

La mayoría de los polifenoles presentes en los alimentos se encuentran bajo su forma glicosilada, conjugados con uno o más restos de carbohidrato (Brglez Mojzer, Knez

Hrnčič, Škerget, Knez, & Bren, 2016; Manach et al., 2004). Se cree que los polifenoles no pueden ser absorbidos en su forma glicosilada tras la ingestión oral, ya que son hidrolizados por las enzimas que se encuentran en el tracto gastrointestinal para liberar sus correspondientes agliconas. Las agliconas de estos compuestos pueden ser conjugadas por UDP-glucuronosiltransferasas para formar ácidos glucurónicos y por sulfotransferasas para dar lugar a sulfatos. Estos compuestos son mucho más fácilmente transportables en sangre y excretados a través de la bilis u orina que sus correspondientes agliconas. El espectro de productos de conjugación depende de la especie e incluso del género (Tomás-Barberán, 2003).

La actividad biológica de los polifenoles también puede verse considerablemente afectada debido a diversas transformaciones llevadas a cabo por microorganismos del intestino grueso, tras un proceso de fermentación bacteriana. Estos metabolitos podrían explicar la actividad de muchos constituyentes de la dieta *in vivo*. Durante este proceso, las estructuras de los compuestos fenólicos pueden sufrir aperturas de anillos, reducciones, metilaciones, hidroxilaciones, etc. (Braune & Blaut, 2016; Selma, Espín, & Tomás-Barberán, 2009; Williamson & Clifford, 2010).

Con respecto a la bioaccesibilidad de los ésteres del ácido ferúlico del arroz y de otros cereales, se han evaluado los efectos de su digestión *in vitro* (Mandak & Nyström, 2012), concluyendo que la fracción de ferulatos de estearilo no se encuentra biodisponible en la mayoría de las partes del arroz, así como en los salvados de maíz y trigo. En el salvado de arroz se encontró únicamente un 1,5% de la cantidad inicial de estos compuestos. Con estos resultados se concluye que dicha fracción no se encuentra disponible para su absorción en el tracto intestinal; sin embargo, sí se encontraron los productos procedentes de su hidrólisis, esteroides libres y ácido ferúlico, los cuales exhiben una actividad protectora frente a la hipercolesterolemia y actividad antioxidante, respectivamente.

## 1.5 Propiedades funcionales de los extractos vegetales

### 1.5.1 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se define como la capacidad que presentan una o más sustancias para inhibir el aumento de los microorganismos o para eliminarlos.

Una de las técnicas más recurrente en la literatura científica para medir la actividad antimicrobiana es la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM), que se define como la concentración más baja de una sustancia que previene el crecimiento de microorganismos en un periodo de entre 18 y 24 horas de cultivo. Si un antimicrobiano se mantiene en concentraciones por encima de la CIM para una determinada cepa de

microorganismo, será capaz de eliminar el desarrollo de esa bacteria u hongo. Esta técnica se basa en la puesta en contacto de los microorganismos con el agente antimicrobiano en un caldo de cultivo, favoreciendo la interacción microorganismo-antimicrobiano, para posteriormente incubar en condiciones óptimas de crecimiento, periodo tras el cual se estimará la falta de éste, por un método indirecto. Así, se evalúa el crecimiento de los microorganismos como el incremento de absorbancia que se observa tras el periodo de incubación, ya que este parámetro está íntimamente relacionado con la proliferación microbiana.

La concentración mínima bactericida (CMB) se define como la concentración de extracto vegetal que elimina a más del 99,9% de las bacterias tras un tiempo de incubación de 24 horas.

La medición del crecimiento por métodos turbidimétricos resulta ser rápida y útil para obtener una estimación del número de células o biomasa. Una suspensión de microorganismos aparece turbia porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células haya, más luz se dispersa y más turbia aparece la suspensión. La turbidez puede medirse con un espectrofotómetro, equipo que hace pasar la luz a través de una suspensión celular detectando la cantidad de luz no dispersada.

Son numerosos los trabajos en los que se ha medido la actividad antimicrobiana *in vitro* de numerosos extractos vegetales; por ejemplo, el orujo de cerveza amarga se ha utilizado para la obtención de extractos con efecto antimicrobiano sobre *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria* spp. (Kołodziejczyk et al., 2013). Del mismo modo, las cáscaras de naranja (González-Gómez, Cardoso, Bohoyo, Ayuso, & Delgado-Adamez, 2014), las hojas de ciruelo (Delgado-Adamez, Fernández-León, Velardo-Micharet, & González-Gómez, 2012) o las semillas de uva (Delgado-Adamez, Gamero-Samino, Valdés-Sánchez, & González-Gómez, 2012) han sido utilizadas para obtener extractos acuosos con actividad bactericida frente a *E. coli* y *L. innocua*. Asimismo, estos extractos también han sido evaluados *in vivo* con su inclusión en diferentes matrices alimenticias.

Hasta donde sabemos, no se ha descrito la evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos del salvado de arroz ni del  $\gamma$ -oryzanol en el campo de la alimentación, aunque sí la existencia de varios compuestos con esta actividad presentes en el salvado de arroz en contextos médicos (Kondo, Teongtip, Srichana, & Itharat, 2011).

### 1.5.2 Actividad antioxidante

Se define antioxidante como cualquier sustancia que, presente en pequeñas concentraciones, comparadas con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1999). Existen diferentes tipos de antioxidantes atendiendo al tipo de especie prooxidante que eliminan, como los atrapadores de radicales libres, desactivadores del oxígeno singlete, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de otras especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RSN), agentes quelatantes de iones metálicos, neutralizadores de productos secundarios de oxidación e inhibidores de enzimas prooxidantes, entre otros (Shahidi & Zhong, 2010).

Así pues, se distinguen antioxidantes primarios o *chain-breaking*, y los denominados antioxidantes secundarios o preventivos.

- Los antioxidantes primarios actúan compitiendo en las reacciones de iniciación y propagación con los radicales libres, ROS o RNS. Al reaccionar con ellos, se produce un cambio irreversible en su estructura, que por lo general transforma al antioxidante en un radical estable, y por tanto menos reactivo que los radicales iniciales.
- Los antioxidantes secundarios retardan o previenen la oxidación al interactuar con un iniciador o acelerador; por ejemplo, sería el caso de agentes quelantes de iones metálicos.

La actividad antioxidante de los extractos vegetales ha sido ampliamente demostrada con anterioridad. Así pues, matrices como aceitunas, hortalizas, frutas, cereales, legumbres, especias o algas, así como los subproductos de sus industrias han sido estudiadas (Martillanes, Rocha-Pimienta, Cabrera-Bañegil, Martín-Vertedor, & Delgado-Adámez, 2017).

En cuanto a los compuestos presentes en el salvado de arroz, se ha descrito que los compuestos fenólicos (Arab, Alemzadeh, & Maghsoudi, 2011), así como el  $\gamma$ -oryzanol (Farhoosh, Tavassoli-Kafrani, & Sharif, 2011) poseen actividad antioxidante *in vitro*.

### 1.6 Aplicación de extractos en alimentación

Se entiende como aditivo alimentario cualquier sustancia que se agrega de forma intencionada a los alimentos con objeto de modificar sus características organolépticas y/o facilitar o mejorar su proceso de elaboración y conservación. Esta definición no incluye sustancias contaminantes ni sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales. La ingesta diaria admisible (IDA) es la cantidad de aditivo alimentario, en relación con el peso corporal, que una persona puede ingerir

diariamente durante toda su vida sin riesgo apreciable para la salud. Las normas generales para la utilización de los aditivos alimentarios se establecen en el Codex Alimentarius (Codex Stan 192-1995). Los aditivos alimentarios permitidos se clasifican mediante la letra E seguido de tres o cuatro dígitos, el primero de ellos indica la categoría a la que pertenece (Tabla 1.4).

**Tabla 1.4.** Códigos de identificación de los aditivos alimentarios

<b>Código</b>	<b>Tipo</b>
<b>E-1XX</b>	Colorantes
<b>E-2XX</b>	Conservantes
<b>E-3XX</b>	Antioxidantes
<b>E-4XX</b>	Estabilizantes, emulsionantes, espesantes / gelificantes
<b>E-5XX</b>	Acidulantes, correctores de acidez, antiaglomerantes
<b>E-6XX</b>	Potenciadores del sabor
<b>E-9XX</b>	Edulcorantes, varios

La mayoría de los aditivos añadidos a alimentos son de origen sintético, dado que presentan ciertas ventajas de utilización frente a los naturales, como pueden ser el proceso de obtención, estabilidad, pureza, etc. Sin embargo, los aditivos naturales han ido generando un interés creciente tanto para los consumidores como para la industria. Generalmente, los consumidores optan por alimentos sin aditivos, pero si esto no es posible, prefieren alimentos que contengan compuestos naturales antes que los sintéticos (Carocho, Morales & Ferreira, 2015). Los aditivos alimentarios de origen natural se pueden dividir, dependiendo de su uso en la industria agroalimentaria, en cuatro categorías: antioxidantes, antimicrobianos, colorantes y edulcorantes (Tabla 1.5).

**Tabla 1.5** Categorías de los aditivos naturales más utilizados

<b>Categoría</b>	<b>Ejemplos de sustancias</b>
<b>Antioxidantes</b>	Polifenoles, ácido ascórbico, carotenoides, tocoferoles
<b>Antimicrobianos</b>	Aceites esenciales, polifenoles, bacteriocinas, natamicina, reuterina, lisozimas
<b>Colorantes naturales</b>	$\beta$ -caroteno, luteína, antocianinas, betalaínas, ácido carmínico
<b>Endulzantes naturales</b>	Glicósidos de esteviol, eritritol, tagatosa

*Fuente:* (Soares Carocho, 2017)

Diferentes estudios han demostrado que el consumidor está realmente interesado en los aditivos alimentarios, mostrando una tendencia a escoger aquellos que provienen de fuentes naturales, así como sus análogos sintéticos (Bearth, Cousin & Siegrist, 2014; Devcich, Pedersen & Petrie, 2007).

Actualmente no existe una legislación específica para los conservantes, antioxidantes, colorantes o edulcorantes naturales, sólo los saborizantes de origen natural están legislados, tanto en la Unión Europea como en Estados Unidos. En la actualidad, en la Unión Europea, se incorporan a los alimentos clasificándolos con la misma “E” que los demás aditivos (Commission, 2011). Existe, por tanto, una necesidad de legislación sobre los aditivos naturales, ya que son de creciente interés en los países desarrollados (Baines & Seal, 2012).

#### 1.6.1 Uso de extractos vegetales como aditivos alimentarios en la conservación de alimentos

Los extractos y aceites esenciales obtenidos a partir de diferentes plantas, debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, constituyen una alternativa para la conservación de los alimentos frescos y elaborados. Éstos han sido ensayados con éxito tanto en sistemas modelo como en productos cárnicos; de hecho, el número de trabajos donde se evalúa la actividad antioxidante de los mismos es innumerable. Además de inhibir la oxidación de algunos nutrientes de los alimentos, los extractos naturales suelen mostrar actividad antimicrobiana, lo cual, mediante la inhibición del crecimiento de patógenos alimentarios, los convierte en aún más útiles en la mejora de la seguridad alimentaria de los productos. En la bibliografía se encuentran también numerosos estudios que revelan la acción combinada (antioxidante y antimicrobiana) de los mismos. Estas propiedades se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus compuestos, entre los que destacan: terpenos, cumarinas, taninos, quinonas, ácidos fenólicos y flavonoides.

Pese a los numerosos estudios, y aunque no se descarta su uso, únicamente el extracto de romero (E-392) está incluido dentro de la lista positiva de aditivos alimentarios aprobados para su uso como conservante dentro de la Unión Europea. Este extracto está compuesto principalmente de ácido carnósico, ácido rosmarínico, carnosol y rosmaridifenol y se usa en productos alimentarios de diversa índole. Al igual que el romero, otras especias han sido utilizadas con éxito en la extracción de compuestos bioactivos para su inclusión en matrices cárnicas, como el clavo (*Eugenia caryophyllate* Thunb.), que ha demostrado ser efectivo tanto en la prevención de la lipooxigenación como en el decrecimiento microbiano en carne de pollo (Zhang, Wu & Guo, 2016). Por otro lado, Andrés, Petró, Delgado-Adámez, López & Timón (2017a) evaluaron el efecto de los extractos acuosos de los subproductos de granada, uva tinta, tomate y aceitunas en la conservación de hamburguesas de cordero crudas conservadas en frío. Estos autores describieron que el extracto de uva y oliva fueron los que mayor actividad antioxidante exhibían, mayor incluso que el ascorbato sódico usado como control.

Además, la adición de todos los extractos disminuyó el recuento microbiano en las hamburguesas de cordero.

Así pues, el empleo de extractos naturales no sólo permite reducir las reacciones de oxidación en el producto, sino que también mejora su estabilidad oxidativa y prolonga su vida útil retrasando el consiguiente deterioro microbiológico.

En cuanto al salvado de arroz, sus extractos no han sido aún probados como aditivo en matrices alimentarias, aunque sí se ha ensayado su eficacia *in vitro* (Pang et al., 2018; Tabaraki & Nateghi, 2011; Zigoneanu, Williams, Xu & Sabliov, 2008). Asimismo, se ha evaluado el poder antioxidante en carne de algunos de los compuestos que forman parte de los extractos de salvado de arroz (Kim, Suh, Yang & Lee, 2003).

#### 1.6.2 Envasado activo

Una reciente tecnología de envasado es el envasado activo, que permite al alimento interactuar con su entorno para prolongar su vida útil y/o garantizar su seguridad microbiológica, manteniendo de ese modo la calidad de los productos envasados. El envase puede absorber los compuestos químicos derivados de los alimentos o del entorno dentro del envase que los rodea; o bien liberar sustancias como conservantes, antioxidantes y saborizantes sobre los propios alimentos (Fang, Zhao, Warner, & Johnson, 2017).

En los últimos años se han desarrollado nuevos envases activos para carne que incorporan ciertos aditivos, ya sea en el interior del envase, adherido a los materiales que lo conforman o formando parte de los mismos, con el objetivo de mantener o prolongar la calidad del producto y su vida útil. Actualmente hay una amplia variedad de este tipo de envases, cobrando gran importancia en el sector cárnico la utilización de envases activos con componentes procedentes de plantas con actividad antioxidante y antimicrobiana (Shah, Bosco, & Mir, 2014).

En países como Estados Unidos, Japón y Australia, los sistemas de envasado activo ya se están aplicando con éxito para prolongar la vida útil o para controlar la calidad alimentaria. Sin embargo, en Europa, el desarrollo y la aplicación de los sistemas de envasado activo son limitados con restricciones legislativas, ya que aún no existen normas específicas sobre su uso. Además, hay que tener en cuenta la falta de conocimiento sobre la eficacia y el impacto económico y medioambiental de los envases activos.

La legislación que se aplica a los envases tradicionales también es de aplicación a los envases activos, que exige que los compuestos se registren en listas positivas y se

respeten los límites de migración global y específica entre el envase y el alimento. Esto supone cierta contradicción con el concepto de algunos sistemas de envasado activo, que requieren que un determinado sensor entre en contacto directo con los productos alimenticios, permitiendo que algunas sustancias migren al interior del alimento. Estas migraciones pueden ser intencionadas o involuntarias, y es preciso determinar el tipo, la cantidad y los posibles efectos sobre la salud para regular su uso.

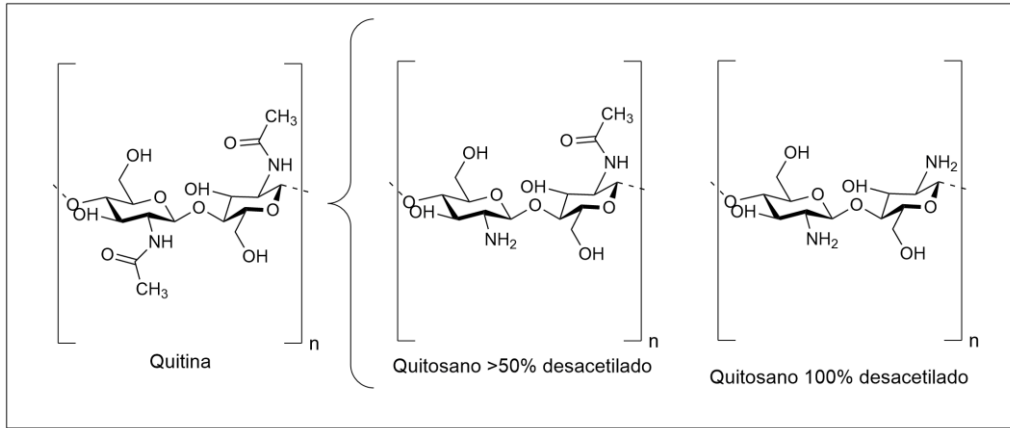
Hay que considerar que la industria alimentaria genera cada año toneladas de envases plásticos, los cuales están fabricados con polímeros no biodegradables procedentes del petróleo (Bano, Younas, Shoaib, Rashid, & Jaffri, 2020), hecho que supone un importante problema medioambiental. En los últimos años se está creando una conciencia social dirigida a minimizar el uso de este tipo de envases, principalmente aquellos de un solo uso (envoltorios de alimentos, cubiertos, botellas, etc.). Por tanto, las nuevas tendencias en el envasado activo de alimentos deben basarse en la utilización de biopolímeros o plásticos biodegradables procedentes de fuentes sostenibles que puedan ser biodegradados (Ketelsen, Janssen, & Hamm, 2020). En la Tabla 1.6 se pueden encontrar diferentes ejemplos de materiales poliméricos de origen natural en investigación, junto con diversos fitoquímicos, para el envasado activo de alimentos.



**Tabla 1.6.** Ejemplos de biopolímeros de origen natural usados en la conservación de alimentos

<b>Material polimérico</b>	<b>Fitoquímicos añadidos por su actividad</b>	<b>Otros materiales en su composición</b>	<b>Matriz de aplicación y funcionalidad</b>
<b>Quitosano</b>	Aceites esenciales del tomillo	Ácido láctico, Glicerol y Tween	Los envases en carne cocinada lista para el consumo disminuyen la concentración de microorganismos, conserva el color y disminuye las pérdidas de agua.
<b>Proteínas de suero</b>	Orégano	Glicerol	Embutidos portugueses. Aumenta la vida útil
<b>Carboximetilcelulosa</b>	Aceite esencial de clavo	Polivinilalcohol	Actividad antimicrobiana en carne de pollo
<b>Pectina, quitosano</b>	Polifenoles del té	CaCl <sub>2</sub>	Carne fresca. Reduce la decoloración y la carga microbiana
<b>Almidón de yuca</b>	Aceite esencial de orégano	Glicerol	Protección contra la oxidación lipídica en carne picada de ternera

Entre todos los posibles biopolímeros que podemos encontrar, el quitosano o chitosán es un buen candidato que resalta por sus excelentes propiedades como antimicrobiano, no presenta toxicidad, es biocompatible, biodegradable, y muestra capacidad de quelación, etc., además de su facilidad para formar películas o films. El quitosano procede de la desacetilación de la quitina (Figura 1.4), uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, junto con la celulosa. En el campo de la alimentación, se ha investigado el uso del quitosano junto a otras sustancias tales como otros polisacáridos, proteínas, compuestos inorgánicos o extractos de plantas (Wang, Qian, & Ding, 2018).

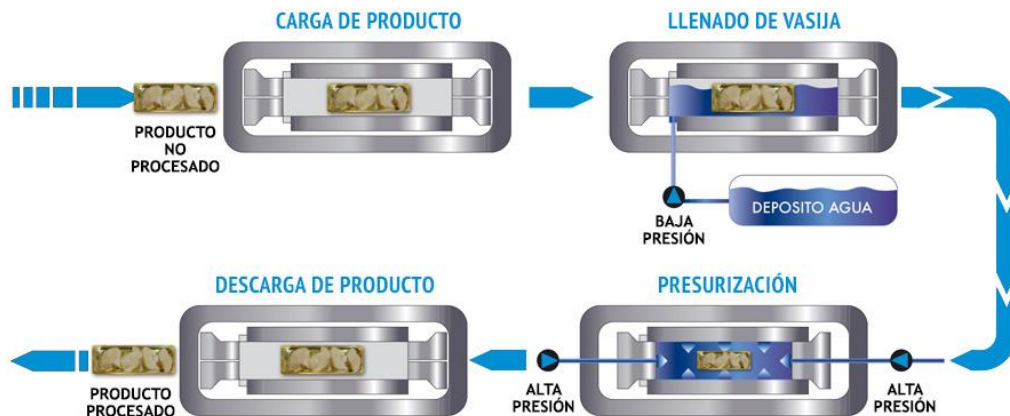


**Figura 1.4** Estructuras de quitina y quitosano

### 1.7 Tecnologías de conservación alternativas: Altas presiones hidrostáticas

La investigación en la industria alimentaria se dirige a reemplazar las tecnologías tradicionales de conservación por nuevas tecnologías que se adapten mejor a las demandas actuales de los consumidores. En este sentido, la tecnología de altas presiones hidrostáticas (HPP) ha adquirido relevancia en los últimos años como alternativa al tratamiento térmico en la conservación de vegetales envasados, frutas, carnes, mariscos y lácteos (Huang, Wu, Lu, Shyu, & Wang, 2017).

El procesamiento de alimentos por altas presiones consiste en la aplicación de presión al alimento envasado en plástico con una intensidad entre 100 y 1.000 MPa. Para ello, se introducen los envases en un recipiente lleno de líquido resistente a dichas presiones, generalmente agua, y se aumenta la presión mediante la introducción de más líquido en el recipiente, elevando la presión interior en el mismo. De este modo, la presión es uniforme en todos los puntos del tanque, incluido el alimento. Al contrario que los tratamientos térmicos, los tratamientos con presión son instantáneos por lo que se disminuye considerablemente el tiempo de procesado.



**Figura 1.5** Esquema de funcionamiento de un tratamiento de altas presiones hidrostáticas en producto envasado. (Fuente [www.hiperbaric.com](http://www.hiperbaric.com))

La aplicación de altas presiones sobre un alimento influye en sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, observándose principalmente una modificación del volumen del sistema y de la estructura de las proteínas, además de cambios en la actividad enzimática y la inactivación de microorganismos.

El procesado con altas presiones se aplica en un amplio abanico de productos cárnicos: jamón, pollo o pavo cocido loncheado, piezas de pollo o pavo, platos preparados, centros de jamón curados, carnes marinadas, etc. (Campus, 2010). Este tratamiento prolonga la vida útil manteniendo la frescura original puesto que tiene lugar a temperatura ambiente o incluso bajo refrigeración.

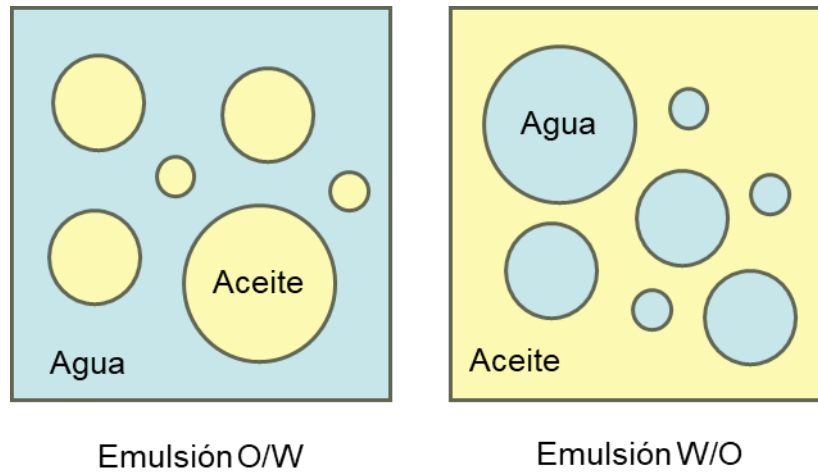
### 1.8 Matrices alimentarias utilizadas

Los estudios *in vitro* de los extractos de plantas y residuos alimentarios son muy prometedores en cuanto a sus actividades antioxidantes y antimicrobianas. Sin embargo, la actividad de muchos de ellos disminuye o se pierde al utilizarlos cuando se añaden como ingrediente o formando parte de envases activos (Amaro-Blanco, Delgado-Adámez, Martín, & Ramírez, 2018). Por ello, con objeto de validarlos como aditivos alimentarios, es necesario comprobar la efectividad de estos extractos en matrices alimentarias reales. A continuación, se exponen las diferentes matrices en las que se ha estudiado la capacidad de los extractos.

#### 1.8.1 Emulsiones tipo mayonesa

Una emulsión puede definirse como un sistema opaco y heterogéneo de dos fases inmiscibles (aceite y agua), en la cual uno de los constituyentes se encuentra de forma mayoritaria, formando la fase continua o dispersante, dentro de la que se encontrará la fase dispersa, también conocida como discontinua. Las emulsiones pueden jugar un papel fundamental en los alimentos que consumimos diariamente. La industria alimenticia también incluye en este concepto productos como panes, emulsiones cárnicas y helados.

Las emulsiones pueden clasificarse en dos tipos, aquellas en las que la fase dispersa es una sustancia lipídica (grasa o aceite) y la fase continua es hidrófila (normalmente agua), denominadas *oil-in-water* (O/W); y un segundo tipo en el que la fase dispersa es hidrófila y la fase dispersante lipídica, llamadas *water-in-oil* (W/O) (McClements, 2015).



**Figura 1.6** Representación de la estructura microscópica de emulsiones O/W y W/O

Con el paso del tiempo, las barreras electrostáticas y físicas aplicadas en la formación de la emulsión son superadas provocando una desestabilización bajo una de las siguientes formas: agregación de partículas, absorción de partículas dentro de ellas mismas o separación de fases. La separación puede producirse mediante la acción de la gravedad, durante el proceso de cremosidad o debido a la tendencia del aceite a ubicarse en la superficie. Por ello, la estabilización de una emulsión es realmente un acto de equilibrio ya que se crea suficiente tensión interna entre las fases como para provocar la separación de partículas, a la vez que limita esta tensión para inhibir el desarrollo de la coalescencia. Una forma de evitar la desestabilización es mediante la incorporación de emulsionantes que actúan como surfactantes, es decir, se concentran en la interfase disminuyendo la tensión de la superficie de control. Éstas son moléculas anfipáticas con propiedades lipofílicas e hidrofílicas. Los emulsionantes facilitan la formación de una nueva interfase al reducir la energía interfacial y proporcionar una estabilidad a largo plazo.

La mayonesa es una emulsión del tipo aceite en agua (O/W) con bajo pH, cuyos ingredientes principales son huevos y aceite vegetal. Además, puede contener vinagre o zumo de limón entre otros ingredientes. Por otro lado, el huevo utilizado como emulsionante se puede sustituir por leche, conduciendo a una mayonesa sin huevo conocida coloquialmente como *lactonesa*. Las mayonesas y otros tipos de emulsiones alimentarias se utilizan comúnmente como modelos para el estudio de la actividad antioxidante en las grasas que la forman (de Sousa Guerra, Aguiar, Duncan, Kluckzosvki, & do Amaral Souza, 2017; Elder, Coupland, & Elias, 2019; Hermund et al., 2015).

### 1.8.2 Carne picada, hamburguesa y *burger meat*

Se denomina carne picada a la carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos del 1% de sal (Reglamento (CE) N° 853/2003). Por otro lado, en el Real Decreto 474/2014, se denomina hamburguesa al producto elaborado con carne picada con adición de sal, especias, condimentos u otros productos alimenticios. Asimismo, se define como *burger meat* (o *burguer meat*) al producto fresco, elaborado a partir de carne picada y otros ingredientes, incluidos los aditivos, con un contenido mínimo de cereal, de hortalizas, o de ambos del 4%. Este último es el producto cárnico empleado en la presente Tesis Doctoral.

Una de las principales diferencias entre una hamburguesa y *burger meat* es, precisamente, que la agregación de aditivos puede llevarse a cabo únicamente en este último. El Reglamento (CE) N° 1333/2008 establece los aditivos que pueden utilizarse en este tipo de productos, como son el E-120, E-129, E220-228, etc. Éstos se utilizan para la prevención de la proliferación de un amplio número de microorganismos que pueden alterar no sólo la calidad, sino también la seguridad de los productos. Además, los aditivos se añaden también para evitar la oxidación lipídica y proteica de la carne, que degenera en pérdida de textura y nutrientes, olores desagradables, pérdida de la capacidad de retención de agua y/o decoloraciones, entre otros.

### 1.8.3 Jamón ibérico loncheado

El cerdo ibérico es una especie única en Europa, ya que su alimentación está totalmente adaptada al medio de la Península Ibérica, concretamente al ecosistema denominado dehesa, compuesto principalmente por encinas y alcornoques. Los cerdos ibéricos se crían en un sistema de producción tradicional, el cual ha sobrevivido debido a los altos precios del mercado y a su elevada calidad. Los cerdos son alimentados durante un largo tiempo para alcanzar un peso lo suficientemente elevado, necesario para la fabricación de los productos curados derivados (Lopez-Bote, 1998). Los jamones y paletas curadas son los productos más apreciados del cerdo ibérico. El jamón ibérico es un producto muy delicado que requiere un proceso de maduración muy largo. El proceso de curado es similar para ambos productos, sin embargo, las paletas tienen un tamaño más pequeño y, por lo tanto, su proceso de maduración es más corto.

La calidad de los productos curados se relaciona con la pureza de la raza, la alimentación del animal y el proceso de maduración, ya que estos factores afectan a la textura, el color y el flavor (Cava, Ventanas, Ruiz, Andrés, & Antequera, 2000; Ruiz, Garcia, Muriel, Andrés, & Ventanas, 2002). Las reacciones de oxidación lipídica son esenciales para el desarrollo del aroma característico del jamón ibérico. Este factor está directamente relacionado con la calidad sensorial; sin embargo, en exceso, estas

reacciones incrementan cambios indeseables en flavor, color y textura limitando la aceptación de estos productos por los consumidores. De hecho, el crecimiento microbiano, cambios en color y flavor, así como las reacciones de oxidación de lípidos y proteínas son los principales parámetros que determinan la calidad del jamón ibérico curado.

En los últimos años, la demanda de jamón ibérico loncheado ha aumentado debido a los cambios en el estilo de vida de los consumidores. Además, el 80% de las exportaciones a nivel mundial se producen bajo el formato de jamón deshuesado en sus diferentes variantes, entre las que se encuentran los sobres y barquetas de jamón loncheado (Rodríguez Marín, 2018). Durante el loncheado y envasado del jamón, la vida útil y la seguridad del producto pueden verse reducidas ya que implican una mayor manipulación y se incrementa la posibilidad de contaminación. Además, las reacciones de oxidación aumentan cuando el jamón se presenta loncheado, ya que la superficie expuesta a estos procesos es mayor. De hecho, las lonchas de jamón, si se comparan con las lonchas recién cortadas de la pieza entera, no cumplen las expectativas de los consumidores en términos de atractivo, color, textura y flavor. Esta presentación favorece el desarrollo de aromas indeseables, rancidez e incluso problemas en el color y la textura durante su vida comercial.

Normalmente, las lonchas de jamón ibérico se presentan envasadas al vacío, lo que impide la presencia de oxígeno a la par que previene la contaminación y prolonga su vida útil. También es habitual el uso de atmósferas modificadas con el mismo fin. Sin embargo, estos métodos de conservación no son suficientes para garantizar el mantenimiento de la calidad, por lo que se están estudiando nuevas alternativas.

## Justificación y Objetivos





## II. Justificación y Objetivos

Europa, y por consiguiente España, utiliza los recursos agroindustriales de forma poco sostenible y por ello, se han puesto en marcha políticas basadas en economía circular y bioeconomía como respuesta. En este sentido, desde las distintas administraciones se han promovido planes de acción para la transición hacia un nuevo modelo económico de forma que se asegure el abastecimiento de materias primas para la industria, se impulse el uso eficiente de los recursos y la protección del medio ambiente, se aseguren oportunidades de negocio y se creen puestos de trabajo. Asimismo, el plan otorga un papel clave a la innovación y a la investigación para afrontar la transición de una economía lineal a una economía circular. Además, para la industria alimentaria existen otros retos como son la prolongación de la vida útil de los alimentos y la búsqueda de conservantes naturales, que son, de forma general, más aceptados por los consumidores. Por otro lado, existe la necesidad apremiante de reducir el plástico de un solo uso que se utiliza en la industria alimentaria para transportar y conservar los productos.

Bajo este marco, se desarrolla la presente Tesis Doctoral como una iniciativa de revalorización de subproductos del arroz bajo un modelo de economía circular, reemplazando el plástico convencional empleado en el envasado de alimentos por biopolímeros naturales, como estrategia para la bioeconomía.

Por otro lado, los fenómenos oxidativos y los cambios asociados a ellos, así como la proliferación de microorganismos constituyen una de las principales causas de deterioro y pérdida de la calidad de los alimentos. Como consecuencia se generan compuestos que pueden afectar a diferentes parámetros de los productos alimentarios, con la consiguiente disminución de la aceptabilidad por parte del consumidor y de su valor nutritivo, comprometiendo asimismo su seguridad. Debido a los nuevos canales de distribución y al cambio en los hábitos de consumo, la industria agroalimentaria está incorporando diferentes tecnologías de conservación que tienen como objeto prolongar la vida útil de sus diferentes productos.

Además, en los últimos años existe una creciente demanda de productos alimentarios de alta calidad organoléptica, saludables, seguros, que presenten facilidad de consumo y sin conservantes ni antioxidantes sintéticos añadidos. Este hecho, sumado a la demanda de las empresas que buscan alternativas para la conservación de sus productos durante periodos muy prolongados, hace necesaria la búsqueda de conservantes naturales que aumenten la vida útil del alimento. Así, por sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas, los extractos vegetales pueden constituir

la base de muchas aplicaciones, incluyendo la conservación de alimentos frescos y elaborados. En este sentido, los extractos ricos en compuestos polifenólicos parecen ser los mejores candidatos para ser utilizados como antioxidantes primarios en productos cárnicos, ya que se obtienen a partir de fuentes naturales y retardan la aparición de procesos oxidativos. Si bien estas sustancias están presentes de forma natural en alimentos de diversa índole, su uso como aditivos alimentarios aún no está regulado por las correspondientes autoridades sanitarias y de seguridad alimentaria.

El salvado de arroz, principal subproducto en el proceso de obtención del arroz blanco, constituye una fuente importante de compuestos bioactivos, tales como  $\gamma$ -oryzanol, tocoferoles, tocotrienoles, escualeno, ácidos grasos insaturados, fitoesteroles y compuestos fenólicos.

Dada la importancia de este cereal en Extremadura y la cantidad de compuestos interesantes por sus propiedades que contiene, la presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general la revalorización del salvado de arroz, principal subproducto obtenido de este sector, para la elaboración de aditivos alimentarios que permitan la conservación y ampliación de la vida útil de diversos alimentos. Para la consecución de este objetivo general, se han marcado los siguientes objetivos específicos:

**Objetivo 1:** Optimizar el proceso de obtención de extractos hidro- y liposolubles a partir de salvado de arroz (*Oryza sativa* L.) mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta para maximizar el contenido en compuestos fenólicos,  $\gamma$ -oryzanol y la actividad antioxidante; así como evaluar la biodisponibilidad de los extractos obtenidos mediante un proceso de digestión físico-química y microbiológica *in vitro*.

**Objetivo 2:** Mejorar la extracción mediante un proceso asistido por enzimas, evaluando la eficacia de diversas enzimas, rangos de temperatura, tiempo, pH y concentración de enzima, para ello se analizará la bioactividad de los extractos considerada como actividad antioxidante total.

**Objetivo 3:** Validar la bioactividad de los extractos exhibida *in vitro* (actividad antioxidante y propiedades antimicrobianas) en un modelo real, como es la emulsión tipo mayonesa, estudiando la calidad y la seguridad microbiológica e inocuidad durante su vida útil bajo dos tipos de almacenamiento, refrigeración y temperatura ambiente.

**Objetivo 4:** Evaluar el efecto de la adición del extracto rico en  $\gamma$ -oryzanol sobre la calidad fisicoquímica y microbiológica de *burger meat* tanto fresca como durante un período de almacenamiento, así como prolongar la vida útil de este producto cárnico mediante la aplicación de altas presiones hidrostáticas como estrategia multibarrera.

**Objetivo 5:** Obtener un envase activo mediante la impregnación de un film plástico con el extracto liposoluble con objeto de mejorar la conservación y comercialización de jamón ibérico loncheado empleando o no temperaturas de refrigeración durante su vida útil, evaluando, además, la combinación con un tratamiento de altas presiones hidrostáticas.

**Objetivo 6:** Aplicar el extracto liposoluble en el desarrollo de un envasado en biopolímero activo para jamón ibérico loncheado y comprobar su eficacia frente a *L. monocytogenes*, esta tecnología se combinará con el tratamiento de altas presiones hidrostáticas



# Diseño Experimental





Figura 3.1: Diseño experimental

### III. Diseño experimental

Para alcanzar los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral se diseñaron una serie de experimentos que se describen en la Figura 3.1.

#### 3.1 Obtención de compuestos bioactivos a partir de salvado de arroz: caracterización, biofuncionalidad y biodisponibilidad de los extractos

##### 3.1.1 Diseño de experimentos y metodología de superficie de respuesta

Para el diseño y optimización de las diferentes variables independientes que afectan al proceso de aislamiento de extractos de salvado de arroz, se propuso un diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta (RSM), esto es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas para la obtención del mejor valor de una variable de respuesta y los valores de los factores que producen dicho valor óptimo (Myers & Montgomery, 1995). En este método, el sistema se representa por una ecuación empírica, basada en ecuaciones preseleccionadas, usando los datos experimentales obtenidos del sistema para el ajuste de los correspondientes coeficientes. Normalmente se usan modelos polinómicos de segundo orden con términos cruzados que permiten describir concavidades o convexidades de la superficie. La superficie representada por dicho modelo polinómico se llama superficie de respuesta.

El software usado para la generación del diseño y el análisis estadístico fue Design Expert v.10 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Los factores analizados incluyeron: porcentaje de etanol y agua (A y B respectivamente) en la mezcla extractora, tiempo de extracción (C) entre 20 y 180 minutos, y temperatura del proceso (D) entre 25 y 60°C.

Las variables usadas como respuesta fueron los contenidos en compuestos fenólicos: ácido *p*-cumárico (Y1), ácido *trans*-ferúlico (Y2) y  $\gamma$ -oryzanol (Y3).

El diseño utilizado fue del tipo D-óptimo combinado. Se utilizó un modelo de regresión combinado (cúbico para A y B y cuadrático para C y D) para el ajuste de datos, que posteriormente se analizaron con un test ANOVA. La verificación de la validación y la adecuación de la predicción se realizó comparando los valores predichos por los observados usando un test *t*.

La evaluación de la calidad del modelo elegido se llevó a cabo usando las herramientas estadísticas de la regresión lineal y regresión ajustada.



### 3.2 Mejora en la extracción con asistencia enzimática

#### 3.2.1 Diseño experimental para la optimización de variables

Con objeto de optimizar el rendimiento de extracción de compuestos bioactivos se propuso el tratamiento con enzimas hidrolíticas. Las enzimas empleadas para el estudio fueron celulasa, xilanasas y  $\beta$ -galactosidasa; sin embargo, los estudios demostraron que sólo la celulasa fue eficaz, por lo que la optimización se llevó a cabo únicamente para esa enzima.

Para poder establecer los factores que influyen de forma directa en el proceso se consideró el estudio realizado por Mushtaq, Sultana, Anwar, Adnan, & Rizvi, (2015) y en base a él se eligieron las siguientes variables: temperatura de extracción, pH de la disolución extractora, tiempo de extracción y concentración de enzima empleada.

Una vez seleccionadas las variables que afectan al proceso se procedió a la optimización del mismo, evaluando las variables de manera secuencial. En primer lugar, se optimizó la temperatura del proceso de extracción de los compuestos bioactivos, seguido de la determinación del pH de la disolución más adecuado. Tras fijar estos parámetros a sus valores óptimos, se procedió a la optimización del tiempo de extracción, finalizando con la selección de la concentración de enzima empleada.

##### a) *Influencia de la temperatura*

En primer lugar, para la extracción de compuestos fenólicos, se prepararon una serie de disoluciones conteniendo 5 g de salvado en 50 mL de disolución tampón de acetato a pH 3,0. Para cada temperatura elegida se prepararon cuatro disoluciones (dos controles y dos disoluciones con 0,050 g de enzima celulasa).

A continuación, se introdujeron las disoluciones en un equipo Orbital Shaker Incubator (OPTIC ivymon SYSTEM) manteniendo las disoluciones durante cuatro horas a 150 rpm y a la temperatura establecida. Este paso se realizó a las diferentes temperaturas elegidas: 20, 25, 30, 35 y 40 °C.

Seguidamente, se filtraron las disoluciones para eliminar los restos sólidos empleando dos tamices de 45 y 65  $\mu$ m y se centrifugaron las disoluciones empleando un equipo Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3R Refrigerated Centrifuge, 120 VAC. Las condiciones establecidas fueron 10 minutos, 10000 rpm y 4 °C.

Finalmente, se realizaron diluciones 1:5 a cada una de las disoluciones empleando agua MilliQ, y se realizaron las correspondientes medidas de los compuestos bioactivos extraídos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

b) *Influencia del pH*

El procedimiento llevado a cabo para optimizar este parámetro fue semejante al descrito para la temperatura, con la excepción de que en el paso del calentamiento se fijó la temperatura para todas las disoluciones a 35 °C. Se varió el pH de la disolución tampón para cada cuatro disoluciones (dos controles y dos muestras con enzima). El rango de pH elegido fue entre 3,0 y 9,0 con muestras a los siguientes valores: 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 y 9,0.

c) *Influencia del tiempo*

Este procedimiento siguió los mismos pasos que los descritos para la optimización de la temperatura y pH, pero fijando las condiciones a 35 °C y pH 3,0 para todas las disoluciones. En este caso, lo que varió fue el tiempo de calentamiento para cada cuatro disoluciones (dos controles y dos muestras con enzima), evaluando los periodos de 1, 2, 3 y 4 horas.

d) *Influencia de la concentración de enzima*

La optimización de la concentración de enzima empleada se llevó a cabo de la misma forma que los procedimientos anteriores, fijando en este caso la temperatura (35 °C), el valor de pH (3,0) y el tiempo de calentamiento (4 horas). Se prepararon dos controles sin enzima y dos disoluciones para cada concentración de enzima fijada, 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 %.

La elección del valor óptimo para cada uno de los parámetros se basó en la concentración en compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del extracto obtenido.

### 3.3 Evaluación de los extractos como aditivo en diferentes matrices alimentarias

#### 3.3.1 Aplicación en emulsiones de tipo mayonesa

Para la evaluación de la actividad *in vivo* de los extractos, éstos se incorporaron como ingrediente en emulsiones de tipo mayonesa, las cuales se formularon añadiendo un 0,5 y un 2 % (p/p) de los dos extractos obtenidos por optimización mediante diseño de experimentos y RSM. Se incorporó al ensayo además un control negativo (sin ningún conservante) y un control positivo (BHT, un antioxidante sintético ampliamente utilizado en la industria). Una vez envasadas, las mayonesas fueron analizadas a tiempo 0 (T0) y a la semana de almacenamiento (T1), durante la cual las muestras se mantuvieron a 4 y a 20 °C.

Para analizar el efecto de los extractos ricos en fitoquímicos procedentes del salvado de arroz en las emulsiones de tipo mayonesa, se llevaron a cabo análisis de color, pH, estructura microscópica, recuento microbiano y oxidación. Se llevaron a cabo tres réplicas por ensayo.

### 3.3.2 Aplicación en una matriz cárnica

El extracto etanólico de salvado de arroz, cuya obtención y optimización se describió en el apartado 3.1, se aplicó en diferentes concentraciones (0,5, 1 y 2 % en peso) en *burger meat* de cerdo, las cuales fueron envasadas y tratadas de forma complementaria con alta presión hidrostática (600 MPa, durante 5 min).

Se llevaron a cabo los análisis al principio del ensayo tanto en *burger meat* sin tratar con alta presión como en aquellas tratadas con esta metodología, para evaluar los cambios inducidos durante el proceso y el posible papel protector del extracto. Después del proceso, las *burger meat* se almacenaron a  $4 \pm 1$  °C durante 21 días y se analizaron periódicamente. Los análisis se realizaron en el día 1 (T0), el día 14 (T1) y el día 21 (T2) de almacenamiento.

Asimismo, se abordó el análisis de recuento de microorganismos, color instrumental, oxidación lipídica y proteica y análisis sensorial (n=4).

### 3.3.3 Aplicación en envase activo para la conservación de jamón ibérico loncheado

Se llevaron a cabo cuatro tratamientos: Control (lonchas envasadas al vacío), HPP (lonchas envasadas al vacío sometidas a un tratamiento de alta presión), RBE (lonchas envasadas al vacío con un envase activo a base del extracto lipófilo de salvado de arroz), y RBE + HPP (lonchas envasadas al vacío con el envase activo RBE sometido a HPP). Los paquetes se almacenaron a dos temperaturas, 4 y 20 °C, y se analizaron al comienzo del experimento (día 1) y a los 90 y 180 días (solo las muestras almacenadas a 4 °C se analizaron a los 180 días). Se utilizaron 80 paquetes para los análisis microbiológicos y físico-químicos, mientras que otros 80 paquetes se utilizaron para los análisis sensoriales. Se realizaron análisis microbiológicos, color instrumental, oxidación lipídica y proteica y análisis sensorial (n=5).

### 3.3.4 Aplicación en envases activos biodegradables basados en quitosano, en combinación con altas presiones hidrostáticas para la eliminación de *Listeria monocytogenes* en jamón ibérico loncheado

Se empleó una prueba de desafío o *challenge test* consistente en un estudio de laboratorio en el que se inocula artificialmente *L. monocytogenes* en el alimento y se mide su prevalencia tras el tratamiento aplicado. La Unión Europea ha establecido protocolos para la realización de pruebas de desafío (EURL-Lm, 2014) que consisten esencialmente en inocular el alimento con una concentración definida de una mezcla de cepas de *L. monocytogenes* y en medir los cambios en las tasas de población del microorganismo. En el caso del jamón ibérico curado en seco loncheado, se han encontrado cantidades de hasta 5 log UFC g<sup>-1</sup> (Hereu, Bover-Cid, Garriga y Aymerich,

2012). Para ello, hemos establecido  $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$  como límite para considerar exitosa prueba de desafío.

Para lograr la reducción de *L. monocytogenes*, en primer lugar, se llevó a cabo la optimización del proceso de alta presión hidrostática en lonchas de jamón ibérico curado, utilizando el método de superficie de respuesta (RSM). Se construyó un diseño I-óptimo utilizando como factores: el tiempo (entre 2 y 8 minutos) y la intensidad de la presión (entre 200 y 600 MPa). Una vez establecidos los parámetros que maximizan la inactivación de *L. monocytogenes* por HPP, se prepararon envases a base de quitosano con nisina añadida (NCP), con extracto de salvado de arroz (RBECP) o con una mezcla de ambos (N+RBECP). Estos envases se probaron con y sin la combinación de HPP previamente optimizada. Los resultados se incluyeron en un diseño factorial de dos niveles, para el cual se codifica la aplicación del tratamiento correspondiente (HPP, NCP y/o RBECP) como +1 y la ausencia como -1. El control realizado consistió en muestras no inoculadas y muestras inoculadas sin tratar. Se realizaron cinco réplicas para cada experimento (n=5).

## Materiales y Métodos



## IV. Materiales y Métodos

### 4.1 Obtención de compuestos bioactivos a partir de salvado de arroz

#### 4.1.1 Obtención del material vegetal

El material de partida para la realización de la presente Tesis Doctoral fue salvado de arroz (*Oryza sativa* L.) de cultivo ecológico adquirido en un comercio local. El material, apto para el consumo humano, no ha sido desengrasado previamente ni ha sufrido ningún otro procesado previo para evitar su enranciamiento.

#### 4.1.2 Extracción de compuestos bioactivos

El salvado de arroz sin desengrasar se tamizó hasta conseguir un tamaño de partícula comprendido entre 0,3 y 0,5 mm; a continuación, se pusieron en un matraz erlenmeyer 5,0 gramos con 50 mL de la mezcla extractora y se introdujo en un baño termostático con agitación (modelo Unitronic OR, Selecta, España) durante el tiempo y la temperatura requeridos por el diseño de experimentos. Transcurrido este tiempo, la mezcla se pasó por un juego de tamices (63 y 40  $\mu\text{m}$ ) y posteriormente fue centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos (Allegra™ 25 R Beckman Coulter, L'Hospitalet de Llobregat, España). El sobrenadante fue llevado a sequedad liofilizando o en un rotavapor, dependiendo de la naturaleza del disolvente y se conservó hasta su posterior análisis.

#### 4.1.3 Extracción con enzimas

La extracción con enzimas se llevó a cabo de forma análoga a la extracción descrita en el apartado anterior, añadiendo al matraz en cada caso la cantidad de enzima celulasa ajustando el pH, temperatura, tiempo y concentración de enzima en función del diseño experimental. Estudios preliminares hicieron descartar el resto de enzimas.

### 4.2 Análisis funcionales: caracterización y biofuncionalidad de los extractos

#### 4.2.1 Determinación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales (FT) se determinaron por espectrofotometría según el método descrito por Lima et al. (2005).

La reacción colorimétrica se desarrolló mezclando 0,25 mL del extracto, 2 mL de agua bidestilada y 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. A los 3 minutos, se añadieron 2 mL de carbonato sódico saturado y se enrasó a 25 mL con agua Mili-Q. Tras una hora de reacción en oscuridad, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-2450 (Shimadzu Corporation). La cuantificación se realizó mediante el método de patrón externo, expresando esta concentración en mg de ácido gálico/100 g muestra.

#### 4.2.2 Determinación de compuestos bioactivos mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD)

Para la cuantificación de los compuestos bioactivos se utilizó un sistema HPLC 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un muestreador automático y un detector DAD. La columna analítica empleada fue C-18 Gemini-NX (Phenomenex, 4,6  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm) mantenida a 40 °C con un termostato.

Para realizar el análisis de los compuestos fenólicos se emplearon como fases móviles agua (A) y acetonitrilo (B), conteniendo cada una de ellas 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. El modo gradiente fue establecido de la siguiente manera: condiciones iniciales 3 % B, de 0 a 30 minutos; 35 % B, de 30 a 33 minutos; 50 % B, de 33 a 34 minutos; 100 % B de 34 a 45 minutos. El flujo se fijó a 1,0 mL/min para todos los experimentos y el volumen inyectado fue de 10  $\mu$ L.

La detección de los compuestos se llevó a cabo a 280 y 320 nm, y la cuantificación se realizó mediante el método de patrón externo, empleando como patrones ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, ácido ferúlico y ácido gálico, medidos en mg/L.

Por otro lado, la determinación del  $\gamma$ -oryzanol se llevó a cabo por el método de Lu et al., (2014) modificado ligeramente. La fase móvil utilizada fue la mezcla metanol/acetonitrilo/isopropanol 52,5:47:0,5, bajo un modo de elución isocrático. La detección se realizó a 320 nm. El flujo establecido fue de 1,0 mL/min y el volumen de inyección de 20  $\mu$ L. La cuantificación fue igualmente realizada mediante patrones externos, expresando el resultado en mg/L.

El procesamiento de los datos cromatográficos se realizó mediante el software HP ChemStation (Rev.B.04.01., Agilent Technologies, California, USA).

#### 4.2.3 Actividad antioxidante. Ensayo del radical ABTS

La medida de la actividad antioxidante total (AAT) de los extractos obtenidos se determinó tanto para muestras hidrófilas como para muestras lipófilas según el método descrito por Turoli, Testolin, Zanini & Bellù (2004). Este método se basa en la reacción que tiene lugar cuando el compuesto ABTS [2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)], que es incoloro, se encuentra en presencia de persulfato de potasio, constituyendo así un equilibrio con su radical ABTS $\cdot$  (cromóforo azul-verdoso).

La determinación de la capacidad antioxidante del extracto se realizó midiendo la disminución de la absorbancia del radical ABTS, ya que esta reacción revierte si en el medio se encuentra una sustancia antioxidante.



La generación de este radical se produce por reacción del ABTS con persulfato en presencia de tampón fosfato (pH 7,5, 50 mM) en muestras hidrófilas. La mezcla de ambos compuestos debe permanecer durante 24 horas en oscuridad para que se estabilice antes de realizar las medidas. Una vez generado el radical, se adicionan 10 µL de la muestra, previamente diluida, a 100 µL de la disolución de ABTS. Seguidamente la disminución de la absorbancia se determina mediante espectrofotometría a 750 nm.

Para las muestras lipófilas se sigue la misma dinámica que la descrita para las muestras hidrófilas, pero en lugar de emplear como disolvente tampón fosfato, se utiliza etanol acidificado con un 1 % de ácido fosfórico. Las medidas de absorbancia también se realizan a 750 nm.

Para cuantificar la actividad antioxidante se empleó el método de patrón externo que utiliza el compuesto Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) como antioxidante sintético, expresando los resultados como mmoles de Trolox®/100 g de muestra. Este método se encuentra adaptado a lectores multiplaca (Thermo Scientific Appliskan, Thermo Fisher Scientific, Bath, UK), permitiendo así la realización de un gran número de medidas con el consiguiente ahorro de tiempo y reactivos.

#### 4.2.4 Actividad antimicrobiana *in vitro*

La capacidad antimicrobiana de los extractos se determinó según el procedimiento espectrofotométrico descrito por Delgado-Adámez, Gamero- Samino, et al. (2012). Los microorganismos se cultivaron en caldo Mueller-Hinton (CMH) (Oxoid, Basingstoke, UK) durante 24 h, posteriormente las suspensiones se ajustaron a una turbidez estándar y se diluyeron hasta la concentración deseada en CMH. El ensayo se realizó en microplacas de 48 pocillos, de tal forma que se adicionaron 800 µL de CMH, 100 µL de CMH con las bacterias diluidas ( $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>) y 100 µL de la alícuota de las soluciones de los extractos. El contenido de los pozos se mezcló y las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 h, periodo tras el cual se midieron a una longitud de onda de 450 nm.

Se realizaron además dos controles; en el primero de ellos se inoculó dilución de bacterias, CMH y matriz del extracto (agua Mili-Q estéril). En el control negativo se adicionó CMH, matriz de la bacteria (CMH) y matriz del extracto (agua Mili-Q estéril).

La actividad antimicrobiana se expresa en porcentaje de inhibición, calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - \left( \frac{\Delta A_{485 \text{ control}} - \Delta A_{485 \text{ tratamiento}}}{\Delta A_{485 \text{ control}}} \cdot 100 \right)$$

Donde  $\Delta A_{485 \text{ control}}$  es el incremento de la absorbancia del control medido a 485 nm y  $\Delta A_{485 \text{ tratamiento}}$  es el incremento de la absorbancia del extracto medido a 485 nm.

#### 4.3 Biodisponibilidad de compuestos bioactivos de los extractos: Digestión *in vitro*

Con objeto de estudiar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos presentes en los extractos, se desarrolló un modelo *in vitro* que simuló todas las etapas del sistema de digestión humana. Para ello, se tuvo en cuenta el estudio realizado por Lee et al. (2016), realizando una simulación en cuatro fases:

##### a) Simulación oral

En primer lugar, se procedió a la preparación de la saliva sintética (SSF) con un valor de pH de 6,8, de acuerdo a lo descrito por Espinal-Ruiz, Restrepo-Sánchez, Narvaez-Cuenca, & McClements (2015). En la Tabla 4.1 se describe la composición química de la saliva sintética.

**Tabla 4.1** Composición química del fluido de saliva sintética para un litro.

Compuesto	Fórmula Química	Pesado (g)
<b>Cloruro sódico</b>	NaCl	1,6010
<b>Nitrato amónico</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,6010
<b>Fosfato potásico dihidrógeno</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6264
<b>Cloruro potásico</b>	KCl	0,2021
<b>Citrato potásico</b>	K <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,3091
<b>Urato sódico</b>	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Na	0,0212
<b>Urea</b>	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	0,1983
<b>Lactato sódico</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Na	0,1451
<b>Mucina</b>	-	30

Una vez preparada la SSF, la simulación de la fase oral se llevó a cabo en tubos cónicos de propileno de 50 mL que contenía la mezcla extracto-SSF (0,5 g en 1 mL), incubadas en un equipo Orbital Shaker Incubator (OPTIC ivymen SYSTEM, Comecta S.A., Madrid, España) a 37 °C, con agitación continua a 100 rpm durante 10 minutos, para imitar las condiciones existentes en la boca. Aunque 10 minutos de incubación resulta ser un periodo algo más largo que el proceso *in vivo* (aproximadamente 1 minuto), la exactitud y la reproducibilidad a escala de laboratorio puede verse comprometida si se utiliza cualquier tiempo de digestión más corto. Además, se ha recomendado un tiempo de digestión oral de 10 minutos para compensar la falta de una acción mecánica adecuada para modelos estáticos, que en la mayoría de los casos es difícil de simular (Espinal-Ruiz et al., 2015).

b) *Simulación digestión gástrica*

El fluido gástrico sintético (SGF) se preparó de acuerdo con el método de Martín-Vertedor, Garrido, Pariente, Espino, & Delgado-Adámez, (2016), añadiendo 0,16 g de pepsina y 0,10 g de cloruro sódico en agua MilliQ hasta un volumen final de 50 mL a pH 1,5.

A continuación, al producto de la fase de simulación oral se le añadieron 3,6 mL de SGF para obtener una mezcla final a pH 2,2, la cual se agitó durante 2 horas a 37 °C y 100 rpm en el incubador (Lee et al., 2016).

c) *Simulación digestión intestinal*

El fluido intestinal sintético (SIF) se preparó en tampón fosfato salino PBS 0,1 M (100 mL, pH 7,4) añadiendo 20 mg de pancreatina, 5 mg de lipasa, ácido cólico 10 mM y ácido desoxicólico 10 mM (Martín-Vertedor, Garrido, Pariente, Espino & Delgado-Adámez, 2016).

Posteriormente, para inactivar la pepsina, a lo obtenido en la fase SGF se le ajustó el pH a 6,5 con NaOH. A continuación, se añadieron 3,6 mL de SIF al resultado de la fase gástrica, ajustando el pH final a 6,5. La mezcla se agitó durante 2 horas a 37 °C y 100 rpm en el incubador (Martín-Vertedor et al., 2016).

d) *Simulación digestión en el intestino grueso*

Para la simulación de la fase de digestión en el intestino grueso se cultivaron las enterobacterias *E. coli* y *L. casei*, en caldo Mueller Hinton, hasta que su concentración alcanzó entre  $10^8$  y  $10^{10}$  UFC. Posteriormente, la mezcla obtenida en la simulación anterior se puso en contacto con 9 mL de una mezcla de las dos bacterias ajustadas a una concentración de  $10^5$  y se incubó durante 4 horas a 37 °C (Lee et al., 2016).

Para eliminar las partículas sólidas y abordar el posterior análisis, después de cada fase de digestión, las mezclas obtenidas fueron centrifugadas, empleando un equipo Beckman Coulter Allegra 25R, durante 10 minutos a 4 °C y 10.000 rpm.

#### 4.4 Elaboración y tratamiento de las matrices alimentarias

##### 4.4.1 Elaboración de emulsión tipo mayonesas

Las emulsiones, cuya fórmula cuantitativa se detalla en Tabla 4.2, fueron elaboradas con aceite de girasol y leche de vaca entera.

**Tabla 4.2** Fórmula cualitativa de la lactonesa utilizada en este estudio

Ingrediente	% (peso/peso)
Aceite de girasol	57,3%
Leche de vaca entera UHT	40,3%
Vinagre de vino	1,7%
Sal	0,7%

Una vez pesados todos los ingredientes, se procedió a la emulsión de los mismos con la ayuda de una batidora eléctrica, hasta obtener una consistencia homogénea.

#### 4.4.2 Elaboración de *burger meat*

Para su preparación, la carne de cerdo adquirida en un comercio local se picó y mezcló con el resto de los ingredientes (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3** Fórmula cuantitativa de *burger meat* empleada

Porcentaje de extracto	0 %	0,5 %	1 %	2 %
Carne de cerdo (g)	1.000	1.000	1.000	1.000
Extracto (g)	0	5	10	20
Harina de trigo (g)	40	40	40	40
Sal (g)	13	13	13	13
Perejil, ajo, cebolla (g)	2	2	2	2
Pimienta blanca (g)	1	1	1	1
Pimienta negra (g)	0,5	0,5	0,5	0,5

A continuación, se prepararon porciones de *burger meat* de 80 gramos y se envasaron en *skin*. Esta es una tecnología de envasado en la cual, durante el proceso de vacío, el film de sellado previamente calentado se adapta perfectamente a la forma y los contenidos del alimento que contiene, como si de una segunda piel se tratara. El envasado se realizó en bandejas Cryovac (197 x 155 x 30 mm) ( $O_2$  permeabilidad <1 cm<sup>3</sup>/bandeja/24h) con film Cryovac 100 µm (OTR a 23 °C, 0 % RH 1,5 cm<sup>3</sup>m<sup>-2</sup>, 24 h, bar) utilizando una envasadora Ulma Smart 300 de forma individual. El proceso de formación de las *burger meat* se repitió tres veces en diferentes días con objeto de obtener

suficientes muestras para los subsiguientes análisis. Inmediatamente después de su fabricación, el lote de muestras correspondiente se trató mediante alta presión en un equipo semi-industrial Hiperbaric Unit Wave 6000/55. Para maximizar la inactivación de microorganismos se realizó un tratamiento de 600 MPa durante 5 minutos. La unidad tardó 3 minutos y 50 segundos en alcanzar el objetivo de presión, siendo la descompresión instantánea. La temperatura del agua fue de 10 °C.

#### 4.4.3 Jamón envasado en envase activo

El envase activo se preparó extendiendo directamente 0,3 gramos de extracto etanólico de salvado de arroz en envases (Cryovac OptiDure™ ODA7005) con un tamaño de 230 x 300 mm, y una permeabilidad al oxígeno de 10 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>, durante 24 h (a 0 y 100 % humedad relativa). El jamón ibérico de bellota (100 % raza ibérica) se adquirió loncheado directamente del productor. En cada envase se introdujeron 100 gramos de lonchas de diferentes partes del jamón para permitir una distribución lo más homogénea posible de los diferentes músculos del mismo y se envasó a vacío con un equipo Henkovac PRO ECO. Una vez envasados, la mitad de los lotes de jamón se sometieron, durante 7 minutos, al efecto de las altas presiones hidrostáticas en similares condiciones al tratamiento descrito en el apartado anterior.

#### 4.4.4 Elaboración de envasado basado en quitosano

Las películas o films se prepararon a partir de una disolución formadora, la cual se elaboró disolviendo quitosano (2 % p/v) en una solución de ácido cítrico al 2 %. A continuación, se añadió glicerol a la solución en una concentración 50 % p/p con respecto al quitosano. La solución se agitó en un baño de ultrasonidos (P-Selecta, mod 516, Barcelona, España) hasta su completa disolución. Posteriormente, se añadió una cantidad de 0,15 g de nisina y/o 0,25 g de RBE por cada 100 g de solución formadora de película, según el diseño experimental. Las soluciones obtenidas se vertieron en placas de Petri de poliestireno de Ø 150 mm (50 g/placa) y se dejaron secar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24-48 horas hasta la formación de la película.

Los biopolímeros a base de quitosano se utilizaron para cubrir 30 g de jamón ibérico cortado en lonchas y posteriormente se sellaron al vacío en un envase (Cryovac OptiDure™ ODA7005). A continuación, con el fin de establecer las sinergias entre el envasado y el tratamiento de alta presión, se llevaron a cabo los tratamientos descritos previamente (Sección 3.3.4.).

## 4.5 Métodos analíticos aplicados en matrices alimentarias

### 4.5.1 Análisis microbiológico

Para evaluar la inactivación de microorganismos en las distintas matrices estudiadas tras los diferentes procesados, se determinaron los principales grupos microbianos alterantes y patógenos.

Los análisis microbiológicos se realizaron con 10 gramos de muestra, tomados aseptícamente y homogeneizados con 90 mL de agua de peptona (Merck, 1.07043) en un homogeneizador de palas (Stomacher® 400 Circulator). A continuación, se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona, y 1 mL de estas diluciones se sembró en los correspondientes agares selectivos. Los resultados se expresaron como  $\log_{10}$  unidades formadoras de colonias en un gramo (UFC  $\text{g}^{-1}$ ).

**Tabla 4.4** Condiciones de crecimiento para el recuento y enumeración de microorganismos

Microorganismo	Agar	Tiempo de incubación (horas)	Temperatura de incubación ( $^{\circ}\text{C} \pm 1$ )
<b>Aerobios mesófilos</b>	PCA	72	30
<b>Psicrótrofos</b>	PCA	120	17
<b><i>E. coli</i></b>	Chromocult Agar	24-48	37
<b>Coliformes totales</b>	Chromocult Agar	24-48	37
<b>Bacterias ácido-lácticas</b>	MRS Agar	72	37
<b><i>S. aureus</i></b>	Baird Parker Agar	24-48	37
<b>Mohos y Levaduras</b>	YGC	120	25
<b><i>B. cereus</i></b>	MYPA	18-24	30
<b><i>C. perfringens</i></b>	TSC Agar	24	37

Además, para determinar la presencia/ausencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* se siguieron las normas ISO 6579:1993 e ISO 11290-1:1997, respectivamente.

#### *Inoculación y recuento de L. monocytogenes*

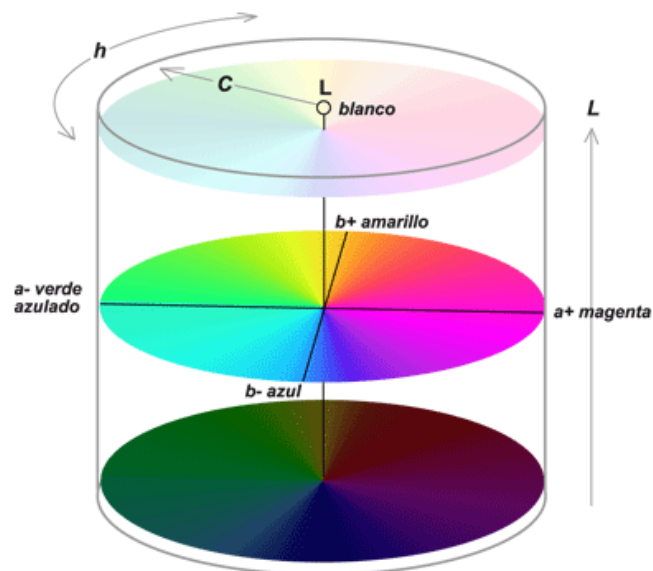
Se seleccionaron dos cepas de *L. monocytogenes* de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 933 y 911). Cada una de las cepas fue transferida a 500 mL de caldo Muller-Hilton a doble concentración, e incubada a 37  $^{\circ}\text{C}$  con 120 rpm de agitación durante 48 horas. Para conocer la población de cada cultivo se hicieron diluciones decimales con agua de peptona y se determinaron los recuentos celulares por medio de la cámara de Neubauer. Para alcanzar la concentración requerida de inóculo en el estudio ( $10^{11}$  UFC

mL<sup>-1</sup>), en algunos casos fue necesaria la concentración por centrifugación (5.000 rpm/10 min).

El recuento de *L. monocytogenes* en jamón ibérico loncheado se llevó a cabo siguiendo el procedimiento estandarizado en la norma ISO 11290-2:2018. Para ello, se tomó asépticamente una cantidad de 10 g de muestra y se diluyó con 90 mL de caldo Fraser. A continuación, se homogeneizó en un homogeneizador de palas (Stomacher® 400 Circulator) y se mantuvo a 30 °C durante una hora antes del análisis. Posteriormente, se hicieron diluciones decimales del homogeneizado utilizando agua de peptona tamponada estéril y se añadieron 0,1 mL de la dilución correspondiente en placas de Agar Cromogénico de *Listeria* (Oxoid CM1084) complementadas con SR0244E y SR0226E. Las placas se incubaron a 37 °C con lecturas a 24 y 48 horas. Los resultados se expresaron como log UFC g<sup>-1</sup> de jamón.

#### 4.5.2 Color instrumental

Los parámetros de cromaticidad se midieron en un espectrofotómetro Konica Minolta CM-5 (Konica Minolta, Tokyo, Japón). La reflectancia se midió para cada muestra usando un iluminante D65 con un ángulo de 10°. Para obtener un promedio de las medidas, éstas se realizaron de forma aleatoria por duplicado en diferentes partes de la muestra. El diámetro de apertura fue de 30 mm. Se determinaron las coordenadas del espacio CIE 1976: L\* (luminosidad), a\* (verde ± rojo) y b\* (azul ± amarillo).



**Figura 4.1.** Espacio de color CIELAB

A partir de las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , y utilizando las fórmulas siguientes, se calcularon las magnitudes psicofísicas tono (Hue,  $h$ ) e índice de saturación (Chroma,  $C^*$ ):

$$h = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$
$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

#### 4.5.3 Medidas de pH

Las medidas de pH de las emulsiones se realizaron con un pHmetro Crison 25+.

#### 4.5.4 Análisis microscópico

El análisis de la estructura microscópica de las emulsiones se llevó a cabo mediante un microscopio Leica DMLB con iluminación de campo claro y una lente de aumento 40x. Las imágenes digitales fueron tomadas usando una cámara Leica MC170 HD. El tamaño de partícula se realizó usando una escala de 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.5 Medida del valor de peróxidos

El valor de peróxidos (PV) permite medir la concentración de los productos primarios que se originan durante la fase de iniciación de la lipoxigenación o peroxidación lipídica.

Para determinar este parámetro, se mezcló, en un tubo cónico de propileno de 50 mL, la muestra (entre 0,01 y 0,30 g de la fracción lipídica del alimento, dependiendo de la extensión de la peroxidación) con 9,8 mL de cloroformo-metanol (70:30, v:v), para ser agitada en un agitador tipo vórtex durante 2-4 segundos. Después se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de tiocianato de amonio (30 g/L) y se mezclaron de nuevo en el vórtex durante 2-4 segundos. Finalmente, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de hierro (II) y se agitó durante 2-4 segundos.

Tras cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, y usando un espectrofotómetro, se midió la absorbancia de la muestra a 500 nm frente a un blanco que contenía todos los reactivos excepto la propia muestra. El proceso global se llevó a cabo con luz tenue y se completó en 10 minutos. Los resultados se expresaron como % de inhibición de las muestras tratadas con respecto al tratamiento control.

#### 4.5.6 Oxidación lipídica. Medida de TBA-RS

La oxidación lipídica, tanto en muestras de carne como de jamón ibérico, se estudió a través de la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), siguiendo el método descrito por Sørensen & Jørgensen (1996).

En primer lugar, se pesaron 4 gramos de muestra previamente picada y se homogeneizaron junto a 15 mL de una mezcla constituida por 1 g de propilgalato + 1 g



de EDTA + 75 g de TCA (ácido tricloroacético) en un litro de agua destilada, durante 45 segundos en un homogeneizador Onmi-mixer (Onmi Inc., Kennesaw, EEUU). A continuación, 4 mL del homogeneizado previamente filtrado se mezclaron con 4 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico, 20 mM) y se calentaron durante 40 minutos a 90 °C. Pasado este tiempo, las muestras enfriadas se centrifugaron durante 10 minutos a 2.500 rpm, procediéndose a la lectura de la absorción del sobrenadante a 508, 532 y 600 nm.

Como patrón se utilizó el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) que origina malonaldehído (MDA) cuando se trata en caliente en medio ácido. Los resultados se expresaron como mg MDA/kg de carne.

#### 4.5.7 Medida de la oxidación proteica

La medida del grado de oxidación de las proteínas, en carne y jamón, se llevó a cabo mediante la estimación de los grupos carbonilos formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) en HCl 2 M, siguiendo el método descrito por Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein & Stadtman (1987).

Para ello, se homogeneizó un gramo de muestra con 10 mL de KCl 0,15 M durante un minuto, y se tomaron dos alícuotas diferentes de 100 µL a las que se les añadió 1 mL de TCA al 10%. Una vez agitado y previa centrifugación (5 min, 10.000 rpm) se eliminaron los sobrenadantes y a los residuos obtenidos se le añadieron 1 mL de HCl 2 M y 1 mL de HCl 2 M + 0,2 % de DNPH, respectivamente. Tras una hora de reacción, se añadió un mL de TCA a cada alícuota y se eliminó el sobrenadante centrifugando previamente. El pellet así obtenido se lavó tres veces con una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1) y finalmente se redisolvió en una disolución de guanidina 6 M.

Los resultados, expresados como nmol de DNPH fijado por miligramo de proteína, se obtuvieron mediante registros en un espectrofotómetro a 280 y 370 nm usando guanidina como blanco. La oxidación de proteínas se expresó en nmol de carbonilo mg<sup>-1</sup> de proteína. La concentración de proteína fue calculada usando BSA (suero de albúmina bovina) como estándar.

#### 4.5.8 Análisis sensorial

Los análisis se desarrollaron en una sala de cata acorde a las especificaciones de la normativa ISO-UNE-EN (8589.2007). Todas las sesiones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en una sala equipada con luz fluorescente blanca. Los catadores fueron provistos de agua a temperatura ambiente entre muestras.

Para el análisis sensorial de las *burger meat* se evaluaron cuatro muestras por lote, diferentes de las usadas para el análisis fisicoquímico y microbiológico. El panel estuvo

constituido por ocho panelistas que realizaron las catas en dos sesiones en diferentes días. Las muestras se cocinaron por ambos lados en un horno eléctrico (200 °C durante 1,5 minutos) hasta alcanzar una temperatura interna de 70 °C. Seguidamente se cortaron en cuatro porciones que se sirvieron inmediatamente, dos por lote a cada catador. Éstos evaluaron diferentes parámetros en una escala cuantitativa-descriptiva no estructurada de 0-10. La apariencia se evaluó a través de la intensidad del color de la *burger meat* cocinada (de blanco a marrón oscuro). Se evaluó también la intensidad de olor (desde inodoro hasta olor muy intenso) y la intensidad de olores desagradables (desde inodoro hasta muy intenso). Otros parámetros evaluados fueron la intensidad de sabores como el de carne cocinada (desde suave a intenso), sabores desagradables (desde ninguno hasta muy desagradables), textura percibida, jugosidad y dureza. Para evitar los posibles riesgos microbiológicos sólo se analizaron las muestras de un día de almacenamiento.

En el caso del jamón ibérico loncheado, los ocho panelistas entrenados evaluaron trece parámetros diferentes (Figura 4.2). La apariencia se evaluó a través de cuatro parámetros: color del magro (desde rojo claro hasta oscuro), apariencia de la grasa (de blanco a amarillo), veteado (nivel de grasa intramuscular visible: de poco a mucho) y brillo (de apagado a brillante intenso). También se evaluó la intensidad del olor del jamón ibérico (de inodoro a muy intenso) y la intensidad de los olores desagradables (de ausencia a presencia). Otros parámetros evaluados fueron la intensidad de los sabores, como la intensidad del sabor a jamón ibérico de bellota (de poco a mucho), la rancidez (de no rancio a muy rancio), el salado (de no salado a muy salado), el picante (de no picante a muy picante) y los sabores desagradables (de nada a mucho); y la textura percibida al masticar (textura en la boca) como la jugosidad (impresión de jugosidad durante la masticación: de muy seca a muy jugosa) y la dureza (percepción de firmeza durante la masticación: de muy tierna a muy firme).

#### 4.5.9 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos tras los análisis llevados a cabo con los extractos se realizó con el programa Graph Prism v.6 (GraphPad Software, Inc., USA). Dichos resultados se estudiaron estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). En el caso de existir diferencias significativas entre las medias, se aplicó el test de comparación de medias de Tukey ( $p < 0,05$ ). La relación lineal entre variables se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson a un nivel de significación de 0,05. Para el diseño de experimentos mediante la metodología de superficie de respuesta y su posterior evaluación se utilizó el programa Design Expert v.10.0 (Stat Ease, Inc, USA).

**Tipo de prueba: test descriptivo (Análisis Cuantitativo-Descriptivo)**

**Nombre:**  
**Producto:**  
**Fecha:**

A continuación, se le van a presentar varias muestras. Por favor evalúe cada uno de los atributos sensoriales indicando en la escala, la intensidad de los mismos.

**MUESTRA N°**

**EVALUACIÓN VISUAL**

Color del magro |-----|  
 Rojo claro Rojo oscuro

Aspecto de la grasa |-----|  
 Blanca Amarillo

Veteado |-----|  
 Poco Mucho

Brillo |-----|  
 Apagado Intenso

**OLOR**

Intensidad |-----|  
 Muy poco Mucho

Olores desagradables |-----|  
 Ausencia Presencia

**SABOR**

A jamón ib. bellota |-----|  
 Muy poco Mucho

Rancio |-----|  
 Nada rancio Muy rancio

Salado |-----|  
 No salado Muy salado

Picante |-----|  
 No picante Muy picante


Sabores desagradables |-----|  
 Presencia Ausencia

**TEXTURA**

Jugosidad |-----|  
 Muy seco Muy jugoso

Dureza |-----|  
 Muy tierna Muy firme

**MUCHA S GRACIAS**



**Figura 4.2.** Hoja de cata utilizada para la evaluación sensorial del jamón ibérico loncheado



## Resultados y Discusión



**Capítulo 5.1 Bioavailability, composition and functional  
characterization of extracts from *Oryza sativa* L. bran**



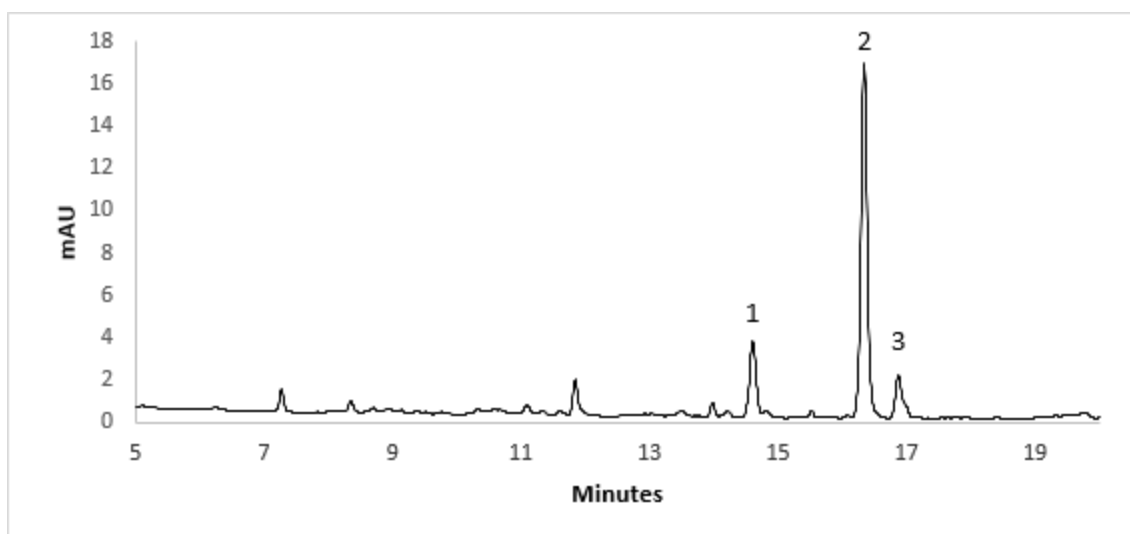


## V. Resultados

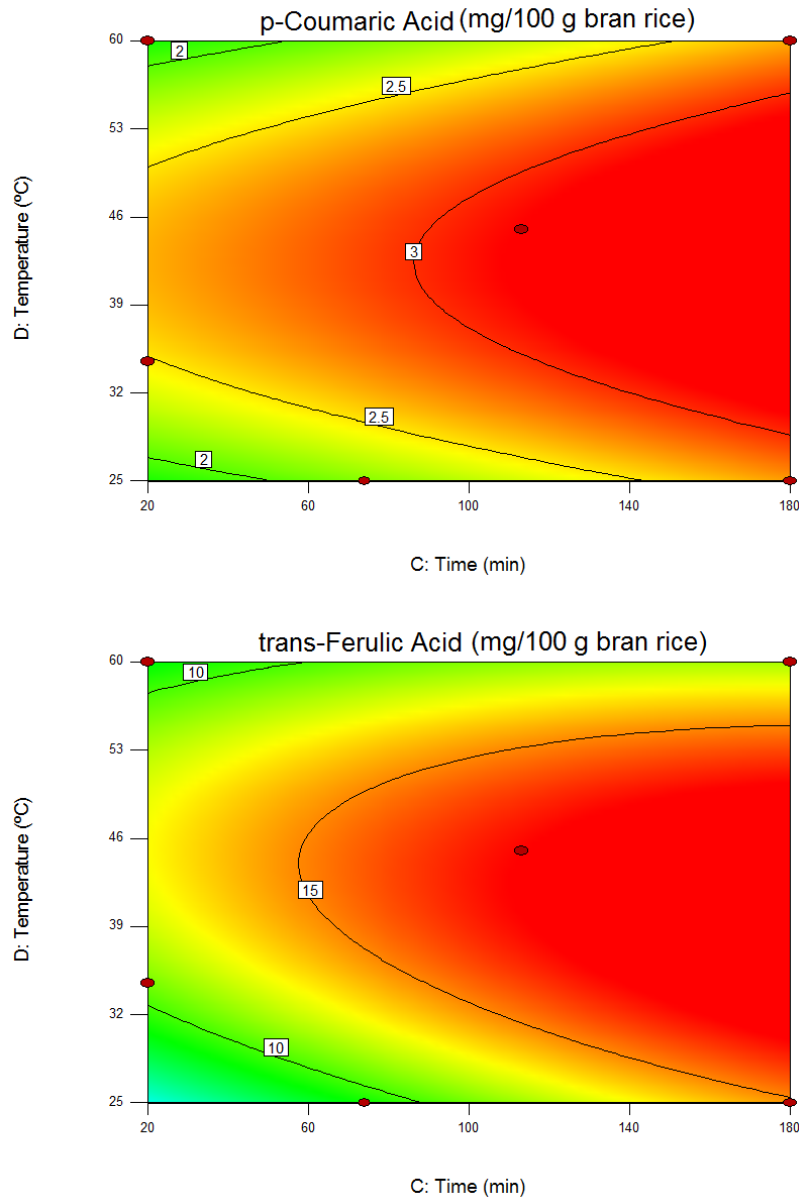
### 5.1 Bioavailability, composition and functional characterization of extracts from *Oryza sativa* L. bran

#### 5.1.1 Optimization of the extraction process

Main phenolic compounds, ferulic and *p*-coumaric acids, measured by HPLC and expressed as mg phenol/100 g bran rice (Figure. 5.1), were used for adjusting the response surfaces, although other phenolic compounds no identified or no quantified were also presented. As it can be observed in Table 5.1, ferulic acid content was higher than the observed for *p*-coumaric acid in most performed runs. The solvent had an important effect obtaining the highest concentrations of phenolics when 100% water was employed as solvent extraction. Figure 5.2 a and b show the effects of extraction time and temperature on the content of ferulic and *p*-coumaric acids, respectively. The increase in extraction temperature led to a gradual enhancement in the phenolic compound content when 100 % water was the solvent, reaching a maximum at 43 °C, higher temperatures decrease the amount of phenols obtained.



**Figure 5.1.** Typical chromatogram of phenolic acid from bran rice. Peaks: *p*-coumaric acid (1), ferulic acid (2) and sinapic acid (3).



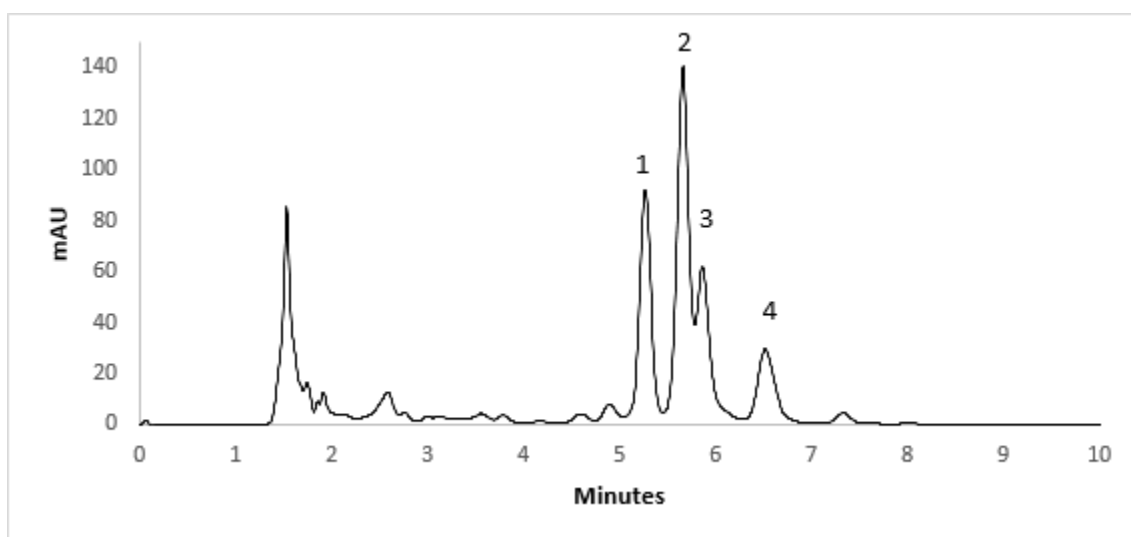
**Figures 5.2 a and b:** Response surface plots showing the effect of time (min) and temperature (°C) on the content of A: *p*-coumaric acid, and B: ferulic acid.

Similarly, the extraction time increased the phenolic content reaching a maximum at 113 min, higher times do not increase the number and amount of phenolic compounds extracted. Previous researches reported that ferulic acid was the major phenol in bran of white rice. However, solvents like methanol, ethyl acetate or hexane have been used for the extraction (Pang et al., 2018; Shao, Xu, Sun, Bao, & Beta, 2014). Butsat & Siriamornpun (2010) found an amount of 2.07–3.35 mg/100 g bran rice, a quantity lower than the observed in our case.

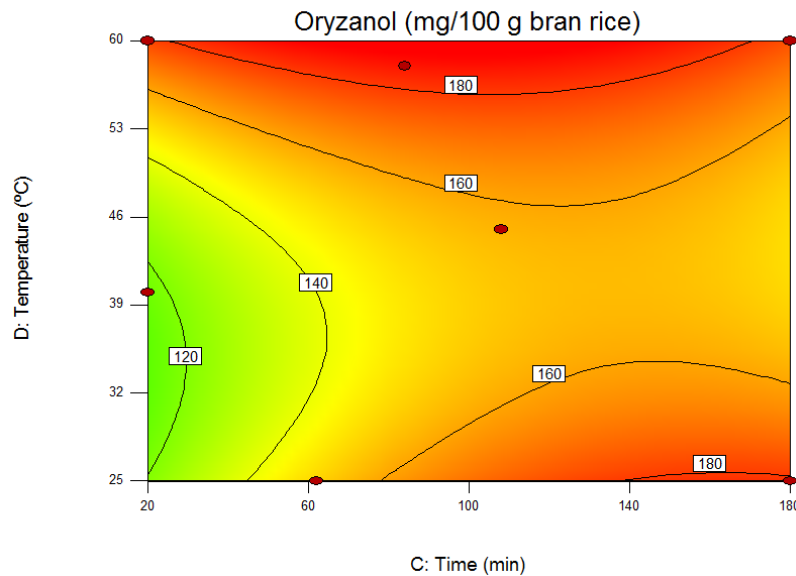
**Table 5.1.** Experimental factors and measured values of response. The extraction factors are: % water (A), % ethanol (B), time in minutes (C) and temperature in °C (D). The measured responses are concentrations of *p*-coumaric acid (Y1), ferulic acid (Y2),  $\gamma$ -oryzanol (Y3), expressed in mg/100 g bran rice and antioxidant activity, by ABTS and DPPH methods respectively, (Y4), expressed in mg Trolox/100 g bran rice.

Run	Extraction factors				Surface responses			
	A	B	C	D	Y1	Y2	Y3	Y4
1	28	72	92	40	0.856	1.677	24.23	636.49
2	0	100	20	60	0.724	1.005	175.63	190.22
3	36	64	113	25	1.045	2.027	1.25	610.46
4	28	72	92	40	0.923	1.853	21.84	535.87
5	0	100	180	60	1.138	1.676	175.21	220.26
6	72	28	180	25	1.723	4.035	0.00	861.00
7	72	28	90	40	1.185	2.666	0.00	999.91
8	28	72	180	25	1.046	2.189	18.79	426.74
9	72	28	136	60	1.206	1.911	1.92	1033.44
10	72	28	90	40	1.204	3.288	0.00	895.79
11	100	0	180	25	2.695	14.756	0.52	868.26
12	54	46	20	44	0.440	0.850	0.00	511.10
13	52	48	151	37	2.880	16.490	0.00	854.74
14	73	27	180	48	1.249	2.424	0.00	1111.54
15	100	0	180	60	2.654	11.581	0.00	894.54
16	0	100	62	25	0.638	0.461	149.97	152.68
17	29	71	180	48	0.600	2.050	9.27	600.45
18	0	100	108	45	0.900	0.832	154.69	147.67
19	52	48	74	53	0.893	0.660	0.00	733.10
20	100	0	113	45	3.116	17.233	0.00	1246.69
21	100	0	20	34,5	2.456	10.872	0.00	882.02
22	72	28	90	40	0.434	2.862	0.00	834.97
23	100	0	74	25	2.136	9.022	0.00	1061.98
24	28	72	140	60	0.475	2.133	12.83	618.97
25	0	100	20	40	0.420	0.536	119.04	205.24
26	0	100	180	25	0.659	0.669	182.46	200.23
27	27	73	20	60	1.499	1.325	15.60	677.29
28	72	28	20	25	1.066	2.099	0.00	803.93
29	71	29	20	60	1.338	0.595	0.73	896.79
30	0	100	84	58	0.809	0.448	190.92	280.32
31	28	72	92	40	1.057	1.986	9.31	595.44
32	73	27	180	48	1.140	1.225	0.00	921.82
33	27	73	20	25	0.678	1.114	13.30	421.74
34	100	0	20	60	1.819	8.703	0.00	788.91

On the other hand,  $\gamma$ -oryzanol content from rice bran was measured by HPLC and the result are shown in Table 5.1, expressed as mg of total  $\gamma$ -oryzanol/100 g of bran rice. In Figure. 5.3 is shown a typical chromatogram of  $\gamma$ -oryzanol exhibiting four peaks corresponding at cycloartenyl ferulate (1), 24-methylene cycloartenyl ferulate (2), campesteryl ferulate (3) and sitosteryl ferulate (4). The behavior in  $\gamma$ -oryzanol extraction, Figure. 5.4, was very different that the observed for phenolic compounds. According response surface results, the highest extraction was obtained with 100% ethanol, maximum concentrations of  $\gamma$ -oryzanol were reached at extreme values of temperature in surface response and increased with extraction times until 60 min, remained stable with more prolonged times. The highest concentration of these compounds was obtained at 58 °C and 92 min in ethanol. These results are in concordance with the study carried by Imsanguan et al., (2008) that showed ethanol was suitable for  $\gamma$ -oryzanol extraction against hexane at 55–60 °C.



**Figure 5.3** Typical chromatogram of  $\gamma$ -oryzanol from bran rice. Cycloartenyl ferulate (1). 24-methylene cycloartenyl ferulate (2), campesteryl ferulate (3) and sitosteryl ferulate (4).



**Figure 5.4:** Response surface plot showing the effect of time (min) and temperature (°C) on the content of  $\gamma$ -oryzanol

The concentration of  $\gamma$ -oryzanol found in bran rice was similar to reported in previous studies, 50–80 mg/100 g bran rice (Iqbal, Bhanger, & Anwar, 2005), and 265 mg/100 g bran rice (Proctor & Bowen, 1996), however, these studies were carried out with organic solvent and it is difficult apply the obtained extract in foods.

With the obtained results for the different experiments, a model analysis was done for the variables (A, B, C, D) and the responses (Y1, Y2, Y3). The values of the responses of each run were fit in the design to obtain model equation for each response.

The linear analysis of regression was established by the Design Expert v.9, the coefficients of the linear determination  $R^2$  were 0.9641, 0.996 and 0.9991, respectively, for the responses Y1, Y2, and Y3. Adjusted regression of the model allows to evaluate the quality of adjustment of the model established and also it takes into account the degrees of freedom of the model. The result of the adjusted regression has been represented in Table 5.2. The results of the linear and adjusted regression were closed to 1, that proved that most of variation observed was explained by the direct effects of the factors.

**Table 5.2.** Determination coefficient and ANOVA result for *p*-coumaric acid (Y1), ferulic acid (Y2), and  $\gamma$ -oryzanol (Y3). R<sup>2</sup> coefficient of determination, SD standard deviation, C.V. % coefficient of variation, DF degrees of freedom.

	Y1	Y2	Y3
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9641	0.9966	0.9991
<b>Adj-R<sup>2</sup></b>	0.8725	0.9879	0.9967
<b>SD</b>	0.25	0.48	3.88
<b>C.V. %</b>	20.47	13.51	10.10
<b>DF</b>	23	23	23
<b>F value</b>	10.52	115.06	418.40
<b>p-value</b>	0.0005	0.0001	0.0001

The models showed that solvent composition had a high influence in the extraction procedure, thus, while phenolic compounds were extracted with 100 % water, that also provided the highest antioxidant activity. The highest amount of  $\gamma$ -oryzanol were obtained with 100 % ethanol.

The ideal extract should have the maximum concentration of phenolic compounds,  $\gamma$ -oryzanol and antioxidant activity, but it has been proved that more advantageous conditions for phenolic compound extraction provide a low concentration of  $\gamma$ -oryzanol, for that reason, the desirability function, that finds factors that provide the “most desirable” response values is not suitable in our case.

In order to obtain best results, we decided to study two optimal conditions: phenolic compounds (extract 1) and  $\gamma$ -oryzanol (extract 2). The extracts were prepared according to these optimized factors. For Extract 1, 100% water, 41.79 °C and 138.62 min. For extract 2, 100% ethanol, 60 °C and 97 min. No significant differences were detected between the predicted (mean  $\pm$  95% confidence interval) and real content (mean  $\pm$  SD) for the responses (Table 5.3). This reveals that the mathematical models obtained from the D-optimal design were well fitted.

**Table 5.3.** Optimized extracts. Concentration of phenolic acid and  $\gamma$ -oryzanol are given as mg/100 g bran rice. In brackets are shown the predicted values according to the models.

	Optimized parameters	<i>p</i> -Coumaric acid	Ferulic acid	$\gamma$ -oryzanol
<b>Extract 1</b>	Y1 and Y2	3.05 $\pm$ 0.09 (3.28 $\pm$ 0.48)	18.41 $\pm$ 0.36 (18.21 $\pm$ 6.63)	n.d.
<b>Extract 2</b>	Y3	0.75 $\pm$ 0.05	1.32 $\pm$ 0.09	195.82 $\pm$ 5.12 (195.56 $\pm$ 0.25)

(n.d.: not detected).

## 5.1.2 Digestion process of optimized extract

Once parameters of extraction of compounds have been optimized, the solvent was eliminated and we proceed to characterize the extract thus obtained. For the extract 1, enriched in phenolic compounds, water was eliminated by freeze drying and the bioactive compounds found are shown in Table 5.4. As it can be observed, this aqueous extract has a high concentration of hydroxycinnamic acid, of which the majority is ferulic acid. This in concordance with previous studies (Butsat & Siriamornpun, 2010). The  $\gamma$ -oryzanol content, nevertheless, was lower than in other studies, probably due to its lower solubility in water. With respect to the digestion steps, ferulic and *p*-coumaric acids show a similar behavior. Oral digestion (data not shown) have a short interaction time, thus, the impact of enzymatic digestion on polyphenol release is assumed to be low (Bohn, 2014). Phenolic acids exhibit the highest concentration in gastric step, even more than initial extract.

**Table 5.4.** Bioactive compounds content in optimized extracts before and after digestion steps. The data are expressed in mg/g extract.

Extract 1			
Phase	Ferulic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	$\gamma$ -oryzanol
Extract	1.00 ± 0.03b	0.19 ± 0.02b	0.079 ± 0.002
Gastric	1.67 ± 0.03a	0.300 ± 0.006a	n.d
Small intestine	0.574 ± 0.007d	0.111 ± 0.005c	n.d
Large intestine	0.92 ± 0.03c	0.180 ± 0.007b	n.d
Extract 2			
Phase	Ferulic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	$\gamma$ -oryzanol
Extract	0.117 ± 0.003a	0.058 ± 0.007a	14.41 ± 0.26
Gastric	0.094 ± 0.004b	0.0118 ± 0.0007c	n.d
Small Intestine	0.095 ± 0.004b	0.020 ± 0.003c	n.d
Large intestine	0.097 ± 0.097b	0.04 ± 0.01b	n.d

In columns, different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples through digestion steps. n.d.: not detected.

This is in agreement with previously studies carried out in polyphenol coming from another matrix (Bohn, 2014) and can be due to the compounds were linked to matrix, bound carbohydrates or in  $\gamma$ -oryzanol structures. However, in other reports, the polyphenols decrease in gastric phase. (Heleno et al., 2015; Martín-Vertedor et al., 2016).

Therefore, we must assume that the behaviour depends on both the matrix and the type of phenol studied. Concentration of phenolics after small intestine step drastically reduce up to 50% of its initial value.

Previous reports have shown this same fact (Bohn, 2014; Martín-Vertedor et al., 2016). Lastly, bioactive compounds determination was done after large intestine. Previous studies have demonstrated that gut microbiota can modify structures (Braune & Blaut, 2016; Williamson & Clifford, 2010). In our study, the amount of polyphenols lightly increases respect previous step (Table 5.4).

At the end of the process, phenolic acids have suffered a decrease respect to initial extract, but in *p*-coumaric acid this shift is not significative.

On the other hand, a small concentration of  $\gamma$ -oryzanol was found in the extract 1 (Table 5.4). Surprisingly, these compounds are not present in the rest of steps of digestion. Our findings suggest than  $\gamma$ -oryzanol is hydrolysed and ferulic acid are released. This is in agreement with studies of Mandak & Nyström (2012), that demonstrated that the bioavailability of steryl ferulates is low (1.5 % in rice bran).

In the same way, ethanol in the optimized extract 2 that was optimized was evaporate, and phenolics and  $\gamma$ -oryzanol content was determinated (Table 5.4). In this case, the polyphenol content was smaller than in the other extract, and the  $\gamma$ -oryzanol concentration higher.

In extract 2, behaviour of ferulic and *p*-coumaric acid is not so uniform than previous case during the *in vitro* digestion. While ferulic acid remains constant and lightly lower than in the initial extract during all process, *p*-coumaric acid bioavailability increases throughout the digestion process. The different attitude can be due to the release of bound-polyphenols, because majority of  $\gamma$ -oryzanol structures have a ferulic acid in their structure. On the other hand,  $\gamma$ -oryzanol content is 14.41 mg/g extract in the initial extract, but, the same as in the first extract, no amount of these compounds was found in any step of digestion.

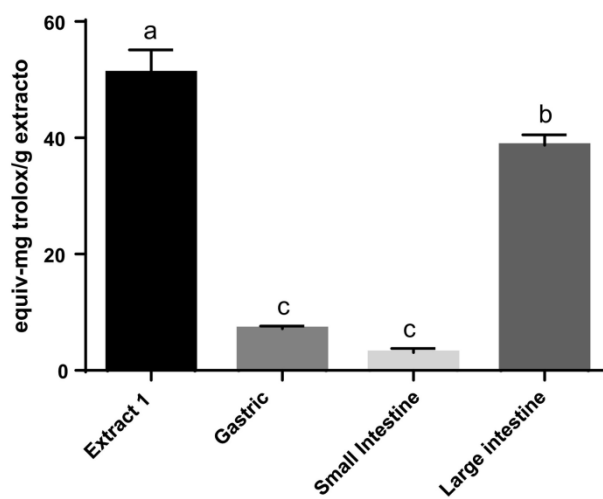
This fact demonstrated that  $\gamma$ -oryzanol fraction is not bioavailability for humans. This does not mean that they are not beneficial for human healthy, however, their properties are dues to the substances releases in their hydrolysis, since its compounds are bioactive with antioxidant activity.

### 5.1.3 Antioxidant activity

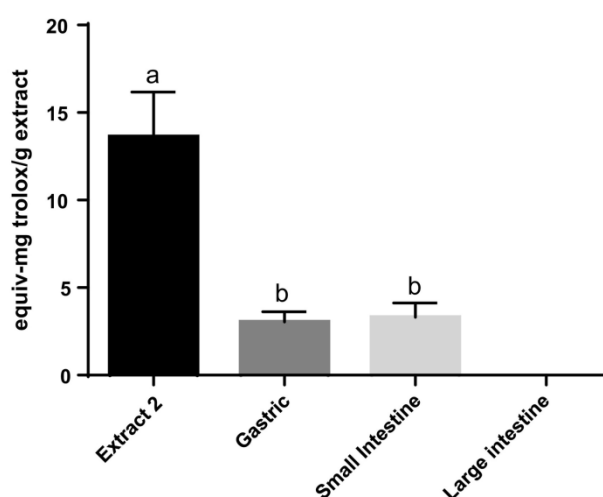
Results of antioxidant activity for the extracts obtained from rice bran are shown in Table 5.1. It is very well demonstrated that phenolic compounds have antioxidant activity and our findings are in agreement with this fact. The results showed that the antioxidant activity of rice bran extract was drastically affected by solvent composition and significantly ( $p < 0.05$ ) affected by extraction temperature and extraction time. For the



ABTS assay the highest antioxidant value, 1246.69 mg Trolox/100 g bran rice, was observed in experimental run 20 with 100% of water, 45 °C during 113 min, whereas the lowest one, 147.67 mg Trolox/100 g bran rice, was observed in experimental run 18 with 100% of ethanol, 45 °C during 108 min of extraction time. After optimization and digestion, the antioxidant activity of both extract is shown in Figures 5.5 and 5.6. Extract 1 has an antioxidant activity significantly ( $p < 0.05$ ) lower in all steps of digestion than the original extract. Interestingly, antioxidant compounds amount is higher at the end of process, what seems to indicate that in final step (large intestine) gut microbiota modifies the structures of compounds transforming them into more antioxidant compounds. Thus, we can conclude that antioxidant activity is not only influenced by type and concentration of these compounds, but also of the interaction between them.



**Figure 5.5.** Antioxidant activities in digestion steps of extract 1.



**Figure 5.6.** Antioxidant activities in digestion steps of extract 2.

In extract 2, antioxidant activity (Figure 5.6) decreases with respect to the initial extract, not finding antioxidant activity at the end of the process. Previous studies are in

agreement with this fact (Heleno et al., 2015; Martín-Vertedor et al., 2016). These observations seem to indicate that compounds created in the large intestine by interaction of gut microbiota are not bioactive, on the contrary that happened in the first extract.

#### 5.1.4 Conclusions

In this research, we observed that rice bran is a good source of phytochemical compounds, and D-optimal design and optimization techniques can be successfully implemented to improve in the extraction process of these bioactive compounds.

The proposed extraction process depends mainly on solvent proportion and in a lower extent on time and temperature of extraction. Phenolic compounds have been extracted in 100% water while  $\gamma$ -oryzanol have been obtained with 100% ethanol. Antioxidant activities of initial extracts depends principally on phenolic compounds concentration although  $\gamma$ -oryzanol also contribute to this activity.

This process can be considered for the extraction of bioactive compounds with antioxidant activity for the agri-food or pharmaceutical industries, as they are free of toxic solvents.

On the other hand, it has been demonstrated that phenolic compounds are lightly transformed in digestion steps, but retaining part of its antioxidant activity in all phases. However,  $\gamma$ -oryzanol was not bioavailable to human in any step of *in vitro* process, probably due to its hydrolysis by acids and enzymes. Antioxidant activity is detected in gastric and small intestine steps, so other compounds were responsible for it.

**Capítulo 5.2 Cellulase-Assisted Extraction of Phenolic  
Compounds: Process optimization and characterization**



## 5.2 Cellulase-Assisted Extraction of Phenolic Compounds: Process optimization and characterization

### 5.2.1 Enzyme selection

Firstly, the three considered enzymes (cellulase, xylanase and  $\beta$ -galactosidase) were tested for the extraction of phenolic compounds under the conditions of use specified by the manufacturer. However, only cellulase enzyme showed the ability to increase the efficiency of extraction in rice bran (data not shown). Hence, it was decided to continue only with cellulase for the extraction of phenolic compounds from rice bran.

### 5.2.2 Optimization of the EAE of phenolic compounds with cellulase enzyme and antioxidant activity

#### Temperature influence

Firstly, the influence of temperature on the phenol extraction process was evaluated, maintaining as fixed conditions the pH of the buffer of 3.0, an extraction time of 4 hours, and the enzyme concentration of 0.5 % respect rice bran. Ferulic and *p*-coumaric acid content expressed as mg/100 g of bran is shown in Table 5.5. As it can be observed, a temperature increment involves an increase of phenolic content in control samples, reaching the maximum at 35 °C in ferulic acid. However, above this temperature a slight drop of phenolic compounds content is produced, which may be due, probably, to temperature induced degradation (Pinelo, Rubilar, Jerez, Sineiro, & Núñez, 2005). *p*-Coumaric acid was not significantly affected by temperature in control samples.

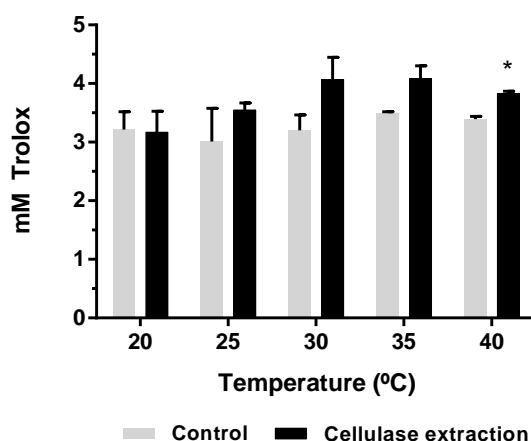
**Table 5.5.** Phenolic compounds concentration of rice bran extract obtained by using the enzyme cellulase at different temperatures

		<i>trans</i> -Ferulic acid (mg/100 g)			<i>p</i> -Coumaric acid (mg/100 g)		
		Control	Enzyme	Significance	Control	Enzyme	Significance
Temperature optimization	20 °C	1.78 ±	6.85 ±	0.0419	0.69 ±	0.88 ±	ns
		1.21b	0.91*		0.29	0.18	
	25 °C	3.62 ±	6.65 ±	ns	0.65 ±	1.06 ±	0.049
		0.03ab	1.10		0.05	0.13*	
	30 °C	3.87 ±	8.05 ±	0.046	1.56 ±	1.04 ±	0.029
0.05ab		1.05*	0.13		0.01*		
35 °C	4.56 ±	7.79 ±	0.008	0.82 ±	1.18 ±	ns	
	0.20a	0.34*		0.18	0.06		
40 °C	3.50 ±	8.43 ±	0.011	1.15 ±	1.08 ±	ns	
	0.53ab	0.48*		0.52	0.02		
	<b>Significance</b>	0.039	ns		ns	ns	

Mean ± standard deviation are presented. a-b: Different letters in the same column indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ). \* shows significant differences ( $t$  test  $p < 0.05$ ) between the enzyme-treated sample and the corresponding non-enzyme-treated control for each study temperature. ns indicates  $p > 0.05$

The use of cellulase was highly effective for the extraction of phenolic compounds, since in general a 100% increase the extraction yield was observed with respect to the control treatment, without enzyme, regardless of the temperature at which the process was carried out. This fact suggests that the hydrolysis produced by the enzyme released phenolic compounds retained in the cellular structures. In case of *p*-coumaric acid, the effect of the enzyme is much less pronounced, having an irregular behaviour compared to control. Many authors have obtained similar results, improving phenolic release of currant black (Landbo & Meyer, 2001), citrus peel (Li, Smith, & Hossain, 2006), or ginger (Nagendra Chari, Manasa, Srinivas, & Sowbhagya, 2013) when hydrolytic enzymes are used. On the other hand, the enzyme seems to have no influence on the amount of phenolic compounds extraction in apple peel (Pinelo, Zornoza, & Meyer, 2008). At the same time, it can be observed that the use of different temperatures does not imply significant differences when enzymatic extraction is performed.

After the phenolic measurement, antioxidant activity assay was carried out for each obtained extract. The antioxidant activity in mM of Trolox is presented in Figure 5.7. As can be observed, in control samples there was a slight increment of antioxidant activity but there were no significant differences with temperature increment. This fact indicates that phenolic increase due to an increase on the temperature do not involve higher antioxidant activity, and this might be caused by bioactivity lost (Pinelo et al., 2005). The same occurs in enzyme presence where the maximum is reached at 30-35 °C (4.08 and 3.83 mM of Trolox respectively) but without significant changes.



**Figure 5.7.** Antioxidant activity of rice bran extract obtained by using the enzyme cellulase at different temperatures. Mean  $\pm$  standard deviation are presented. \* shows significant differences (*t* test  $p < 0.05$ ) between the enzyme-treated sample and the corresponding non-enzyme-treated control.

So, it was decided to set the temperature at 35 °C to prevent degradation of the compounds at higher temperatures, as there were no significant differences in the concentrations of phenolic compounds obtained by adding enzyme.

#### *pH influence*

After assessing temperature influence and maintaining this parameter constant, at 35 °C, extracts obtained at different pH values were characterized. In Table 5.6 is presented the content of phenolic acids per 100 g of bran, depending on the established pH for each extraction, determined by HPLC. It can be observed that in control sample (without enzyme) it was produced an increment of the yield extraction until pH 6.0, value from which it remained constant in both phenolic compounds. However, with the use of enzyme the maximum extraction values for ferulic acid was obtained at the extreme pH values studied, that is, at pH 3 and 9. This fact shows that the pH is a critical factor in the enzyme assisted extraction of phenolic acid from rice bran.

**Table 5.6.** Phenolic compounds concentration of rice bran extract obtained by using the enzyme cellulase at different pH

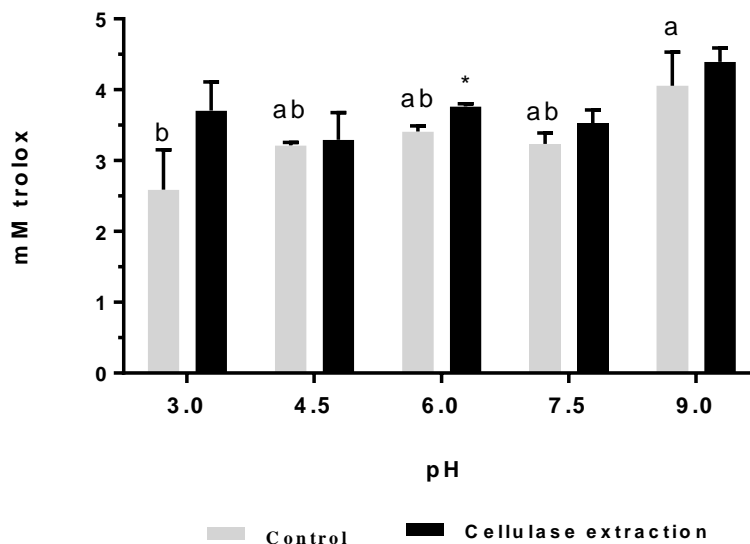
	<i>trans</i> -Ferulic acid (mg/100 g)			<i>p</i> -Coumaric acid (mg/100 g)			
	Control	Enzyme	Significance	Control	Enzyme	Significance	
<b>pH optimization</b>	<b>3</b>	3.49 ± 0.41b	9.93 ± 1.14a*	0.017	0.70 ± 0.13 b	1.16 ± 0.16 d	ns
	<b>4.5</b>	5.11 ± 0.17b	7.19 ± 0.64ab*	0.048	1.02 ± 0.05b	1.28 ± 0.04d*	0.0270
	<b>6</b>	14.44 ± 0.82a	5.94 ± 0.14b*	0.005	2.9 ± 1.2ab	2.47 ± 0.01c	ns
	<b>7.5</b>	12.52 ± 0.79a	7.04 ± 0.04ab*	0.0103	4.19 ± 0.65a	3.35 ± 0.10b	ns
	<b>9</b>	14.07 ± 0.05a	10.1 ± 1.4a*	0.058	4.04 ± 0.42a	4.29 ± 0.2a	ns
	<b>Significance</b>	<0,001	0.016		0.006	<0,001	

Mean ± standard deviation are presented. a-d: Different letters in the same column indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ). \* shows significant differences ( $t$  test  $p < 0,05$ ) between the enzyme-treated sample and the corresponding non-enzyme-treated control for each pH. ns indicates  $p > 0.05$

Mushtaq, Sultana, Anwar, et al., (2015) have observed that pH influenced decisively on amount of extracted phenolic compounds from pomegranate peel, being the optimal range between 5.5 and 6.5. Meanwhile, Vergara-Barberán, Lerma-García, Herrero-Martínez, & Simó-Alfonso, (2015) probed pH effect on enzymatic extraction of olive leaves protein, and observed small differences on total amount of protein in studied pH range (4.5-6).

Then, antioxidant activity analysis of extracts obtained in pH study was carried out. Figure 5.8 indicates mM of Trolox of extracts as function of pH. The higher values of

activity could be observed at pH 9.0 without enzyme. However, when cellulase was used, the highest values were obtained at 3.0, 6.0 and 9.0 (with 3.71, 3.76 and 4.39 mM of Trolox respectively).



**Figure 5.8** Antioxidant activity of rice bran extract obtained by using the enzyme cellulase at different pH. Mean  $\pm$  standard deviation are presented. a-b: Different letters in the same colour indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ). \* shows significant differences ( $t$  test  $p < 0.05$ ) between the enzyme-treated sample and the corresponding non-enzyme-treated control.

Regarding bioactivity, pH is a decisive factor because it is the variable that could have more influence in antioxidant activity. For example, at basic pH it can be observed an increment of antioxidant activity, due probably to high content of  $\text{OH}^-$ , which could interfere in deprotonation process of such compounds (Lemanska et al., 2001). This circumstance is postulated as one of the possible explanations to the discrepancies found between the increase in phenolic compounds (Table 5.6 and the antioxidant activity (Figure 5.8).

The analysis of the data obtained allowed us to fix the pH of 3.0 as the optimum for the extraction process.

#### *Time influence*

Subsequently, time influence was evaluated fixing temperature at 35 °C and pH at 3.0, so 4 intervals were assayed: 1, 2, 3 and 4 hours. In Table 5.7, it is shown the phenolic compounds content in 100 g of rice bran, determined by HPLC. As it can be seen, the ferulic acid content increased with the extraction time, both in control samples and in



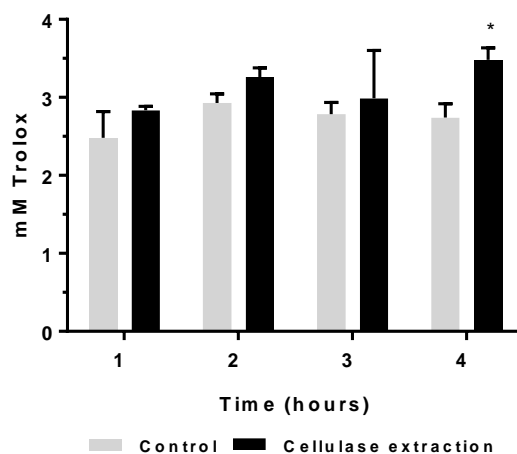
enzyme samples. When cellulase was used, a level of 260% was reached at 4 hours of extraction with respect to its control. For this, it can be concluded that 4 hours is the optimum time for the extraction. Regarding time influence, Li et al., (2006) also observed an increase on yield extraction of enzyme assisted extraction of phenolic compounds from citrus peel with time increment, reaching the maximum responses at 3-6 hours interval and no obtaining an improvement for longer times. Similarly, Mushtaq, Sultana, Bhatti, et al., (2015), found optimum values between 100 to 120 minutes.

**Table 5.7.** Extraction kinetics of the major phenolic compounds from rice bran with the enzyme cellulase

	<i>trans</i> -Ferulic acid (mg/100 g)			<i>p</i> -Coumaric acid (mg/100 g)			
	Control	Enzyme	Significance	Control	Enzyme	Significance	
<b>Time optimization</b>	<b>1 hour</b>	2.14 ± 0.53b	5.36 ± 0.68d*	0.033	0.56 ± 0.14	0.79±0.15	ns
	<b>2 hours</b>	3.61 ±0.52ab	8.41 ±0.27c*	0.007	0.64 ±0.08	1.31 ±0.26	ns
	<b>3 hours</b>	3.68 ±0.33ab	11.65 ± 0.39b*	0.002	0.66 ±0.13	1.59 ± 0.30	ns
	<b>4 hours</b>	4.29 ± 0.59a	15.4 ± 1.1a*	0.006	0.88 ±0.10	1.69 ±0.21*	0.040
	<b>Significance</b>	0.047	0.0005		ns	ns	

The determinations were conducted at 35 °C, at pH 3 and with 0.05 g of enzyme. Mean ± standard deviation are presented. a-d: Different letters in the same column indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ). \* shows significant differences ( $t$  test  $p < 0.05$ ) between the enzyme-treated sample and the corresponding non-enzyme-treated control for each time. ns indicates  $p > 0.05$

Figure 5.9 shows the antioxidant activity of the extracts obtained for the different times tested. It can be observed that there were no significant differences in control samples at different times, while with enzyme, at 4 hours it was appreciated a slightly higher value, that was significantly different (3.48 mM) compared to its control. This fact has to be taken into consideration, since not always an efficient extraction, with longer times, implies a higher bioactivity of extracts. The reason could be that these extracts may undergo oxidation phenomena (caused by greater exposure to light, oxygen,...), degradation or reaction with other molecules in the environment as a result of the extended extraction times (Ferrari, Maresca, & Ciccarone, 2011; Hercberg, Galan, Preziosi, Alfarez, & Vazquez, 1998; Pinelo et al., 2005). Results are in concordance with other studies, where at longer times, the amount of polyphenols is increased, but the antioxidant and antimicrobial activities decrease (Nicoli, Calligaris, & Manzocco, 2000; Pinelo, Manzocco, Nuñez, & Nicoli, 2004; Pinelo, Rubilar, Sineiro, & Nunez, 2004).



**Figure 5.9.** Antioxidant activity of rice bran extract obtained by using the enzyme cellulase at different times. Mean  $\pm$  standard deviation are presented. \* shows significant differences (*t* test  $p < 0,05$ ) between the enzyme-treated sample and the corresponding non-enzyme-treated control.

#### Enzyme concentration

Finally, as it was said above, the enzyme concentration was optimized, for which four different enzyme concentrations (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%) were tested, fixing the rest of extraction conditions, temperature of 35 °C, pH=3.0 and 4 hours of extraction. In Table 5.8, it is shown ferulic and coumaric acids content in mg/100 g of bran depending on the percentage of utilized enzyme.

**Table 5.8.** Phenolic compounds concentration of rice bran extract obtained by using the enzyme cellulase at different concentration

		<i>trans</i> -Ferulic acid (mg/100 g)	<i>p</i> -Coumaric acid (mg/100 g)
% enzyme optimization	<b>Control</b>	3.45 $\pm$ 0.91b	0.59 $\pm$ 0.14
	<b>0.5%</b>	12.27 $\pm$ 1.2a	1.90 $\pm$ 0.81
	<b>1%</b>	14.3 $\pm$ 2.2a	1.66 $\pm$ 0.25
	<b>1.5%</b>	13.3 $\pm$ 2.3a	1.67 $\pm$ 0.07
	<b>2%</b>	15.5 $\pm$ 1.3a	1.86 $\pm$ 0.03
	<b>Significance</b>	0.0041	0.0865

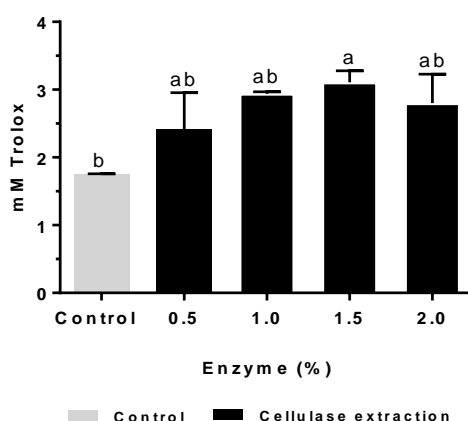
The experiments were conducted at 35 °C, at pH 3, during 4 hours. Mean  $\pm$  standard deviation are presented. a-b: Different letters in the same column indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ).

Ferulic acid content increased significantly in all enzyme concentration tested, achieving contents of approximately four times more. However, there were no significant

differences in the content of ferulic acid extracted for the different enzyme concentrations.

Mushtaq, Sultana, Anwar, et al., (2015) found that an enzyme concentration of 4.0% did not improve significantly yield extraction of phenolic antioxidant of pomegranate peel while Vergara-Barberán et al. (2015) proved that the protein content rised when the enzyme concentration increased to 5.0%; but for further increments, the protein content was decreased. Likewise, Li et al. (2006) observed an enhancement of extraction yield of phenolic compounds with the increase of enzyme, but in high concentrations, the phenolic concentration decreased. The reason of the increase is that the enzyme breaks the cellular wall and the extraction is more efficient, but when the cellules are broken, protein is released and can complex phenolic compounds (Li et al., 2006).

Finally, the antioxidant activity was determined for the extracts obtained in the study of the enzyme concentration. Figure 5.10 shows the concentration of Trolox (mM) depending on the concentration of enzyme cellulase used for extraction. It can be observed an increase in the antioxidant activity of the enzyme extracted samples with regard to the control sample. The rise was significant when the process of extraction was carried out with 1.0-1.5 % of cellulase (2.94 to 3.11 mM Trolox, respectively) compared to the control sample (1.75 mM Trolox).



**Figure 5.10:** Antioxidant activity of rice bran extract obtained by using the enzyme cellulase at different concentration. Mean  $\pm$  standard deviation are presented. a-b: Different letters in the same colour indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ).

Taking into account both, the results of total antioxidant compounds and antioxidant activity, we consider that the concentration of enzyme cellulase that offers the best results is 1%. Antioxidant activity of pomegranate peel obtained by Mushtaq, Sultana,

Anwar, et al. (2015) was evaluated by ABTS assay with Trolox as standard reference. In general, pretreated extracts showed better results as radical scavenging, when compared to the control. Kim & Lim (2016) determined the treatment effects of rice bran with different enzymes (Viscozyme, Termamyl, Celluclast, AMG, Ultraflo, y Pentopan) in the total phenolic content and the antioxidant activity of extracts, and they observed that enzyme treated extracts showed a significantly higher antioxidant activity, except for Vicozyme.

### 5.2.3 Conclusions

The enzyme-assisted extraction of phytochemicals from rice bran is intended to improve the extraction process with consequent improvements in economic performance and environmental preservation. Within the set of tested enzymes, only cellulase has been shown to be efficient for the extraction of phenolic compounds in rice bran. Optimal conditions for cellulase enzyme-assisted extraction were 35 °C, pH 3.0, 4 hours and 1.0 % de cellulase.

Factors such as pH, temperature and time extraction have influence in the yield of phenolic compounds extraction, but there was less influence on the antioxidant activity when the enzyme was used.

**Capítulo 5.3 Antioxidant and antimicrobial evaluation of rice bran (*Oryza sativa* L.) extract in a mayonnaise-type emulsion**



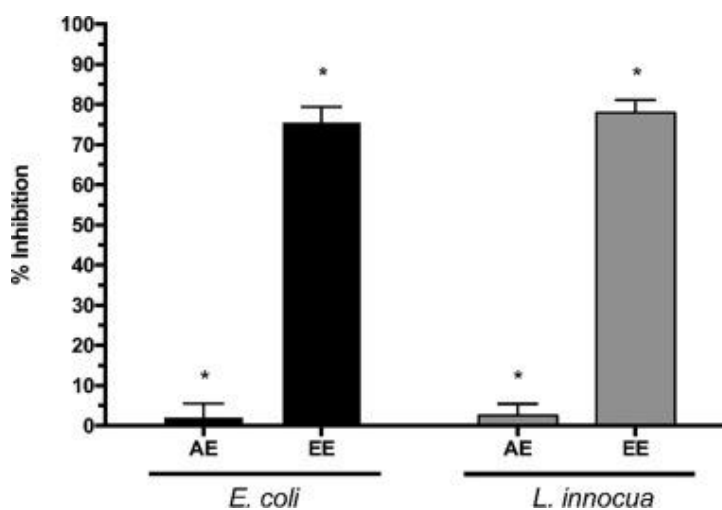
### 5.3 Antioxidant and antimicrobial evaluation of rice bran (*Oryza sativa* L.) extract in a mayonnaise-type emulsion

#### 5.3.1. Characterization of rice bran extracts

Two extracts were prepared from rice bran according to the methodology described by Martillanes, Ayuso-Yuste, Gil, Manzano-Durán, & Delgado-Adámez (2018). The aqueous extract (AE) had an amount of  $1.00 \pm 0.03$  mg *trans*-ferulic acid/g extract,  $0.19 \pm 0.02$  mg *p*-coumaric acid/g extract and  $0.079 \pm 0.002$  mg oryzanol/ g extract; while ethanolic extract (EE) had  $0.117 \pm 0.003$  mg *trans*-ferulic acid/g extract,  $0.058 \pm 0.007$  mg *p*-coumaric acid/g extract and  $13.6 \pm 2.6$  mg oryzanol/g extract. The AE chromatogram presents other compounds that have not been identified, but that are found in a much lower proportion.

The *in vitro* antioxidant activity of both AE and EE extracts was also measured, obtaining in both cases high values,  $51.2 \pm 3.9$  and  $13.6 \pm 2.6$  mg Trolox/g extract, respectively.

The *in vitro* antimicrobial activity results are shown in Figure 5.11. As it can be observed, *E. coli* and *L. innocua* were inhibited in a similar way in both extracts. Specifically, the EE sample showed the highest growth inhibition against *E. coli* and *L. innocua* (75.49 and 77.91%, respectively).



**Figure 5.11.** Antibacterial activity (% inhibition) of aqueous extract (AE) and ethanolic extract (EE) against *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. The results are showed as mean  $\pm$  sd.

\*Statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between the two extracts against the same microorganism (*t*-test).

On the contrary, the AE sample, with a high concentration of phenolic compounds, showed little antibacterial activity.

#### 5.3.2. pH evaluation of emulsions

The results of pH are shown in Table 5.9. As it is well known, the pH of mayonnaise plays an important role in its structure and stability (Depree & Savage, 2001); for that, the evolution of pH values in emulsions was measured. The initial values (t0) were around 5, and no significant differences were found between treatments at the beginning of the study. However, at the end of the storage (t1), significant differences were found among the pH values of the emulsions with different treatments, both at 4 °C and 20 °C. In all cases, it can be observed that pH values increased with time and temperature, but these differences were not significant in all treatments. The highest increases in pH values were for the treatments with AE at 0.5 and 2%, and with BHT at 2%.

**Table 5.9.** Changes in pH values of emulsions at t0 and after storage at t1.

pH	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2 %	BHT 0.5 %	BHT 2 %	<i>p</i> -value
t0	5.02 ± 0.10	5.04 ± 0.06C	5.07 ± 0.01B	4.96 ± 0.08B	5.08 ± 0.05	5.02 ± 0.05	5.05 ± 0.03B	ns
t1 4 °C	5.12 ± 0.04b	5.17 ± 0.01Bb	5.31 ± 0.00aA	5.10 ± 0.01bAB	5.11 ± 0.02b	5.07 ± 0.09b	5.10 ± 0.01bB	****
t1 20 °C	5.11 ± 0.11c	5.30 ± 0.03abA	5.43 ± 0.03aA	5.14 ± 0.07cA	5.14 ± 0.01c	5.15 ± 0.03c	5.21 ± 0.04bcA	****
<i>p</i> -value	ns	***	***	*	ns	ns	***	

AE = aqueous extract; EE = ethanolic extract; 0.5%, 2% = concentration of extract/additive in emulsion. t0 = analysis the day after preparation; t1 7 days of storage. Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n = 4. A, B, C Values represented with different letters in the same column are statistically different. a, b, c Values represented with different letters in the same row are statistically different. (Tukey test  $p < 0.05$ ). \*\*\*\* indicates  $P < 0.0001$ , \*\*\* indicates  $P < 0.001$ , \* indicates  $P < 0.05$ , ns indicates  $P > 0.05$

### 5.3.3. Instrumental colour of emulsions

Instrumental colour changes in mayonnaise-type emulsions are presented in Table 5.10. Lightness ( $L^*$ ) values were affected by the different additives at t0. AE at 0.5 and 2% decreased initial values of  $L^*$ , showing a significant difference between the latter and the control. On the other hand, BHT increased values of  $L^*$ , significantly in a 2% concentration. The addition of extract EE in 0.5 or 2% did not promote differences in  $L^*$  values. Samples stored at both temperatures, 4 °C and 20 °C, had a similar behaviour with respect to lightness than the initial ones, although emulsions stored at 4 °C generally presented higher values than those at 20 °C. Previous research have proved that lightness is related with droplet size in emulsions,  $L^*$  values increasing at a smaller size (Mun et al., 2009).

**Table 5.10.** Changes in instrumental colour parameters of emulsions at t0 and after storage t1.



L*	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2 %	BHT 0.5%	BHT 2 %	p-value
t0	91.10±0.20bcdB	90.53±0.37cB	88.74±0.20eAB	91.26±0.03bcB	90.27±0.65d	91.67±0.12abB	92.12±0.04a	****
t1 4 °C	92.28±0.23abA	91.36±0.16cA	89.17±0.07cA	91.93±0.13bA	90.65±0.23c	92.02±0.20bAB	92.55±0.18a	****
t1 20 °C	92.12±0.12aA	89.98±0.06bB	88.24±0.30cB	91.67±0.27aAB	90.25±0.14 b	92.09±0.17 aA	92.09±0.38a	****
p-value	***	***	**	**	ns	*	ns	
a*	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2 %	BHT 0.5%	BHT 2 %	p-value
t0	-2.02±0.15 ab	-1.83±0.10 bA	-1.38±0.06 cA	-2.06±0.03 ab	-2.11±0.17 aA	-2.03±0.04 abA	-1.98±0.05 abA	****
t1 4 °C	-1.99±0.02 a	-1.51±0.02 cB	-1.01±0.05 dB	-1.89±0.09 ab	-1.75±0.03 bB	-1.96±0.14 aAB	-1.89±0.07abAB	****
t1 20 °C	-1.87±0.02 a	-1.70±0.11 aA	-1.06±0.18 bB	-1.89±0.24 a	-1.53±0.09 aB	-1.68±0.18 aB	-1.78±0.10 aB	****
p-value	ns	*	*	ns	**	*	*	
b*	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2 %	BHT 0.5%	BHT 2 %	p-value
t0	6.25±0.10 cB	7.76±0.55 b	9.45±0.28 a	7.15±0.06 bcB	8.91±1.22 ab	6.72±0.11 bcB	6.73±0.04 bc	****
t1 4 °C	8.07±0.28cA	8.55±0.07b	10.03±0.02a	8.34±0.23Ab	10.35±0.07a	7.64±0.06dA	7.36±0.12d	****
t1 20 °C	8.01±0.12 bA	7.88±0.27 c	9.94±0.41 a	8.30±0.61 bA	10.25±0.11 a	7.79±0.47 cA	7.31±0.36 c	****
p-value	****	ns	ns	*	ns	*	ns	

AE = aqueous extract; EE = ethanolic extract; 0.5%, 2% = concentration of extract/additive in emulsion. t0= analysis the day after preparation; t1 7 days of storage. Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n=4. A,B Values represented with different letters in the same column are statistically different. a, b, c, d, e: Values represented with different letters in the same row are statistically different. (Tukey test P<0.05). \*\*\*\* indicates P<0.0001, \*\*\* indicates P<0.001, \*\* indicates P<0.01, \* indicates P<0.05, ns indicates P>0.05

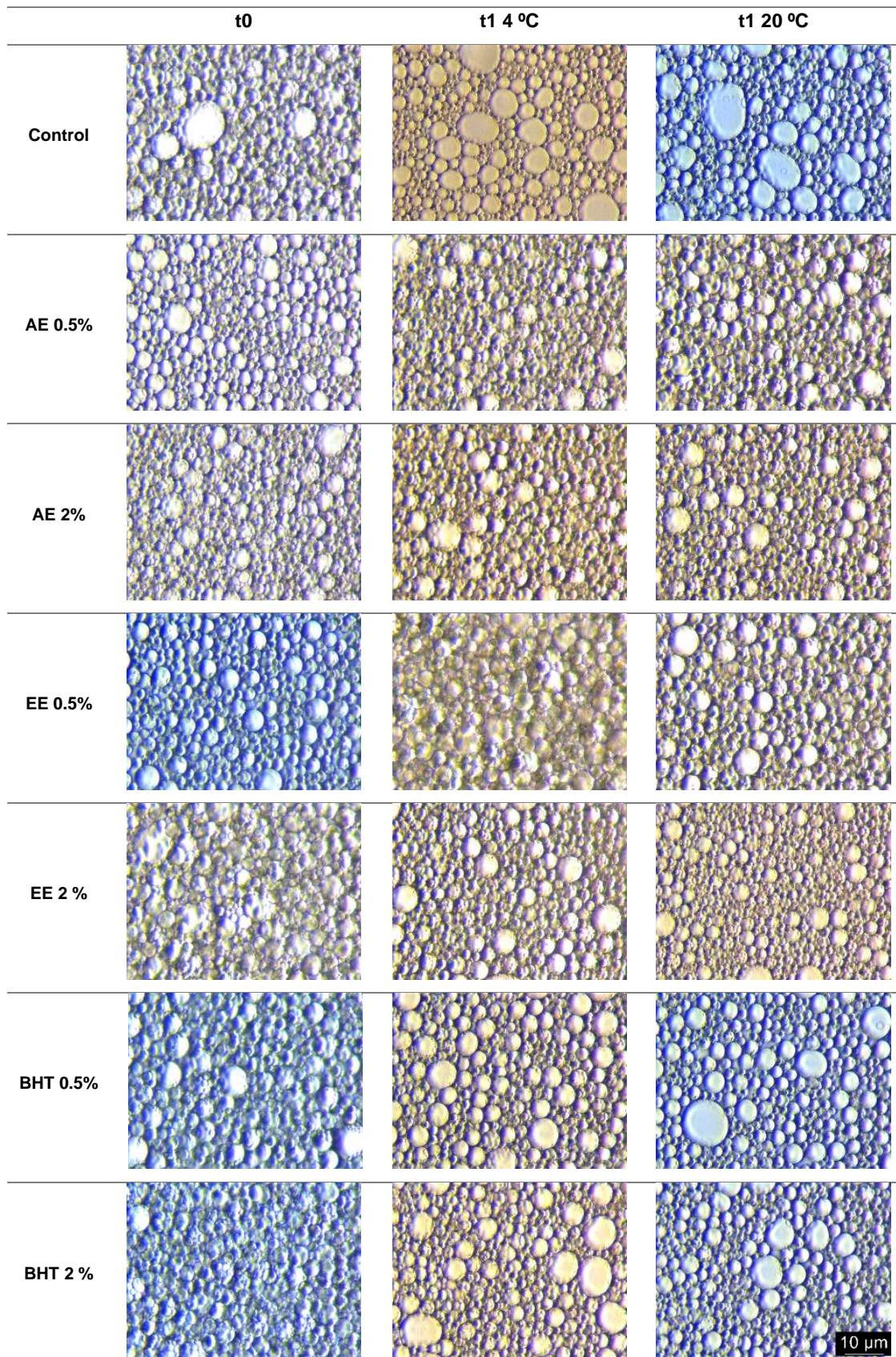
Coordinate a\* represents color position between the red/green axis. In mayonnaise-type emulsions, this is not a meaningful parameter, because of its whitish hue. In the control, redness at t0 was -2.02. As for lightness, the extracts affected the a\* values differently; AE at 2% decreased the value, while AE at 0.5%, EE and BHT did not affect this parameter. With respect to the storage, in all treatments except the control and EE at 0.5%, there was a decrease of the a\* value.

Finally, regarding coordinate b\* (representing color position between blue and yellow) at t0, samples ranged between 6.25 (control) and 9.45 (AE 2%), with intermediate values for the rest of the samples. Concerning storage, the value increased significantly in the control emulsion during storage, from 6.25 to 8.01, while in AE at 0.5 and 2%, EE and BHT at 2%, there were no significant changes. In the cases of EE and BHT at 0.5%, the changes were less pronounced than for the control.

#### 5.3.4. Microscopic analysis of emulsions

The microscopic images of samples confirm the structure of an oil/water emulsion (Figure 5.12). With regard to the size of emulsion particles, at t0, the control emulsion had the highest dispersion among different drop sizes, while the other samples showed more homogeneity. Throughout the storage, the irregularities of the control sample became more evident, mainly at the highest temperature, while the samples to which the

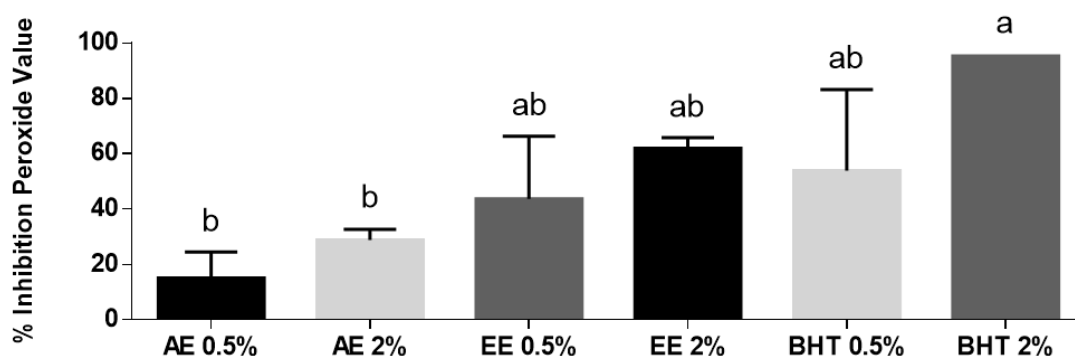
extracts were added maintained a more homogeneous structure. In the sample with 0.5% BHT after storage at 20 °C, droplets with a larger size were also observed as in the other treatments.



**Figure 5.12:** Microscopic images of emulsions (all figures are on the same scale). AE = aqueous extract; EE = ethanolic extract; 0.5%, 2% = concentration of extract/additive in emulsion. t0= analysis the day after preparation; t1 7 days of storage.

## 5.3.5. Peroxide value of emulsions

Figure 5.13 shows the results of the inhibition of peroxide value in the samples with the extracts in relation to the control at t1 and 20 °C. Results found at 4 °C fluctuated, probably due to the short time and the low temperature for the peroxide formation (data not shown). After the storage at 20 °C, as can be observed, all treatments reduced their oxidation process. A concentration of 2% of BHT inhibited the peroxide formation in >90% of cases, thus making it the most effective treatment. Samples with AE presented significantly lower values for this parameter at the two concentrations studied. The rest of treatments showed intermediate values of inhibition of oxidation.



**Figure 5.13:** Inhibition of Peroxide Value of emulsions at t1 and 20 °C. AE = aqueous extract; EE = ethanolic extract; 0.5%, 2% = concentration of extract/additive in emulsion a,b: different letters were statistically different. (Tukey test  $P < 0.05$ ).

## 5.3.6. Microbiological counts of emulsions

Table 5.11 shows the evolution of counts ( $\log \text{CFU g}^{-1}$ ) at t0 and t1 (4 °C) of total aerobic microorganisms (mesophilic and psychotrophs), *B. cereus*, *S. aureus*, coliforms bacteria, yeast and moulds in emulsions. Results showed the absence of pathogens *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in 25 g of emulsion at the beginning of storage.

**Table 5.11:** Microbiological counts (Log CFU g<sup>-1</sup>) of emulsions at t0 and t1.

Mesophilic	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2%	BHT 0.5 %	BHT 2 %	p-value
t0	3.6 ± 0.5 a	2.0 ± 0.2b	2.5 ± 0.5b	2.1 ± 0.6b	1.9 ± 0.3b	2.3 ± 0.5b	2.3 ± 0.2b	**
t1 4°	<1	1.5 ± 0.8	nd	nd	nd	nd	nd	-
p-value	-	ns	-	-	-	-	-	
Psychrotrophic	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2%	BHT 0.5 %	BHT 2 %	p-value
t0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
t1 4°	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
p-value	-	-	-	-	-	-	-	
<i>B. cereus</i>	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2%	BHT 0.5 %	BHT 2 %	p-value
t0	nd	1.7 ± 0.1	2.3 ± 0.2	nd	nd	nd	nd	-
t1 4°	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
p-value	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. aureus</i>	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2%	BHT 0.5 %	BHT 2 %	p-value
t0	<2	<2	<2	nd	nd	nd	nd	-
t1 4°	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
p-value	-	-	-	-	-	-	-	
Total coliform	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2%	BHT 0.5 %	BHT 2 %	p-value
t0	nd	nd	<1	nd	nd	nd	nd	-
t1 4°	nd	nd	<1	nd	nd	nd	nd	-
p-value	-	-	-	-	-	-	-	
yeasts and moulds	Control	AE 0.5%	AE 2%	EE 0.5%	EE 2%	BHT 0.5 %	BHT 2 %	p-value
t0	2.5 ± 0.1 aA	1.9 ± 0.1 a	1.9 ± 0.2 a	2.5 ± 0.4 a	1.0 ± 0.0 b	1.8 ± 0.1 a	2.5 ± 0.3 a	***
t1 4°	2.1 ± 0.2B	nd	1.9 ± 0.9	nd	nd	1.4 ± 0.3	<1	-
p-value	*	-	ns	-	-	ns	-	

AE = aqueous extract; EE = ethanolic extract; 0.5%, 2% = concentration of extract/additive in emulsion. t0= analysis the day after preparation; t1 7 days of storage. Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n=4. A,B Values represented with different letters in the same column are statistically different. a,b Values represented with different letters in the same row are statistically different. (Tukey test P<0.05). nd: not detected. <1 and <2: counts are higher than detection limit but not can be quantified, \*\*\* indicates P<0.001, \*\* indicates P<0.01, \* indicates P<0.05, ns indicates P>0.05

At t0, mesophilic counts reached 3.6 ± 0.5 log CFU g<sup>-1</sup> in the control sample, while in all treatments the microbial counts decreased significantly. At t1 counts were reduced, not being detectable in any of the treatments except in the control and AE at 0.5%.

No psychrotrophic microorganisms were detected at t0 or t1 in any of treatments tested, while coliforms were maintained below quantification limits. *B. cereus* was not found in any of the samples except in those prepared with AE at t0.

*S. aureus* was found in the control and AE samples at t0; however, the counts were lower than the quantification level. In all other treatments, the counts were not detected, exactly as for t1.

Finally, moulds and yeasts were quantified in all samples at the beginning of the experiment, finding that EE, at 2%, decreased significantly the count of those microorganisms. At t1, no counts were detected when AE (0.5%) and EE (0.5 and 2%) were applied, while in the control and the other samples, the decreases in population were less pronounced.

On the other hand, at t1 and 20 °C of storage, the counts of mould and yeast were higher than allowed by the hygienic-sanitary quality regulation, which establishes the upper limit at 102 CFU g<sup>-1</sup> (data not shown) for edible fats (Pascual & Calderón, 2000).

#### 5.3.7. Discussion

Despite of being an agroindustry waste, rice bran is valuable due to the fact that it possesses a large amount of phytochemicals, which can be extracted for its subsequent use in food, cosmetics, and in the pharmaceutical industry. In this research, two extracts enriched with different bioactive compounds were obtained and characterised. Among them, phenolic compounds, especially ferulic and *p*-coumaric acids, and  $\gamma$ -oryzanol, which were the most present in these extracts. These compounds have demonstrated to possess both antioxidant and antimicrobial *in vitro* activities, in accordance with previous research focused on the antioxidant capacity of rice bran of different varieties and their corresponding extracts (Zhang, Shao, Bao, & Beta, 2015).  $\gamma$ -Oryzanol is a unique mixture of steryl ferulates formed by esterification of the hydroxyl group of the sterols (i.e., stigmasterol, b-sitosterol, and campesterol) or triterpene alcohols (i.e., cycloartenol, cycloartanol, cyclobranol, and 24-methylenecycloartanol) with the carboxylic acid group of ferulic acid (Jeng et al., 2012). The difference that most likely affects the antioxidant efficiency of steryl ferulates is the presence or absence of methyl groups at C4. The mechanisms of the antioxidative action of the oryzanol are expected primarily by donating a hydrogen atom to interrupt a free radical chain reaction (Min, McClung, & Chen, 2011).

However, the antimicrobial activity of these compounds has been less studied. To the best of our knowledge, the antimicrobial effect of rice bran has only been studied in a medical context. Most recent estimates have indicated that at least 15 bioactive compounds of rice bran might contribute to its antimicrobial ability, which have been evaluated on a variety of bacteria. For instance, rice bran extract reduced the entry and replication *in vitro* of *Salmonella typhimurium* into a mouse's small intestinal epithelial

cells. Moreover, rice bran or its extracts inhibited the replication and/or colonization of *Clostridium* spp, (Komiyama et al., 2011) *Salmonella enterica* (Goodyear et al., 2015; Kumar et al., 2012), *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp. and *Escherichia coli* (Kondo et al., 2011). The results of our study show that in both extracts, the antimicrobial activity did not present differences between gram-negative and gram-positive microorganisms (*E. coli* and *L. innocua*, respectively), showing a remarkable activity in the extract that had a high  $\gamma$ -oryzanol concentration (EE).

Lipid oxidation affects the shelf life of food products by producing off-flavours as well as changes in colour, texture, and aroma, leading to reduced nutritional quality and safety of foods. In addition, the occurrence of specific oxidation products can adversely affect the bioactive food components, thereby deteriorating their functional properties as well as their water-holding capacity and the emulsifying ability of proteins (Naveena, Sen, Kingsly, Singh, & Kondaiah, 2008). In mayonnaise-type emulsions, it is believed that oxidation begins in the oil–water interphase, which in fact is a very interesting matrix for the study of the antioxidant properties of extracts. For that reason, a great number of studies have focused on this food (Ghorbani Gorji, Smyth, Sharma, & Fitzgerald, 2016). In this sense, the microscopic images of emulsions show that the structure does not get altered (de Sousa Guerra et al., 2017).

In general, yellowness and redness of all mayonnaise samples increased while lightness decreased in the samples stored at 4 °C and 20 °C. This indicated a darkening or browning effect. The colour changes might partly be due to the oxidative degradation of lipid on undesirable brown-coloured products. These results are in agreement with previously found instrumental colour values, since the yellowish hue can be related with the oxidation of the samples (Méndez-Cid, Lorenzo, Martínez, & Carballo, 2017). Although in this case we must take into account that this yellowish hue of extracts can be transferred to the samples, the control showed an increase of the coordinate  $b^*$ , which was attenuated in the samples with extracts, along with the oxidation reactions.

Oil-in-water emulsion, composed of small lipid droplets dispersed in an aqueous phase, are highly susceptible to the oxidative degradation of lipids due to water-soluble pro-oxidant agents (especially transition metals), and the exposure of oils to oxygen in the interfacial region, which is the contact region between the oil phase and the aqueous phase (Waraho, McClements, & Decker, 2011). In this study, the oxidation processes in mayonnaise-type emulsions have been attenuated by both extracts, EE and AE.

In contrast to the *in vitro* activity, the oxidation is largely prevented in the EE-enriched mayonnaises. A previous research using rice hull phenolic extract in a protein stabilized

oil-in-water emulsion (1-3% w/v of the emulsion) reported the ability of the extract to suppress lipid oxidation during a 2-week storage period. The treated samples had obviously lower peroxide and TBARS values compared with the control without the added extract. Moreover, the emulsion with the rice hull phenolic extract had lower TBARS than those observed in the emulsion with BHA (0.02% w/v of the emulsion) (Cheetangdee & Benjakul, 2016).

Another study (Tananuwong & Tewaruth, 2010) showed that phenolics extracted from black glutinous rice flour could delay the oxidative degree of a mayonnaise prepared using a mixture of soybean and fish oils with a ratio 3:1, especially at the highest concentration, as indicated by lower contents of conjugated diene hydroperoxides and TBARS during storage (30 °C for 1 month).

Considering a lipid-based food, Chotimarkorn, Benjakul, & Silalai, (2008) reported the ability of the rice phenolics to suppress lipid oxidation in tuna oil; during a storage period of 30 days, when compared with BHT (0.01% w/w), the tuna oil with an added methanolic extract of rice bran (0.025%–0.1% w/w) possessed obviously lower peroxide and p-anisidine values, in contrast with the control oil without the added extract, especially when increasing the concentrations of the extracts.

Generally, synthetic agents such as butylated hydroxytoluene (BHT), hydroxyanisole (BHA), butylated, and tert-butylhydroquinone (TBHQ) are used commercially. Nonetheless, the safety of these synthetic agents is questionable due to their carcinogenic effects, as reported in laboratory animals and primates (Shahidi, Janitha, & Wanasundara, 1992). In this study, the use of rice bran extracts in mayonnaises could uphold lipid oxidation levels in the emulsion with values comparable to those of BHT at 2%.

The oxidative stability of the emulsion is highly influenced by its polarity and that of the antioxidant extracts. In this regard, phenolic compounds have a suitable polarity for the diffusion from the aqueous phase of an emulsion to the oil–water interfaces, achieving a higher oxidative stability (Amaro-Blanco, Delgado-Adámez, Martín, Ramírez, et al., 2018; Cheetangdee & Benjakul, 2016).

Moreover,  $\gamma$ -oryzanol from rice bran extract could exert an antimicrobial action in patties due precisely to its solubility and subsequent diffusion in the fat of the burger, thereby improving its preservation (Leheska et al., 2006).

Very little literature has been found on the prevention of microorganism growth in mayonnaise. Although in this type of food matrix, the bacterial growth is of little



relevance, the application of both AE and EE rice bran extracts could possibly even decrease it.

This allows us to affirm that the storage of the extract at refrigeration temperatures causes a decrease in the initial microbial populations, with the exception of moulds and yeasts, which after storage appear on the mayonnaise-type emulsion surface. This last effect causes the rejection of the consumer and makes the product unconsumable by humans.

#### 5.3.8. Conclusion

In this paper, an emulsion is found to be very interesting as a food model to evaluate the antioxidant and antimicrobial capacity of two rice bran extracts. The ethanolic extract has proven to be the most effective in both aspects, preventing the oxidation and the growth of some microorganisms. Therefore, it is proposed as a viable alternative as a food additive to ensure food quality and safety, together with other conservation treatments.



**Capítulo 5.4 Effect of rice bran extract on the preservation of  
pork burger treated with high pressure processing**



## 5.4 Effect of rice bran extract on the preservation of pork burger treated with high pressure processing

### 5.4.1 Characterization of RBE

The RBE used for the manufacture of burgers was analyzed following the methods previously described and their performance was previously optimized (Martillanes et al., 2018). The concentration of phenolic compounds was  $0.057 \pm 0.007$  mg/g of p-coumaric acid and  $0.117 \pm 0.001$  mg/100 g of ferulic acid, and the content of total  $\gamma$ -oryzanol, the majority component, was  $14.4 \pm 0.3$  mg/g of RBE. Results were similar to those reported in rice bran by Lai, Li, Lu, & Chen, (2009), Iqbal et al., (2005) and Proctor & Bowen, (1996).

### 5.4.2 Microbiological analysis of burgers

The evolution of counts (log CFU g<sup>-1</sup>) of total aerobic microorganisms (mesophilic and psychotrophics), LAB, and *E. coli* in burgers are shown in Tables 5.14 and 5.15. According to the Codex Alimentarius recommendations, burgers were within shelf-life throughout all storage period. Results showed the absence of pathogens (*L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in 25 g of meat) analyzed at the beginning of storage, so they were not again analyzed during the following days of storage.

**Table 5.14.** Microbiological counts (Log CFU g<sup>-1</sup>) of raw burgers treated with rice bran extract (RBE), with and without high pressure processing (HPP) at day 1.

Percentage		0%	0.5%	1%	2%	Significance
Mesophilic	Control	4.83±0.30x	4.64±0.13x	4.69±0.22x	4.55±0.022x	ns
	HPP	3.90±0.26y	3.68±0.06y	3.52±0.49y	3.48±0.16y	ns
	Significance	**	****	**	***	
Psychrotrophic	Control	4.70±0.14	4.60±0.18	4.54±0.17	4.61±0.17	ns
	HPP	<1	<1	<1	<1	-
	Significance	-	-	-	-	
LAB	Control	2.96±0.68	3.22±0.57	3.05±0.46	3.11±0.96	ns
	HPP	<1	<1	<1	<1	-
	Significance	-	-	-	-	

CFU: Colony Forming Units; LAB: Lactic Acid Bacteria. Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n=4. Values represented with different letters in the same column are statistically different. (Tukey test <0.05). ns P > 0.05, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01 \*\*\* P ≤ 0.001, \*\*\*\* P ≤ 0.0001 <1 and <2 log CFU g<sup>-1</sup> means below the detection limit of the method.

**Table 5.15.** Microbiological evolution (log CFU g<sup>-1</sup>) in high pressure processed (HPP) burger in refrigeration.

Percentage		0%	0.5%	1%	2%	Significance
Mesophilic	T0	3.90±0.26	3.68±0.06	3.52±0.49	3.48±0.16	ns
	T1	4.75±0.86	4.69±1.13	4.15±0.53	3.64±0.16	ns
	T2	4.75±0.14	4.13±0.80	4.22±0.34	3.66±0.20	ns
	<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	
Psychrotrophic	T0	<1	<1	<1	<1	-
	T1	<1	<1	<1	<1	-
	T2	3.77±0.86	4.67±1.49	5.18±0.52	3.26±0.81	ns
	<b>Significance</b>	-	-	-	-	
LAB	T0	<1	<1	<1	<1	-
	T1	2.26±1.93	1.25±1.66	1.37±1.72	<1	ns
	T2	3.77±1.54	3.92±0.73	1.48±1.73	<1	**
	<b>Significance</b>	-	-	-	-	

CFU: Colony Forming Units; LAB: Lactic Acid Bacteria. Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n=4. ns P > 0.05, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01. Day 1 (T0), day 14 (T1), day 21 (T2). <1 and <2 log CFU g<sup>-1</sup> means below the detection limit of the method.

Initial aerobic counts in control burgers (without HPP or RBE, day 1) reached 4.83 log CFU g<sup>-1</sup> in the case of mesophilic bacteria and 4.70 log CFU g<sup>-1</sup> in the case of psychrotrophic bacteria. In both cases, these values slightly decreased while the amount of RBE was increased, although no significant differences were found. Similarly, no significant differences were found among control and burgers with RBE in the counts of LAB. *S. aureus*, *E. coli*, and *C. perfringens* were below the detection limits (data not shown).

With regard to HPP, this technology was very effective for the reduction of all microbiological groups. Mesophilic bacteria were significantly reduced after HPP in burgers with different levels of RBE. Similarly, psychrotrophic bacteria and LAB were reduced below the detection limit of the method. At day 1, *S. aureus*, *Clostridium*, and *E. coli* were analyzed in all treatments, finding that the counts were below the limit of detection in all cases (data not shown).

Table 5.15 shows the evolution of microbial counts of burgers with RBE after HPP, throughout the time of storage. First, it can be observed that at T1, mesophilic microorganisms count increased for control burgers compared to T0, while this increase was less pronounced in the case of samples treated with different concentrations of the extract (having the lower counts the burger group with a 2% of RBE, the highest concentration tested). This decrease was not statistically significant. In all other analyzed

microorganisms, the counts were below detection limits except on LAB, that reached 2.26 log CFU g<sup>-1</sup>, meaning that RBE had antimicrobial effect being the 2% treatment below detection limits.

At T2, it can be observed a similar effect to T1 in mesophilic and LAB. In addition, the count of psychrotrophic bacteria showed an irregular behavior against the different concentration of extracts. The counts of the rest of microorganisms are under limits of detection during total storage time.

The antimicrobial activity of other vegetables and agroindustry remnants have been demonstrated mostly *in vitro* in a number of studies (Guil-Guerrero et al., 2016). Many information is available for meat products too: Andres, Petron, Delgado-Adamez, Lopez, & Timon, (2017a) showed that some extracts obtained from the agri-food industry by-products could be used in lamb burgers to increase the shelf-life of the product. The effect of RBEs have been demonstrated in a mayonnaise-type emulsion (Martillanes, Rocha-Pimienta, Victoria Gil, Ayuso-Yuste, & Delgado-Adámez, 2020). Nevertheless,  $\gamma$ -oryzanol enriched extracts had not been used previously for the improvement of shelf-life of meat products to the best of our knowledge. In our research, LAB were the most affected microorganisms. This can be due to the effect of phenolic compounds and  $\gamma$ -oryzanol in these bacteria. Phenolic compounds can affect the growth of LAB. It has been suggested that phenolic compounds can be activators or inhibitors of bacterial growth depending on their chemical structure and concentrations (Pacheco-Ordaz et al., 2018).

High pressure processing has been previously proved to decrease the microorganisms' counts in meat products. Rodrigues et al., (2016) demonstrated that 600 MPa could inactivate until six log cycles of *L. innocua* and *E. faecium* in a marinated beef. Moreover, Garriga, Grèbol, Monfort, & Hugas, (2004) demonstrated that HPP at 600 MPa was an efficient method for avoiding the growth of yeasts and Enterobacteriaceae and also that the treatment reduced the safety risks associated with *Salmonella* and *L. monocytogenes* in sliced marinated beef loin. The present research agrees with these authors.

Finally, some authors have reported the effects of HPP combined with other methods like modified atmospheres, (Al-nehlawi, Guri, Guamis, & Saldo, 2014; Kameník, Saláková, Hulánková, & Borilova, 2015) or essential oils (Espina, García-Gonzalo, Laglaoui, Mackey, & Pagán, 2013) on the inactivation of microorganism in food models.

## 5.4.3 Chromatic parameters of burgers

Table 5.16 shows results of chromatic parameters measured in burgers at Day 1. The inclusion of RBE in burgers modified its chromatic parameter, specifically the lightness (CIE L\*) of burgers with 2% of RBE was increased. In addition, CIE b\* or the yellowness of the burgers were also increased with the addition of RBE, especially at 2%. This fact could be associated to the yellowish tone of the extract. Therefore, burgers with RBE were lighter and more yellow than control burgers. The modifications of chromatic parameters could have a negative effect in the appearance of burgers, which could affect the attractiveness of burger at the purchase moment. High pressure-treated burgers showed also changes in chromatic parameter similar to those found for fresh burgers.

**Table 5.16.** Chromatic parameters measured in control and high hydrostatic processed (HPP) burgers with different percentages of extract at day 1(T0).

Percentage		0%	0.5%	1%	2%	Significance
CIE L*	Control	54.2±0.6by	55.2±0.9aby	54.1±1.1by	56.8±1.1ay	**
	HPP	62.6±0.9bx	62.8±1.1abx	63.7±0.6abx	64.3±0.3ax	*
	Significance	****	****	****	****	
CIE a*	Control	4.2±0.2x	4.2±0.6x	4.3±0.2x	4.3±0.3x	ns
	HPP	3.3±0.3y	2.7±0.5y	2.7±0.3y	2.8±0.1y	ns
	Significance	**	**	****	****	
CIE b*	Control	10.7±0.3yc	11.4±0.3xb	11.4±0.4b	12.5±0.4xa	****
	HPP	11.1±0.2xab	10.6±0.4yb	10.9±0.5ab	11.5±0.3ya	*
	Significance	*	**	ns	**	
Chroma	Control	11.5±0.2c	12.2±0.2xb	12.2±0.3xb	13.3±0.3xa	****
	HPP	11.5±0.2ab	10.9±0.5yb	11.2±0.5yab	11.8±0.3ya	*
	Significance	ns	**	**	***	
Hue	Control	68.5±0.8y	69.7±2.6y	69.3±1.4y	70.9±1.4y	ns
	HPP	73.5±1.7x	75.9±1.9x	76.1±1.7x	76.6±0.4x	ns
	Significance	**	**	***	***	

Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n=4. x,y Values represented with different letters in the same column are statistically different. a,b, c Values represented with different letters in the same row are statistically different.(Tukey test <0.05). ns P > 0.05, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01 \*\*\* P ≤ 0.001, \*\*\*\* P ≤ 0.0001

The application of HPP increased L\* values and decreased a\* values of raw burgers (p < 0.05). This fact has been reported in previous studies (Bak, Bolumar, Karlsson, Lindahl, & Orlien, 2019). The discolouration of meat could be induced by the denaturation of myoglobin, displacement or release of heme, and oxidation of oxymyoglobin (MbO<sub>2</sub>) to metmyoglobin (MetMb) (Suman & Joseph, 2013) during HPP, and RBE did not inhibit color changes due to this process.



The parameter hue is not affected by the inclusion of extract or by HPP.

Chromatic parameters changes of HP processed burgers manufactured with different levels of RBE during storage are shown in Table 5.17. The lightness values ( $L^*$ ) increased significantly with the addition of RBE, keeping the values constant over time evaluated. The parameter  $L^*$  in HP-treated meat is linked to the proteins denaturation and recombination and as a result meat becomes opaque and whitish.

**Table 5.17.** Evolution of instrumental colour measured in high pressure processed burgers.

Percentage		0%	0.5%	1%	2%	Significance
<b>CIE <math>L^*</math></b>	<b>T0</b>	62.6±0.9b	62.8±1.1ab	63.7±0.6xab	64.3±0.3a	*
	<b>T1</b>	61.5±0.5c	62.7±0.6ab	62.0±0.4ybc	63.1±0.6a	**
	<b>T2</b>	61.3±0.7b	62.4±0.4ab	62.7±1.1xyab	63.7±1.0a	*
	<b>Significance</b>	ns	ns	*	ns	
<b>CIE <math>a^*</math></b>	<b>T0</b>	3.3±0.3x	2.7±0.5x	2.7±0.3x	2.8±0.1x	ns
	<b>T1</b>	2.0±0.5by	2.1±0.3xyab	2.1±0.1by	2.6±0.1axy	*
	<b>T2</b>	1.6±0.3cy	1.9±0.2ybc	2.1±0.2aby	2.4±0.2ay	***
	<b>Significance</b>	***	*	*	*	
<b>CIE <math>b^*</math></b>	<b>T0</b>	11.0±0.2ab	10.6±0.4b	10.9±0.5ab	11.5±0.3ay	*
	<b>T1</b>	11.5±0.8	11.3±0.5	11.3±0.6	12.1±0.2x	ns
	<b>T2</b>	11.1±0.4	11.1±0.7	11.6±0.3	11.9±0.4xy	ns
	<b>Significance</b>	ns	ns	ns	*	
<b>Chroma</b>	<b>T0</b>	11.5±0.2ab	10.9±0.5b	11.2±0.5ab	11.8±0.3ay	*
	<b>T1</b>	11.7±0.8	11.5±0.3	11.5±0.6	12.4±0.2x	ns
	<b>T2</b>	11.2±0.4b	11.3±0.7ab	11.8±0.3ab	12.1±0.4axy	*
	<b>Significance</b>	ns	ns	ns	*	
<b>Hue</b>	<b>T0</b>	73.5±1.7	75.9±1.9	76.1±1.7	76.6±0.4	ns
	<b>T1</b>	80.0±1.6	79.6±1.6	79.7±0.3	77.8±0.2	ns
	<b>T2</b>	81.8±1.7a	80.2±1.0ab	79.6±0.8ab	78.3±0.8b	**
	<b>Significance</b>	***	**	**	**	

Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n=4. x,y Values represented with different letters in the same column are statistically different. a,b,c Values represented with different letters in the same row are statistically different. (Tukey test <0.05). Day 1 (T0), day 14 (T1), day 21 (T2). ns  $P > 0.05$ , \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$

The parameter  $a^*$  significantly decreased as the storage time was increased although this effect was less pronounced in samples with 1% and 2% of RBE. This parameter could be an important factor in the decision to purchase meat or meat products. The red color in meat is related to myoglobin, the major pigment on meat. We suggest that the incorporation of RBE improved the myoglobin stability during refrigerated storage, avoiding losses of red color in HPP burgers. The parameter  $b^*$  and Chroma were not modified during storage. Only when the levels of the RBE were at 2% in the burgers,

these parameters showed significant differences during storage, it could be due to the yellowish tone of the extract. Regarding Hue, a significant increase during storage was found in all groups. Values were lower when the RBE was increased. Bajovic, Bolumar, & Heinz, (2012) described changes in chromatic parameters similar to ours, with increases of CIE L\* and reductions of CIE a\* at pressures between 200 and 500 MPa. HPP induced meat discolouration and a loss of red color in pork.

#### 5.4.4 Lipid and protein oxidation in burgers

Lipid and protein oxidation values of control and high-pressure treated burgers in Day 1 are shown in Table 5.18. In case of lipid oxidation, no significant differences ( $p > .05$ ) were found due to the addition of RBE in burgers or due to the effect of HPP. Furthermore, no significant differences ( $p > 0.05$ ) were found between lipid oxidation of control and HPP burgers, although the values for HPP were, in general, lower. Analogously, protein oxidation was analyzed, and it was found that RBE was highly effective in the prevention of oxidation in burgers. The effect was proportional to the amount of extract, decreasing the protein oxidation from  $2.2 \pm 0.2$  nmol carbonyls/mg protein at 0% to  $0.8 \pm 0.2$  with the addition of 2% of RBE. In the case of HP treated burgers, RBE works in opposite way, being 1% and 2% the treatments with higher values of oxidation. Therefore, it would be interesting to add 0.5% of RBE according to this parameter.

**Table 5.18.** Changes of oxidation after high pressure processed (HPP) in burgers with different percentage of extract at day 1

Percentage		0%	0.5%	1%	2%	Significance
TBARS <sup>1</sup>	Control	0.10±0.04	0.13±0.05	0.08±0.01	0.13±0.01	ns
	HPP	0.06±0.02	0.08±0.03	0.09±0.02	0.10±0.03	ns
	<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	
Protein Oxidation <sup>2</sup>	Control	2.2±0.2ax	1.6±0.1bx	1.2±0.2c	0.8±0.2dy	****
	HPP	1.2±0.2by	1.3±0.1by	1.7±0.5ab	2.7±1.0ax	**
	<b>Significance</b>	***	**	ns	**	

Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n=4.x,y Values represented with different letters in the same column are statistically different. a,b,c Values represented with different letters in the same row are statistically different.(Tukey test <0.05). ns  $P > 0.05$ , \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$  \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ . <sup>1</sup>mg MDA Kg<sup>-1</sup>, <sup>2</sup>nmol carbonyls/mg protein

The study of the evolution of lipid and protein oxidation over time was done in HPP burgers. In this study (Table 5.19), no significant differences were found due to the addition of RBE at T0, T1, and T2. However, in burgers without RBE lipid oxidation values significantly increased while the addition of RBE maintained the levels of lipid oxidation

similar to those at the beginning of storage. This fact could be associated to the antioxidant effect of the RBE as other authors have also reported (Lai et al., 2009). The findings of the current study are consistent with those of Kim et al., (2003) who found that TBARS values of refrigerated cooked beef was lower when it was added 100 ppm of -oryzanol, main component of the RBE.0.5% of RBE according to this parameter.

**Table 5.19.** Changes of oxidation of high pressure (HP) treated burgers with different rice bran extract (RBE) content over time

Percentage		0%	0.5%	1%	2%	Significance
TBARS <sup>1</sup>	T0	0.06±0.02y	0.08±0.03	0.09±0.02	0.10±0.03y	ns
	T1	0.12±0.05xy	0.09±0.03	0.13±0.04	0.16±0.04x	ns
	T2	0.13±0.02x	0.10±0.03	0.14±0.04	0.10±0.03y	ns
	Significance	*	ns	ns	ns	
Protein Oxidation <sup>2</sup>	T0	1.2±0.2by	1.3±0.1by	1.7±0.5aby	2.7±1.0a	***
	T1	1.3±0.2by	1.4±0.3by	2.9±0.9ax	2.8±0.6a	***
	T2	6.5±0.7ax	2.3±0.6bx	2.0±0.3bxy	1.9±0.6b	****
	Significance	****	**	*	ns	

Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD), n=4. x,y Values represented with different letters in the same column are statistically different. a,b Values represented with different letters in the same row are statistically different. (Tukey test <0.05). Day 1 (T0), day 14 (T1), day 21 (T2). ns P > 0.05, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01, \*\*\* P ≤ 0.001, \*\*\*\* P ≤ 0.0001. <sup>1</sup>mg MDA Kg<sup>-1</sup>, <sup>2</sup>nmol carbonyls/mg protein

Protein oxidation results are in consonance with lipid oxidation changes. At T0 and T1 of storage values of burgers with 1% and 2% of RBE were higher than those manufactured with 0% and 0.5% of RBE. However, those burgers with 0% and 0.5% of RBE showed and important increase of protein oxidation values during storage while burgers with 1% and 2% of RBE showed values similar to those at the beginning of storage. This fact could indicate that the RBE had an antioxidant effect on proteins at long term storage.

The novelty tendencies are finding in natural sources compounds with antioxidant effect of potential use applied into the meat to prevent undesirable lipid oxidation changes. For this purpose, bee pollen, cocoa and grape seed, or pomegranate peel extracts are used in meat successfully for prevent lipid oxidations (Martillanes et al., 2017). In the same way, other bran have been used for food improvement (Li et al., 2019; Xue et al., 2019).

It has been reported that values above 300 MPa increase the values of TBARS in meat products (Medina-Meza, Barnaba, & Barbosa-Cánovas, 2014). However, in our study values of TBARS of the treated samples have no significant differences with control, being even lower at T0. This could be due to the protective effect of RBE. Regarding

oxidation, Ma, Ledward, Zamri, Frazier, & Zhou, (2007) showed that the oxidation stabilities of beef, chicken and processed meat products from HP treatment were different because their compositions were different.

Very little was found in the literature about the prevention of protein oxidation with natural extracts. In general, lipid and protein oxidation keep a certain correlation. A previous study showed the effects of avocado seed or black currant extracts on the lipid and protein oxidation in meat products (Jia, Kong, Liu, Diao, & Xia, 2012; Rodríguez-Carpena, Morcuende, & Estévez, 2011).

If these data of protein oxidation are being compared with those obtained in the analysis of instrumental color, it can be observed a slight correlation between protein oxidation and parameter  $a^*$ , linked to the red color of the meat. Redness is related to myoglobin content and its chemical state in meat. The oxidative state of muscle pigments has an important role on the color of meat, so the relative proportions of the three forms of myoglobin—deoxymyoglobin (Mb), MbO<sub>2</sub>, and MetMb—determine more red, brown, or grey color of meat. The development of oxidation processes causes a discoloration of meat during the storage. Therefore, a decrease of  $a^*$  during the storage implies a reduction of oxymyoglobin content, the main pigment responsible for the red color of fresh meat. Other slight correlation was also found between lipid oxidation and hue. Lipid oxidation is often closely related to myoglobin oxidation (Hunt et al., 2012), is for that these two related parameters (lipid oxidation and hue angle) that an increase in hue angle imply a decolouration of meat.

#### 5.4.5 Sensory analysis

Results of the sensory analysis of the burgers are presented in Table 5.20. All the parameters analyzed did not show significant differences due to the addition of extracts into the burgers except the level of unpleasant taste, in which control samples had a value of 0.02 in 0% of RBE and a maximum value of 1.8 in 1% and 2% of RBE. These differences disappeared when treatment with HPP was applied, and no significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between treatments. For this reason, all the concentrations of RBE were considered for the subsequent analyses carried out (at T1 and T2). Regarding the effect of HPP in the sensory characteristics of burgers, panellist did not notice significant differences ( $p < 0.05$ ) between control and HPP burgers. Thus, after cooking, previously reported difference in other parameters such as color were not appreciated at sensory level. The instrumental color differences found in fresh burgers disappeared once the meat was cooked.

**Table 5.20.** Result of sensory analysis in control and high pressure processed burgers with different concentrations of RBE

		0%	0.5%	1%	2%	Significance
<b>Colour</b>	Control	4.1±1.4	3.0±1.2	4.1±1.8	4.1±1.8	ns
	HPP	2.9±1.7	3.9±1.6	3.1±1.7	3.7±1.7	ns
	Significance	ns	ns	ns	ns	
<b>Odour</b>	Control	4.8±1.5	4.6±1.7	4.5±1.4	4.3±1.3	ns
	HPP	5.2±1.6	4.7±1.8	4.3±1.9	4.8±1.6	ns
	Significance	ns	ns	ns	ns	
<b>Taste of cooked meat</b>	Control	5.7±1.5	4.4±1.8	4.7±1.4	5.3±1.3	ns
	HPP	5.3±1.3	5.2±1.8	4.6±1.7	4.8±2.0	ns
	Significance	ns	ns	ns	ns	
<b>Salty taste</b>	Control	4.0±2.0	3.1±1.9	3.8±1.8	3.5±2.0	ns
	HPP	3.3±1.7	3.2±1.8	3.1±1.9	3.0±1.9	ns
	Significance	ns	ns	ns	ns	
<b>Spicy taste</b>	Control	3.4±2.3	2.6±1.8	2.8±2.0	3.8±2.4	ns
	HPP	2.3±1.5	2.6±2.2	2.5±1.9	3.0±2.5	ns
	Significance	ns	ns	ns	ns	
<b>Unpleasant taste</b>	Control	0.02±0.08b	0.40±0.73ab	1.8±2.5a	1.8±2.0a	**
	HPP	0.01±0.03	1.5±2.7	1.3±2.0	0.9±1.6	ns
	Significance	ns	ns	ns	ns	
<b>Juiciness</b>	Control	4.8±1.4	5.3±1.1	4.5±1.7	4.0±1.7	ns
	HPP	5.2±1.5	4.8±1.7	4.6±1.7	4.5±1.7	ns
	Significance	ns	ns	ns	ns	
<b>Hardness</b>	Control	3.4±1.7	3.2±2.0	3.6±1.7	3.9±1.8	ns
	HPP	4.0±1.8	4.2±1.7	3.6±1.9	4.1±2.1	ns
	Significance	ns	ns	ns	ns	

Results are expressed as MEAN ± standard deviation (SD). a,b Values represented with different letters in the same row are statistically different.(Tukey test <0.05). ns P > 0.05, \* P ≤ 0.05, \*\* P ≤ 0.01

Although differences were not significant, some panellists detected the presence of unpleasant tastes, maybe due to the presence of the extract at high concentrations that could be negative for the commercialization of this extract to preserve burgers, since it could induce a rejection of the product. The RBE was effective to preserve burgers at lower levels than those perceived by panellists such as 0.5%, so we would recommend that dosage at that levels.

#### 5.4.6 Conclusion

In conclusion, RBE could be potentially used as natural additives due to their antioxidant effect which could increase the stability of pork burgers during the refrigerated storage. It has been observed that meat treated with a 1% and 2% of RBE was able to remain

within shelf-life with lipid and protein oxidation values significantly lower than the control, not being significantly detected by the panellist when the meat is treated by HPP. However, the extract was not sufficiently effective to prevent microbial growth on the burgers during the storage. In contrast, HPP was very effective to inactivate microorganisms and increase the shelf-life of burgers, which in this case could be of 21 days at least. The combination of both effects could be effective to prevent microbial and oxidative development therefore allowing the manufacture of meat burgers with natural additives and with an extended shelf-life.

**Capítulo 5.5 Effect of an active packaging with rice bran extract  
and high-pressure processing on the preservation of sliced  
dry-cured ham from Iberian pigs**





## 5.5 Effect of an active packaging with rice bran extract and high-pressure processing on the preservation of sliced dry-cured ham from Iberian pigs

### 5.5.1 Effect on microbiological changes of sliced Iberian dry-cured ham

The microbiological changes of sliced Iberian dry-cured ham with different treatments during storage are shown in Table 5.21. The presence of pathogens and food spoilage organisms such as *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *C. perfringens* and *E. coli*, was also evaluated (data not shown). Microbiological analyses showed an absence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* (in 25 g) and *C. perfringens* and *E. coli* were below the detection limit. Microbiological counts in the present study were within the accepted limits for human consumption established by the ICMSF (2004).

Initial mesophilic and psychophilic aerobic microorganisms, LAB, *S. aureus* and total coliforms counts were not reduced by any of the treatments (active packaging or HPP) tested at day 1. After storage for 90 day at 4 °C, the mesophiles increased slightly, except for control samples, untreated. However, at the end of storage (180 days at 4 °C), mesophilic aerobic counts of the samples treated with active packaging (RBE and RBE+HPP) were significantly lower ( $2.6 \pm 0.5$  log CFU g<sup>-1</sup> and  $2.3 \pm 0.3$  log CFU g<sup>-1</sup>, respectively) than those of the control ( $3.4 \pm 0.2$  log CFU g<sup>-1</sup>), and HHP ( $4.1 \pm 0.7$  log CFU g<sup>-1</sup>) counts. This may be due to the late release of antimicrobial compounds from the active packaging which depends on several factors such as the partition behaviour, the diffusion phenomenon through the coating, the volatilization into the headspace or the solubility in the foods (Khaneghah, Hashemi, & Limbo, 2018). These results were different when storage is carried out at 20 °C, since in this case the RBE and RBE+HPP treatments significantly increase the amount of mesophilic microorganisms present in the samples. The trend of mesophilic microorganism in different temperature storage is due to the microorganism optimal growth conditions. Mesophilic microorganisms have a growth range between 10-45 °C but their optimal are around 30 °C. This is why, under refrigeration conditions (4 °C) and in the presence of antimicrobial agents (RBE) bacteria are very negatively influenced to develop. On the other hand, at 20 °C they are close to their optimum growth and can develop better. The same tendency was observed in previous studies (Martillanes et al., 2020).

**Table 5.21.** Microbiological changes (log CFU g<sup>-1</sup>) of sliced Iberian dry-cured ham in active packaging and/or treated by high hydrostatic pressure

Mesophilic Aerobic	Control	HPP	RBE	RBE + HPP	Significance
<b>1 d</b>	2.6 ± 0.7BC	1.7 ± 0.5B	2.1 ± 0.7C	1.70 ± 0.5C	Ns
<b>90 d (4°C)</b>	2.2 ± 0.2cC	3.9 ± 0.7aA	3.3 ± 0.2abB	2.8 ± 0.4bcB	****
<b>90 d (20°C)</b>	3.2 ± 0.3cAB	3.8 ± 0.3bA	4.5 ± 0.4aA	5.0 ± 0.5aA	****
<b>180 d (4°C)</b>	3.4 ± 0.2bA	4.1 ± 0.7aA	2.6 ± 0.5bcBC	2.3 ± 0.3cBC	****
<b>Significance</b>	***	****	****	****	
<b>Psychrofilic</b>					
<b>1 d</b>	1.0 ± 0.2	< 1	1.6 ± 0.7B	1.2 ± 0.6B	Ns
<b>90 d (4°C)</b>	nd	nd	nd	nd	-
<b>90 d (20°C)</b>	nd	<1	nd	nd	***
<b>180 d (4°C)</b>	nd	nd	nd	nd	-
<b>Significance</b>	-	-	-	-	
<b>LAB</b>					
<b>1 d</b>	2.3 ± 0.2B	2.3 ± 0.4C	2.4 ± 0.7	2.1 ± 0.2	Ns
<b>90 d (4°C)</b>	2.1 ± 0.5bB	2.8 ± 0.3aB	2.8 ± 0.2a	2.3 ± 0.3ab	**
<b>90 d (20°C)</b>	2.9 ± 0.3bA	3.5 ± 0.3aA	2.5 ± 0.2b	2.0 ± 0.2b	****
<b>180 d (4°C)</b>	2.4 ± 0.4B	2.2 ± 0.3C	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	Ns
<b>Significance</b>	*	****	ns	ns	
<b>S. aureus</b>					
<b>1 d</b>	<2	nd	<2	nd	-
<b>90 d (4°C)</b>	nd	nd	2.4 ± 0.4	<2	-
<b>90 d (20°C)</b>	2.3 ± 0.6	2.4 ± 0.3	<2	<2	-
<b>180 d (4°C)</b>	nd	nd	nd	nd	-
<b>Significance</b>	-	-	-	-	
<b>Total Coliforms</b>					
<b>1 d</b>	nd	nd	nd	nd	-
<b>90 d (4°C)</b>	nd	nd	nd	nd	-
<b>90 d (20°C)</b>	nd	nd	1.7 ± 0.6	<1	-
<b>180 d (4°C)</b>	nd	nd	nd	nd	-
<b>Significance</b>	-	-	-	-	
<b>Moulds and yeasts</b>					
<b>1 d</b>	1.6 ± 0.6c	<1	2.0 ± 0.6bcB	2.5 ± 0.2aA	***
<b>90 d (4°C)</b>	<1	<1	<1	<1	-
<b>90 d (20°C)</b>	<1	<1	3.1 ± 0.5aA	2.4 ± 0.1bA	****
<b>180 d (4°C)</b>	1.5 ± 0.7	nd	nd	nd	-
<b>Significance</b>	ns	-	****	****	

HPP: high pressure processing; RBE: active packaging based on rice bran extract; HPP + RBE: combination of HPP and RBE treatments. N=5 (mean ± standard deviation values of five packages are presented) a-c: Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's test p<0.05) A-C: different letters in the same column statistical differences (Tukey's test p<0.05). nd: not detected, <1 and <2: counts are higher than detection limit but not can be quantified. \*\*\* indicates P < 0.001; \* indicates P < 0.05, ns indicates P > 0.05

The count of psychrotrophic bacteria in T0 samples was around 1 log CFU g<sup>-1</sup>. It was observed that the treatments with HPP reduced the content with respect to the control, not so in the cases of RBE and RBE+HPP. Regarding the evolution of psychrotrophic count during storage (6 months), they were not detected in any of the samples at the times studied (<1 log CFU g<sup>-1</sup>). Very similar trend lines were observed for the experimental samples stored at 20 °C.

RBE and HPP treatments, alone or in combination, produced an inhibitory effect ( $p < 0.05$ ) on moulds and yeasts counts. The effect could be observed after processing or during storage, since the treatment could also produce sublethal changes, which prevent them to grow on selective media and/or requires longer periods of time to recover (Yuste, Capellas, Pla, Fung, & Mor-Mur, 2001).

On the other hand, initial LAB counts were no different between treatments and control at T0. In the storage at 20 °C during 90 days where HPP treatment had high counts against control and RBE (with and without HPP). In contrast, at long-time storage (180 days) had not significant differences between the treatments and control samples. *S. aureus* was reduced by RBE and RBE with HPP after 90 days at 20 °C and at 180 days of storage this microorganism was not detected in no treatment.

Initial moulds and yeasts counts in the RBE and RBE+HPP sample were higher than in the control, untreated, and HPP. After 90 and 180 days of storage at 4 °C, they were only detected in the control, being below the quantification limit in the other treatments. On day 90 of storage at 20 °C, RBE and RBE+HPP had moulds and yeasts counts were greater than 2.0 log CFU g<sup>-1</sup>, while the control, untreated, and HPP had less than 1.0 log CFU g<sup>-1</sup>. This is the same tendency that mesophilic microorganisms, who were reduced by the combination of active packaging, refrigeration temperatures and long-time storage because the growth conditions are negative. These results are in concordance with previous studies in other food matrix where the rice bran extract antifungal effect was observed at 4 °C and 7 days of storage in mayonnaise-type emulsion (Martillanes et al., 2020).

These results show the importance of incorporating compounds with antimicrobial activity in the packaging for the control of certain groups of microorganisms

#### 5.5.2 Effect of HPP and active packaging on chromatic parameters of dry-cured Iberian ham

With regards to chromatic parameters (Table 5.22), they provide information about the visual colour changes that the different treatments and storage times produce in the

slices of Iberian ham. Treatments applied did not modified the lightness (CIE L\*) of sliced ham which can be considered positive since original characteristics of Iberian ham were not affected by active packaging or HPP at day 1. During 90 and 180 days of storage, control, HPP and RBE packages showed similar lightness, without significant differences and only packages that combined RBE+HPP stored at 20 °C showed increases during storage. An excess of lightness in the sliced dry-cured ham could be negative since changes in the typical color of dry-cured ham could influence consumers' choice in the supermarket.

**Table 5.22.** Instrumental color changes of sliced Iberian dry-cured ham in active packaging and/or treated by high pressure processing.

CIE L*	Control	HPP	RBE	RBE + HPP	Significance
<b>1 d</b>	39.0 ± 5.7	42.0 ± 2.4	40.2 ± 2.0	40.3 ± 1.6B	ns
<b>90 d (4°C)</b>	41.5 ± 1.8	41.8 ± 1.6	42.4 ± 1.2	44.4 ± 2.2A	ns
<b>90 d (20°C)</b>	43.1 ± 0.8	43.7 ± 1.0	43.3 ± 2.2	42.4 ± 1.1AB	ns
<b>180 d (4°C)</b>	44.4 ± 3.0	43.3 ± 1.2	41.9 ± 2.0	42.8 ± 0.7AB	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	**	
<b>CIE a*</b>					
<b>1 d</b>	7.5 ± 1.1A	5.8 ± 0.8	6.0 ± 1.6	6.3 ± 1.1	ns
<b>90 d (4°C)</b>	5.5 ± 1.2abB	5.0 ± 0.9b	6.2 ± 0.7a	5.8 ± 1.2ab	*
<b>90 d (20°C)</b>	4.3 ± 0.8B	4.3 ± 0.6	4.8 ± 0.9	4.4 ± 1.2	ns
<b>180 d (4°C)</b>	5.2 ± 0.5B	5.1 ± 1.2	5.7 ± 0.7	4.5 ± 0.7	ns
<b>Significance</b>	***	ns	ns	ns	
<b>CIE b*</b>					
<b>1 d</b>	4.5 ± 0.5A	3.9 ± 1.2	3.6 ± 1.5	4.6 ± 1.4	ns
<b>90 d (4°C)</b>	4.3 ± 1.4AB	2.6 ± 0.9	3.9 ± 0.4	3.7 ± 1.2	ns
<b>90 d (20°C)</b>	2.7 ± 0.7B	2.7 ± 0.7	4.0 ± 1.4	2.7 ± 0.9	ns
<b>180 d (4°C)</b>	3.9 ± 1.0AB	3.6 ± 0.7	3.5 ± 0.9	3.1 ± 0.8	ns
<b>Significance</b>	*	ns	ns	ns	
<b>Chroma</b>					
<b>1 d</b>	8.8 ± 1.0A	7.0 ± 1.3A	7.0 ± 2.1	7.8 ± 1.6A	ns
<b>90 d (4°C)</b>	7.0 ± 1.7AB	5.6 ± 0.6B	7.4 ± 0.8	7.0 ± 1.3AB	ns
<b>90 d (20°C)</b>	5.1 ± 0.9B	5.1 ± 0.6AB	6.3 ± 1.5	5.2 ± 1.1B	ns
<b>180 d (4°C)</b>	6.6 ± 0.5B	6.3 ± 1.3AB	6.7 ± 0.9	5.4 ± 0.9B	ns
<b>Significance</b>	***	*	ns	*	
<b>Hue</b>					
<b>1 d</b>	30.9 ± 3.5	33.2 ± 4.9	29.9 ± 5.3	35.3 ± 6.3	ns
<b>90 d (4°C)</b>	37.4 ± 6.1	27.4 ± 7.9	32.2 ± 1.5	32.7 ± 9.1	ns
<b>90 d (20°C)</b>	31.7 ± 4.4	32.6 ± 7.6	38.4 ± 7.7	31.4 ± 9.9	ns
<b>180 d (4°C)</b>	36.7 ± 8.5	35.1 ± 2.9	31.2 ± 4.5	33.9 ± 5.2	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	

HPP: high pressure processing; RBE: active packaging based on rice bran extract; HPP + RBE:

combination of HPP and RBE treatments. N=5 (mean ± standard deviation values of five packages are presented) a-b: Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ) A-B: different letters in the same column statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ). \*\*\* indicates  $P < 0.001$ ; \*\* indicates  $P < 0.01$ ; \* indicates  $P < 0.05$ , ns

indicates  $P > 0.05$

The redness of dry-cured ham (CIE  $a^*$ ) ranged between 7.5 and 5.8 at the beginning of experiment. No significant differences were found among groups at day 1 and 180. At day 90, slices of RBE showed significant higher values than HPP slices when they were stored at 4 °C. During the storage, control packages showed a significant decrease of CIE  $a^*$  while the values of HPP, RBE and HPP+RBE were not modified. The drop in  $a^*$ -values is the result of the oxidation of nitrosylmyoglobin, which is the predominant pigment in these products. The maintenance of the original redness in packages is considered positive and could also indicate a less intense development of oxidation reactions. The  $a^*$  parameter is the most important when assessing the influence of different treatments on the instrumental color, since a reddish colour is associated with higher quality meat products (Parra et al., 2010).

For the  $b^*$  coordinate (blue-yellow component) there were not significant differences among the control and the treatment at day 1. None of the treatments at any storage times showed significant differences for this parameter. Only control samples showed a significant reduction of yellowness, while in the treatments this decrease is less pronounced and not significant. The chromaticity ( $C^*$ ) expresses the vividness of the colour, while the tone angle ( $h^*$ ) represents the hue of the color of the angle defined by the coordinates  $a^*$  and  $b^*$ . The colour of dry-cured ham is complex and influenced by several factors related to Arnau, 2013; Ramírez & Cava, 2008).

### 5.5.3 Effect of HPP and active packaging on oxidative status of dry-cured Iberian ham

The effect of the different treatments, on the oxidative status of sliced dry-cured Iberian ham was evaluated (Table 5.23). The results show an increase of TBA-RS values when applying high pressure treatment alone or with active packaging of RBE. However, during storage at 90 days (at 4 and 20 °C) no effect of the HPP alone or with the active packaging was found. At the end of storage, the RBE showed lower TBA-RS values than control packages while HPP and RBE+HPP showed intermediate values. Some authors have reported that HPP can induce lipid oxidation in sliced dry-cured ham (Andrés, Møller, Adamsen, & Skibsted, 2004). However, during short and long term storage (90 and 180 days), HPP did not induce lipid oxidation and probably this type of ham which is rich in antioxidant compounds with origin in diet (Tejerina, García-Torres, Cabeza de Vaca, Vázquez, & Cava, 2011) present high stability during storage as previously reported by Amaro-Blanco, Delgado-Adámez, Martín, & Ramírez, (2018).

Both rice bran extract and oryzanol, its main component, have been tested against the lipidic oxidation of other meat-based food matrices with findings analogous to those obtained in sliced dry-cured Iberian ham (Kim et al., 2003; Martillanes et al., 2019).

However aqueous olive leaf extract, with a high antioxidant capacity *in vitro*, did not obtain satisfactory results when was tested in active packaging against sliced Iberian dry-cured shoulders (Amaro-Blanco, Delgado-Adámez, Martín, & Ramírez, 2018). This seems to indicate that the lipophilic properties of the rice bran extracts obtained with ethanol might enhance the interaction with the matrix.

With respect to protein oxidation, the treatments (HPP and active packaging) did not significantly affect the degree of oxidation at any sampling day and temperature. However, during storage, especially in the first 90 days important increases of the levels of protein oxidation were found in all groups, control and treatments. Then, slight reductions of protein oxidation were found at the day 180. Nutritional quality and tenderness are appreciated attributes of meat which are affected by protein oxidation. For this reason its inhibition is important to protect raw meat against these undesirable effects.

**Table 5.23:** Lipid (TBARS, mg MDA Kg<sup>-1</sup>) and protein oxidation (nmol carbonyls mg protein<sup>-1</sup>) of sliced Iberian dry-cured ham in active packaging and/or treated by high pressure processing

TBA-RS	Control	HPP	RBE	RBE + HPP	Significance
<b>1 d</b>	1.2 ± 0.2bB	2.3 ± 0.6a	1.8 ± 0.5abB	2.5 ± 0.4aAB	**
<b>90 d (4°C)</b>	2.2 ± 0.2A	2.1 ± 0.4	2.1 ± 0.4 B	2.0 ± 0.3 B	ns
<b>90 d (20°C)</b>	1.9 ± 0.5A	2.6 ± 0.9	3.0 ± 0.7 A	2.8 ± 0.7 A	ns
<b>180 d (4°C)</b>	2.1 ± 0.3 aA	1.9 ± 0.2 ab	1.7 ± 0.4 bB	1.8 ± 0.2 abB	*
<b>Significance</b>	***	ns	**	**	
<b>Protein oxidation</b>					
<b>1 day</b>	3.6 ± 0.6B	4.0 ± 0.7C	3.9 ± 0.7B	4.1 ± 0.6B	ns
<b>90 d (4°C)</b>	6.0 ± 0.8A	7.1 ± 1.1A	6.5 ± 1.6A	6.7 ± 0.3A	ns
<b>90 d (20°C)</b>	6.3 ± 1.2A	6.2 ± 1.2AB	6.9 ± 1.9A	6.8 ± 1.3A	ns
<b>180 d (4°C)</b>	5.0 ± 0.7AB	5.0 ± 1.0BC	4.6 ± 0.8AB	4.2 ± 1.1B	ns
<b>Significance</b>	***	***	**	***	

HPP: high pressure processing; RBE: active packaging based on rice bran extract; HPP + RBE: combination of HPP and RBE treatments. N=5 (mean ± standard deviation values of five packages are presented) a-b: Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ) A-C: different letters in the same column statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ). \*\*\* indicates  $P < 0.001$ ; \*\* indicates  $P < 0.01$ ; \* indicates  $P < 0.05$ , ns indicates  $P > 0.05$

Generally, lipid and protein oxidation follow the same trend (Srinivasan & Hultin, 1994), since protein oxidation, the same as lipid oxidation, is affected by unsaturated fatty acids, pigments, transition metals and other compounds. However, this relationship has not been always reported for sliced Iberian dry-cured products submitted to long times of

storage. Amaro-Blanco, Delgado-Adámez, Martín, & Ramírez, (2018) found high values of protein oxidation at day 1 and no changes during storage were reported in sliced dry-cured shoulder. Differences could be attributed to the differential characteristics of the product (shoulder vs. ham) and to the lower oxygen permeability of bag utilized in the current study (bags are considered high-barrier films).

Cava, Ladero, González, Carrasco, & Ramírez (2009) found increases of lipid and protein oxidation values during storage in vacuum sliced dry-cured ham, however, storage times were shorter and Iberian ham did not come from pigs reared outdoors. In this case, the active packaging with RBE was not effective to prevent the development of protein oxidation. Otherwise, rice bran hydrosilate at 2% was equally effective as 0.02% BHA/BHTE against both lipid oxidation and protein oxidation in frozen fried fish cake (Supawong, Thawornchinsombut, & Park, 2018).

#### 5.5.4 Effect of HPP and active packaging on sensory parameters of dry-cured Iberian ham

The sensory analysis of dry-cured sliced Iberian ham is shown in Table 5.24. As it can be observed, the treatments did not significantly affect any of the sensory parameters studied at day 1.

The redness of lean was not affected by the treatments applied and by the RBE and the colour was stable during storage. Results agree with instrumental analysis, since the parameter CIE  $a^*$  was quite stable during storage. The reduction of CIE  $a^*$  value in control packages is in line with the lower scores in control packages at day 180 although differences were not significant.

Storage have a significative effect on fat appearance in control, HPP and RBE + HPP samples. These changes perceived in fat appearance (more yellow) in control and HPP packages during storage contrast with the decrease of CIE  $b^*$  of control packages. The inconsistency between some sensory and instrumental parameters could be attributed to the high difficulty to homogenize the slices of ham within the treatments due to their heterogeneity. An increase of yellowness in fat is also related to increases of lipid oxidation development. In this respect, control samples showed higher TBA-RS values than packages with RBE. Changes fat appearance were more evident in samples stored at 20 °C. Cava, Higuero, & Ladero, (2020) found that storage at 18 °C produced a faster lipid oxidation and an increase of yellowness in dry-cured meat products than storage at 4 °C.

The variations observed in marbling could be associated to differences between the intramuscular fat content of packages, although this variability has tried to be randomized

in the experimental design. In the case of brightness, a significant change was also perceived in sliced stored for 90 days at 20 °C. Brightness was significantly higher when RBE was used in the packages and lower in HPP treatment. Probably the application of the extract, which has an oily appearance, could have increase brightness during the storage. Brightness of Iberian dry-cured ham is related to the intramuscular fat content and the fatty acid profile of the intramuscular fat. Fatty acid composition of Iberian dry-cured ham was mainly affected by the rearing system and diet composition (Cava, Ventanas, Ruiz, Andrés, & Antequera, 2000) and this parameter was equal in all dry-cured hams in this study.

Odor intensity value was not altered by the treatments applied which could be considered positive for a possible application at industrial level. In addition, odor intensity throughout storage decreased in the same way in all treatments. Volatile compounds generated during rearing time have their origin in lipid oxidation, and they are the most abundant in dry-cured meat products (Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 1999; Sabio, Vidal-Aragón, Bernalte, & Gata, 1998). However, those compounds generated during storage could not be considered positive.

Taste of acorn-fed was significantly reduced during storage when RBE was used, with or without HPP. Probably some compounds from the extract interact with the flavor perception of the ham. These slight reductions could be considered negligible, taking into account that long storage periods were evaluated. Salt perception, which is related to salt content of hams, was not affected by treatments and its level was not modified during storage.

Panelists noticed an increase of spicy tastes at the end of the storage in all treatment, without differences among treatments each day of analysis. Probably these changes could be related to the formation of aroma compounds along storage which increased this perception. Similarly, rancidity perception was slightly increased in all groups, but these differences were only significant in RBE+HPP and, in general, scores were very low. At some extent, lipid oxidation is positive since aroma compounds have their origin mostly in lipid oxidation reactions (Ramírez & Cava, 2008), however, compounds developed during storage are considered negative.

The application of HPP and/or RBE did not add undesirable tastes to the ham which is positive to preserve the final quality of the sliced product.



**Table 5.24** Sensory analysis of sliced Iberian dry-cured ham in active packaging and/or treated by high pressure processing.

Lean colour	Control	HPP	RBE	RBE + HPP	<i>P</i> value
1 day	7.0 ± 0.8	7.0 ± 0.8	7.0 ± 0.5	7.1 ± 0.4	ns
90 days (4 °C)	6.6 ± 0.5	6.3 ± 0.9	7.0 ± 1.0	6.7 ± 0.7	ns
90 days (20 °C)	7.1 ± 0.4	7.5 ± 0.6	6.8 ± 0.9	7.6 ± 0.4	ns
180 days (4 °C)	6.6 ± 0.3	6.9 ± 0.9	6.9 ± 0.7	6.5 ± 0.9	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	
<b>Fat appearance</b>					
1 day	1.8 ± 0.5B	1.6 ± 0.8B	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.3B	ns
90 days (4 °C)	2.6 ± 0.7AB	2.7 ± 0.7A	2.3 ± 0.4	2.6 ± 0.5AB	ns
90 days (20 °C)	3.1 ± 1.0A	2.6 ± 0.4AB	2.9 ± 0.8	3.1 ± 0.6A	ns
180 days (4 °C)	2.5 ± 0.4AB	2.2 ± 0.4AB	2.4 ± 0.5	2.6 ± 0.7AB	ns
<b>Significance</b>	*	*	ns	*	
<b>Marbling</b>					
1 day	3.1 ± 0.9	2.8 ± 0.9	3.3 ± 0.8	3.9 ± 1.0	ns
90 days (4 °C)	3.6 ± 1.2	4.3 ± 1.8	3.2 ± 1.2	4.1 ± 0.9	ns
90 days (20 °C)	3.6 ± 1.0ab	2.7 ± 0.7b	4.5 ± 1.3a	3.0 ± 1.0ab	*
180 days (4 °C)	3.1 ± 0.9	2.9 ± 0.8	2.7 ± 1.5	3.5 ± 1.2	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	
<b>Brightness</b>					
1 day	5.9 ± 1.7	6.7 ± 0.7A	7.3 ± 0.3A	7.0 ± 0.5A	ns
90 days (4 °C)	5.5 ± 0.7	5.6 ± 0.7AB	5.8 ± 0.5B	5.4 ± 0.6B	ns
90 days (20 °C)	5.5 ± 0.5ab	4.2 ± 1.6bB	6.2 ± 0.4aB	5.7 ± 1.1abAB	*
180 days (4 °C)	6.2 ± 0.8	5.3 ± 1.5AB	6.3 ± 0.6B	6.1 ± 0.8AB	ns
<b>Significance</b>	ns	*	***	*	
<b>Odour intensity</b>					
1 day	6.8 ± 0.4A	6.8 ± 0.6A	6.9 ± 0.5A	7.0 ± 0.3A	ns
90 days (4 °C)	6.3 ± 0.3AB	6.1 ± 0.3BC	5.7 ± 0.4B	5.9 ± 0.3B	ns
90 days (20 °C)	5.9 ± 0.3B	5.7 ± 0.4C	6.0 ± 0.4B	6.2 ± 0.3B	ns
180 days (4 °C)	6.2 ± 0.5AB	6.5 ± 0.3AB	6.2 ± 0.5AB	6.1 ± 0.4B	ns
<b>Significance</b>	**	**	**	***	
<b>Undesirable odour</b>					
1 day	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	ns
90 days (4 °C)	0.3 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.9	ns
90 days (20 °C)	0.0 ± 0.1b	0.2 ± 0.1a	0.1 ± 0.1ab	0.1 ± 0.1ab	*
180 days (4 °C)	0.5 ± 1.0	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.4	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	
<b>Taste of acorn-fed</b>					
1 day	6.9 ± 0.5	6.5 ± 0.9	6.6 ± 0.4A	6.8 ± 0.3A	ns
90 days (4 °C)	6.5 ± 0.2a	6.3 ± 0.3ab	5.8 ± 0.4bB	6.0 ± 0.4abB	**
90 days (20 °C)	6.3 ± 0.3	5.7 ± 0.8	6.2 ± 0.4AB	6.0 ± 0.3B	ns
180 days (4 °C)	6.1 ± 0.6	6.1 ± 0.3	5.9 ± 0.5B	6.0 ± 0.3B	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	*	**	
<b>Salty taste</b>					
1 day	5.4 ± 0.9	5.0 ± 0.4	4.6 ± 0.5	4.8 ± 0.4	ns
90 days (4 °C)	4.5 ± 0.6	4.5 ± 0.5	4.8 ± 0.2	4.6 ± 0.5	ns
90 days (20 °C)	4.8 ± 0.5	4.9 ± 0.4	4.4 ± 0.5	4.8 ± 0.5	ns
180 days (4 °C)	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.4	4.9 ± 0.4	4.9 ± 0.4	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	

Spicy taste	Control	HPP	RBE	RBE + HPP	P value
<b>1 day</b>	0.5 ± 0.3B	0.2 ± 0.2B	0.4 ± 0.2B	0.3 ± 0.1B	ns
<b>90 days (4 °C)</b>	0.5 ± 0.1B	0.7 ± 0.6B	0.5 ± 0.3B	0.5 ± 0.2B	ns
<b>90 days (20 °C)</b>	0.3 ± 0.1B	0.5 ± 0.3B	0.3 ± 0.1B	0.4 ± 0.1B	ns
<b>180 days (4 °C)</b>	1.4 ± 0.1A	1.5 ± 0.2A	1.5 ± 0.2A	1.3 ± 0.2A	ns
<b>Significance</b>	***	***	***	***	
<b>Rancidity</b>					
<b>1 day</b>	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1C	ns
<b>90 days (4 °C)</b>	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1BC	ns
<b>90 days (20 °C)</b>	0.4 ± 0.6	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.9	0.3 ± 0.2AB	ns
<b>180 days (4 °C)</b>	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.3A	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	**	
<b>Undesirable taste</b>					
<b>1 day</b>	0.0 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	ns
<b>90 days (4 °C)</b>	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.4	ns
<b>90 days (20 °C)</b>	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2	ns
<b>180 days (4 °C)</b>	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.7	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.4	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	
<b>Juiciness</b>					
<b>1 day</b>	5.8 ± 0.6	5.9 ± 1.1	6.1 ± 0.4	6.1 ± 0.5A	ns
<b>90 days (4 °C)</b>	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.4	5.1 ± 0.7	5.2 ± 0.6AB	ns
<b>90 days (20 °C)</b>	5.3 ± 0.6ab	4.8 ± 0.4b	5.8 ± 0.3a	5.0 ± 0.7abAB	*
<b>180 days (4 °C)</b>	5.5 ± 0.8	4.9 ± 0.6	5.5 ± 0.9	4.9 ± 0.7B	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	*	
<b>Hardness</b>					
<b>1 day</b>	5.5 ± 0.9	5.0 ± 0.9	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.3	ns
<b>90 days (4 °C)</b>	4.5 ± 0.4	4.6 ± 0.7	5.5 ± 0.8	5.4 ± 0.8	ns
<b>90 days (20 °C)</b>	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.7	4.7 ± 0.3	5.0 ± 0.2	ns
<b>180 days (4 °C)</b>	5.0 ± 0.9	5.4 ± 0.4	4.8 ± 0.4	5.3 ± 0.4	ns
<b>Significance</b>	ns	ns	ns	ns	

HPP: high pressure processing; RBE: active packaging based on rice bran extract; HPP + RBE:

combination of HPP and RBE treatments. N=5 (mean ± standard deviation values of five packages are presented) a-b: Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ) A-C: different letters in the same column statistical differences (Tukey's test  $p < 0.05$ ). \*\*\* indicates  $P < 0.001$ ; \*\* indicates  $P < 0.01$ ; \* indicates  $P < 0.05$ , ns indicates  $P > 0.05$

Juiciness was reduced during storage although changes were only significant in RBE+HPP group. Probably this change could be related to the moisture content of slices, since a lower humidity of hams induce loss of juiciness (Ramírez & Cava, 2008). No changes in hardness were noticed in the sensory analysis.

In general, panellist noticed a reduction of quality of hams during storage such as less odour intensity, higher yellowness, higher spicy and rancid tastes. However, taking into account that hams were stored for 180 days and that also high temperatures of storage (20 °C) were also studied, sensory changes could not be considered very intense as we could previously expected.

As far as we concern, no previous paper have analysed the changes during storage at 20 °C of high quality (Montanera) Iberian dry-cured ham, only the effect of temperature storage on survival of *L. monocytogenes* inoculated in dry-cured ham have been studied (Domínguez & Hernando, 2012). Therefore, for short-term storages (90 days) only slight reductions of quality are noticed. This fact could be of interest for some retail stores to reduce cost of distribution and sales. Similar results are found for other dry-cured product stored at 18 °C (Cava et al., 2020).

Very few papers have evaluated the effect of long times of storage (six months) for sliced Iberian ham. Amaro et al. (2018) analyzed the changes for 150 days and intense lipid oxidation changes were found during storage. In the current paper the oxygen permeability of plastic bags was lower than that study and the extent of lipid oxidation reactions were also lower. Despite all, control slices showed higher discoloration (intense reduction of CIE a\*) and higher TBA-RS values after 180 days of storage. Active packaging based in RBE reduced lipid oxidation reactions and the decolouration of slices during storage.

#### 5.5.5 Conclusion

The active package based in rice bran extract can be proposed to improve the conservation of sliced dry-cured Iberian ham, since it slows down the growth of some microorganisms to six months, while delaying lipid oxidation and preventing discoloration changes during storage. However, its combination with high pressure processing does not improve or potentiate its activity. Future studies should evaluate if the microbial activity showed by the active packaging against specific pathogens (ie. *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli* 0157:H7) makes necessary its combination with high pressure.



**Capítulo 5.6 Control of *Listeria monocytogenes* in sliced dry-cured Iberian ham by high pressure processing in combination with an eco-friendly packaging based on chitosan, nisin and phytochemicals from rice bran**



## 5.6 Control of *Listeria monocytogenes* in sliced dry-cured Iberian ham by high pressure processing in combination with an eco-friendly packaging based on chitosan, nisin and phytochemicals from rice bran

### 5.6.1 High pressure processing optimization

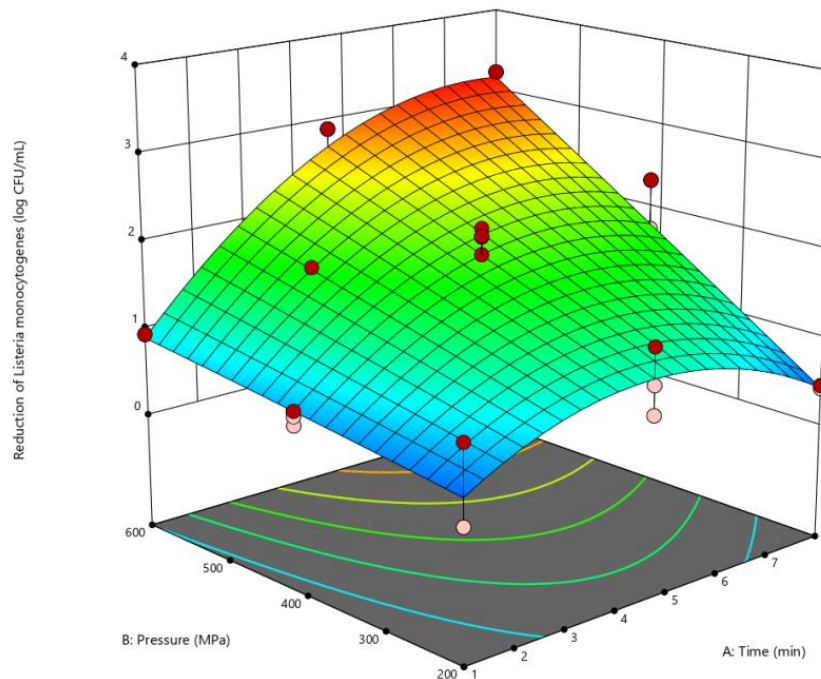
The inoculation of *L. monocytogenes* in the sliced dry-cured Iberian ham resulted in a concentration of 8.6 log CFU g<sup>-1</sup>. After 24 hours of storage at a temperature of 30 °C (optimal *L. monocytogenes* growth temperature), the inoculated samples (those employed in the present study) showed a concentration of 7.0 ± 0.3 CFU g<sup>-1</sup>, indicating that under these storage conditions, 1.6 log CFU g<sup>-1</sup> of *L. monocytogenes* were reduced. This initial reduction occurs naturally in sliced dry-cured Iberian ham, caused by its physico-chemical properties and the ingredients used for its elaboration (Cheftel & Culioli, 1997) and goes in line with previous literature (Montiel et al., 2020).

Once these 24 hours at 30 °C had elapsed, the high pressure treatments were carried out to optimize and validate the use of this technology as a non-thermal alternative in the elimination of this microorganism. The results obtained were adjusted to a quadratic model and its subsequent ANOVA analysis (Table 5.25) showed that the data were well adjusted to a response surface (Figure 5.14). The model F-value of 45.23 implies the model was significant. Likewise, p-values inferior than 0.0500 indicate model terms were also significant. In this case, time (A), pressure (B), their interaction (AB) and the square term of time (A<sup>2</sup>) were significant model terms. Additionally, the lack of fit F-value of 0.37 implied that this parameter was not significant relative to the pure error. The fit statistics showed that the predicted R<sup>2</sup> of 0.8506 was in reasonable agreement with the adjusted R<sup>2</sup> of 0.8948 and the 'adeq precision', that measures the signal to noise ratio, of 21.152 indicated an adequate signal and therefore the model can be used to navigate the design space.

**Table 5.25.** ANOVA results for response surface in HPP validation in sliced dry-cured Iberian ham

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	17.08	5	3.42	45.23	< 0.0001	significant
<b>A-time</b>	4.15	1	4.15	55.00	< 0.0001	
<b>B-pressure</b>	7.67	1	7.67	101.56	< 0.0001	
<b>AB</b>	2.27	1	2.27	30.05	< 0.0001	
<b>A<sup>2</sup></b>	2.63	1	2.63	34.86	< 0.0001	
<b>B<sup>2</sup></b>	0.0008	1	0.0008	0.0104	0.9196	
<b>Residual</b>	1.59	21	0.0755			
<b>Lack of Fit</b>	0.2028	6	0.0338	0.3665	0.8889	not significant
<b>Pure Error</b>	1.38	15	0.0922			
<b>Cor Total</b>	18.67	26				

The maximum inactivation of *L. monocytogenes* predicted in this model occurs around the maximum time and pressure established in the design of experiments (8 minutes and 600 MPa). Under such conditions, a maximum reduction of  $3.2 \pm 0.3$  CFU g<sup>-1</sup> respect the control was predicted by the model. The confirmation of these conditions was done by quintuplicate and the reduction observed was  $3.1 \pm 0.7$  log CFU g<sup>-1</sup> of sliced dry-cured Iberian ham, thus confirming the accuracy of the model's prediction with an optimal *L. monocytogenes* reduction level.



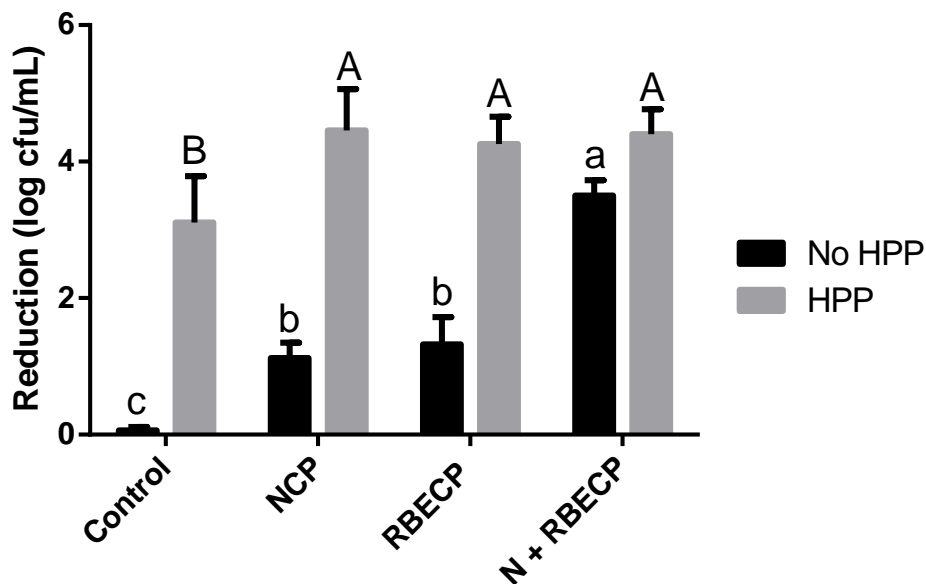
**Figure 5.14.** Surface response for the behaviour of *Listeria monocytogenes* reduction in sliced dry-cured Iberian ham as a function of two factors, pressure (MPa) and time (min) of HPP.

### 5.6.2 Multibarrier effect of high pressure processing and active packaging

Once the high pressure treatment was optimized, the multibarrier effect of the combination of HPP and active packaging was studied. For that matter, first inoculated samples were packaged with the different active packaging based on chitosan or in traditional packages (control samples). Then, packages underwent the optimized HPP treatment and were compared with non HPP treated samples (Figure 5.15). In all cases, when HPP was not applied to the packages, there was a significant effect on reduction the microorganism compared to control. Similarly, combining HPP with chitosan-based active packaging was significantly more effective than just applying the packaging individually. In this respect, all the active packaging tested had a significantly greater effect in combination with HPP than the application of HPP treatment alone. However,

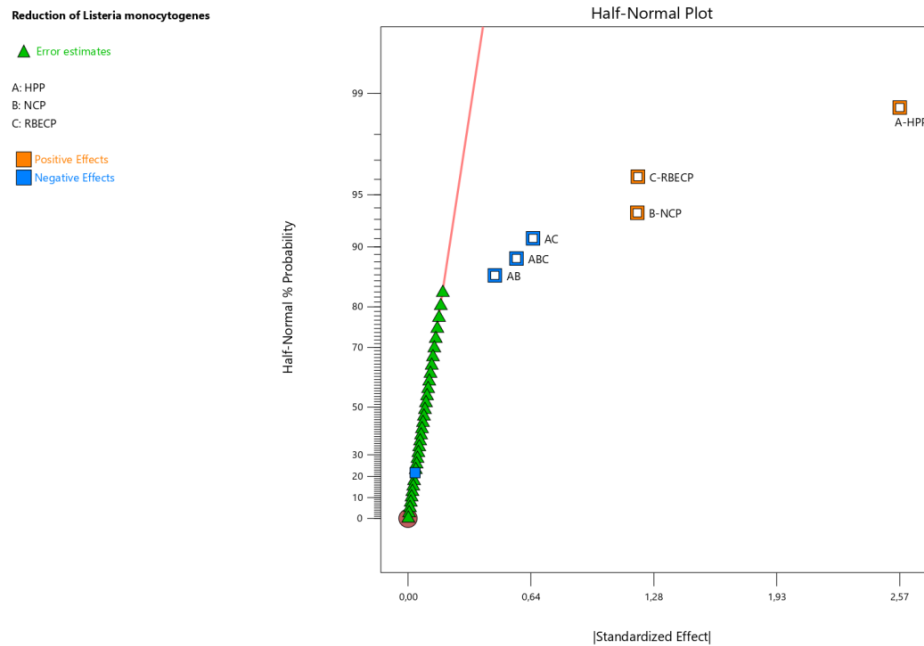


the chitosan-based packages containing both nisin and RBE (N+RBECP) did not work in synergy with the HPP treatment.



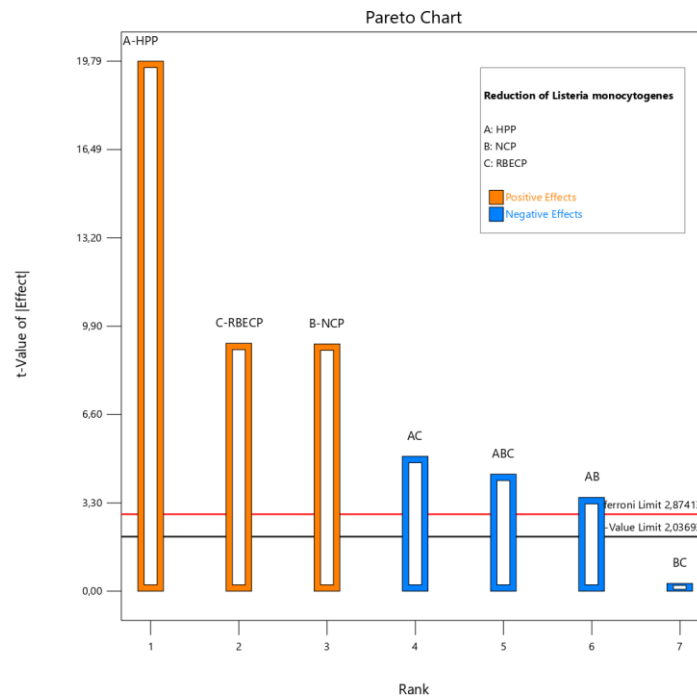
**Figure 5.15.** Effects of different processing combination in the reduction of *Listeria monocytogenes* in sliced dry-cured Iberian ham with respect control. For statistic, an amount of 0.1 log CFU g<sup>-1</sup> (LOD) is used as control. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), n=5. Control: no treatment; HPP: high pressure processing; NCP: nisin chitosan-based packaging; RBECP: rice bran extract chitosan-based packaging. a-c and A-B: different letters in the same group are statistically different. (Tukey test <0.05). In all cases significant differences were obtained between control and HPP groups (*t* test <0.05).

These data were modelled by fitting them to a complete factorial model in order to establish which factors are the most important in eliminating *L. monocytogenes*, and which combination of said factors gives the maximum reduction of this microorganism. The half-normal plot and Pareto chart are shown in Figures 5.16 and 5.17, respectively. The half-normal plot of the standardized effect is presented to establish the magnitude and direction of the effects. Effects far from 0 are statistically significant. In this case, they were all significant factors except for the combination of N+RBECP. In addition, the positive effects, those treatments that increased the response compared with the absence of treatment, are shown in orange while the negative effects act in the opposite sense and are marked in blue. The Pareto diagram has been made to set the standardized effects, from the largest effect to the smallest one in absolute values. Standardized effects are t-statistics that prove the null hypothesis that the effect is 0. The diagram also shows a reference line to indicate which effects are statistically significant.



**Figure 5.16.** Half-Normal Plot for the 2-level factorial design of different treatments applied in sliced dry-cured Iberian ham for *Listeria monocytogenes* reduction. HPP: high pressure processing; NCP: nisin chitosan-based packaging; RBECP: rice bran extract chitosan-based packaging

HPP has proven to be, in absolute values, the most effective treatment for the reduction of the microorganism. This was followed by the RBECP and NCP, respectively. The effect of HPP in combination with RBECP, the sum of the three treatments, and the combination HPP + NCP were in the places 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> and 6<sup>o</sup> respectively, being also significant values, although with a negative effect.



**Figure 5.17.** Pareto Chart for the 2-level factorial design of different treatments applied in sliced dry-cured Iberian ham for *Listeria monocytogenes* reduction. HPP: high pressure processing; NCP: nisin chitosan-based packaging; RBCEP: rice bran extract chitosan-based packaging

The ANOVA analysis for the model showed, as in the previous case, had good data fit (Table 5.26). The model F-value of 86.02 implies that the model was significant. There was only a 0.01% chance that an F-value this large could occur due to noise. P-values less than 0.0500 indicate that the model terms were significant. As in previous analyses, the ANOVA determined that only the N+RBCEP combination was not significant. The fit statistics showed that the predicted  $R^2$  of 0.9212 was in reasonable agreement with the adjusted  $R^2$  of 0.9385 and the 'adeq precision' of 23.944 indicated an adequate signal. Once the applicability of the model was tested, it was determined which combination of treatments showed to be the most effective for the reduction of *L. monocytogenes*. Using as criteria the maximum inactivation of the microorganism, the seven possible solutions together with the desirability and the result predicted are shown in Table 5.27.

**Table 5.26.** ANOVA results for modelization of HPP and chitosan-based treatments in sliced dry-cured Iberian ham.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	104.28	7	14.90	86.02	< 0.0001	significant
<b>A-HPP</b>	65.95	1	65.95	380.87	< 0.0001	
<b>B-NCP</b>	14.34	1	14.34	82.83	< 0.0001	
<b>C-RBECF</b>	14.42	1	14.42	83.29	< 0.0001	
<b>AB</b>	2.06	1	2.06	11.90	0.0016	
<b>AC</b>	4.27	1	4.27	24.64	< 0.0001	
<b>BC</b>	0.0137	1	0.0137	0.0791	0.7803	
<b>ABC</b>	3.21	1	3.21	18.55	0.0001	
<b>Pure Error</b>	5.54	32	0.1732			
<b>Cor Total</b>	109.82	39				

HPP: high pressure processing; NCP: nisin chitosan-based packaging; RBECF: rice bran extract chitosan-based packaging

With these data, it can be seen that the combinations of high pressure and the different active packages tested reach a greater desirability, higher than 0.8, being the application of NCP and RBECF, on sliced dry-cured Iberian ham, the least effective treatments against *L. monocytogenes*. With regard to the challenge test, only the HPP + NCP and HPP + NRBECF treatments had reached 6 log CFU g<sup>-1</sup> of reduction, in respect to the initial load of the sliced dry-cured Iberian ham; taking into account its own reduction before the application of the treatments (1.6 log CFU g<sup>-1</sup>), resulting on a final reduction of 6.1 and 6.0 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively.

**Table 5.27:** Desirability of each combination of treatments

A: HPP	B: NCP	C: RBECF	Desirability
+	+	-	0.865
+	+	+	0.854
+	-	+	0.827
-	+	+	0.681
+	-	-	0.604
-	-	+	0.257
-	+	-	0.218

HPP: high pressure processing; NCP: nisin chitosan-based packaging. RBECF: rice bran extract chitosan-based packaging. + implies that the treatment has been applied. – implies that treatment has not been applied

### 5.6.3 Discussion

The Iberian pig is a swine breed used to produce dry-cured meat products, being the Iberian ham one of the most appreciated around the world. The sliced format of dry-cured Iberian ham has incremented its demand instead of whole piece due to the changes in the lifestyle of consumers, as it results easier to consume in this format (Amaro-Blanco, Delgado-Adámez, Martín, & Ramírez, 2018). The presence of *L. monocytogenes* in this product is caused by the recontamination that takes place during handling and processing (Possas, Valdramidis, García-Gimeno, & Pérez-Rodríguez, 2019) and during the subsequent conservation in refrigeration and reduced oxygen atmospheres. As this bacteria is psychrotrophic and facultatively anaerobic, and this storage reduces the competitive microbiota, such conditions set an ideal environment for its multiplication (Rutherford et al., 2007). In this research, two strategies, high hydrostatic pressure and active packaging with antimicrobial compounds, were tested to minimize the *L. monocytogenes* content in sliced dry-cured Iberian ham.

The European Food Safety Authority criteria for this microorganism in Iberian dry-cured ham has established a limit of 100 CFU g<sup>-1</sup> in products throughout the shelf-life and the absence in 25 g of food in the manufacturing control. Other countries have much more stringent legislation: USA, Japan or Canada establish zero tolerance for *L. monocytogenes* (Neri et al., 2019). To comply with the requirements of different countries on the control of this microorganism, the use of HPP, the first of the technologies used in this work, has been widely studied in recent years, since it is a safe technology already implemented in the industry and with good results in the inactivation of microorganisms and enzymes (Yamamoto, 2017). The maximum inactivation level reached in this work by HPP has been 3.1 log CFU g<sup>-1</sup>, obtained at the maximum time and pressure tested, and was similar to that achieved by the high pressure treatment (600 MPa, 5 min) in deboned dry-cured ham (Pérez-Baltar, Serrano, Montiel, & Medina, 2020). On the other hand, Morales, Calzada, & Núñez, (2006) observed that treatment at 450 MPa for 10 min at 12°C only reduced *L. monocytogenes* population by 1.50 and 1.16 log CFU g<sup>-1</sup> in Iberian and Serrano hams, respectively. Another study carried out in Spanish chorizo sausage showed that the greatest inactivation occurred when it was treated at 550 MPa for 10 minutes and concluded that a product oriented modelling approach is essential to optimize the HPP efficacy due to intrinsic characteristics of the product such as aw (Rubio, Possas, Rincón, García-Gimeno, & Martínez, 2018). This fact has also been highlighted by Bover-Cid, Belletti, Aymerich, & Garriga, (2015) who have reported a complete inactivation of *L. monocytogenes* (absence in 15 g/sample), but only when pressures higher than 600 MPa were applied in dry-cured ham. However, among the

high pressure processing techniques, the maximum achievable pressure value for the industrial high hydrostatic pressure processing is capped at 600 MPa.

The effects of HPP on *L. monocytogenes* are well known; high pressure targets the cell membrane causing cell disruption, homeostasis deregulation, ribosomal destruction, changes in cell morphology, impairment of membrane-bound transport and proton efflux systems, and denaturation and inactivation of protein and enzymes (Ferreira, Almeida, Delgadillo, Saraiva, & Cunha, 2016).

HPP reduced *L. monocytogenes* populations, although their individual application did not reach the limit established by the challenge test. Therefore, this technology must be combined with other conservation techniques that guarantee the safety of the product. A strategy to improve the effectiveness of treatments and produce pathogen-free sliced dry-cured products would be the use of antimicrobial agents. In this regard, Hereu, Bover-Cid, Garriga, & Aymerich, (2012) suggest that the use of nisin in combination with pressurization and storage of cured meat products promotes greater safety in the control of *L. monocytogenes*. In our study, nisin and rice bran extract were used as antimicrobial agents. RBE has previously demonstrated its antimicrobial action (Martillanes et al., 2019, 2020).

The application of these two compounds was carried out through a chitosan-based active packaging. Chitosan is a biopolymer obtained from chitin after a deacetylation process. Together with cellulose, it is one of the most abundant natural polymers in the environment and, besides, has an antimicrobial action (Wang et al., 2018).

It was observed that both nisin and RBE included in the film and applied to sliced dry-cured Iberian ham reduced the concentration of *L. monocytogenes* by about 1 log CFU g<sup>-1</sup>. No significant differences among the two treatments were observed, but the combination of both antimicrobial agents showed a significantly higher effect, obtaining a synergistic effect among them with a reduction higher than 3 log CFU g<sup>-1</sup>. The inclusion of nisin in polyvinyl alcohol active packaging and its effect in reduction of *L. monocytogenes* on dry-cured products were tested by Hereu et al., (2012) finding similar results. Nisin is a targeted membrane-permeabilizing antibiotic peptide whose mechanism of action involve binding to Lipid II, the prenyl chain-linked donor of the peptidoglycan building blocks (Breukink et al., 2003).

As far as we know, rice bran extracts have not been tested previously as listericide, however, a natural peptide obtained from this by-product has shown to have a capacity against this microorganism (Pu & Tang, 2017). Because of the structural similarities between  $\gamma$ -oryzanol and phenolic compounds, its mode of action could be similar, and it

could inactivate essential enzymes, react with cell membrane or alter the function of the genetic material (Martillanes et al., 2017).

The synergistic effect obtained from the application of nisin and RBE would therefore come from the coupling of two different action mechanisms that complement each other to reduce the microbial load and it is similar to that observed in cow milk with the action of lantiotic nisin combined with phenolic compounds (Alves et al., 2016).

The listericidal activity of chitosan coatings prepared with acetic or lactic acid and the addition of essential oils on the growth of *L. monocytogenes* on black radish were studied by Jovanović, Klaus, & Nikšić, (2016). These authors described a reduction of 2.4 log CFU g<sup>-1</sup> in the presence of 1% chitosan film containing 0.2% of thyme essential oil after 24 h of storage. The treatment with chitosan-coated nisin-silica liposomes was engineered in Cheddar cheese and this coating displayed sustained antibacterial activity against *L. monocytogenes*, without affecting sensory properties Cui, Wu, Li, & Lin, (2016).

The interest in using chitosan lies in the possible substitution of nonbiodegradable petroleum-based polymers, increasingly abundant and problematic, for biodegradable materials. The use of convenience products, such as pre-cut fruit, vegetables or meat, and the increase in the sale of smaller packaging that responds to the needs of single-person houses (a lifestyle which is becoming quite usual) have increased the necessity for these plastics. When this waste is not properly processed, petroleum-based plastic arrives to ecosystems, especially marine ones. Many marine animals ingest plastic debris which are fragmented into microplastics and accumulate in the guts. They are also accumulated in other organs such as the gills and cause diseases and behavioural changes. The accumulation of microplastics in aquatic ecosystems has led to their uptake in the human intestine and their ingestion can set off to metabolism alterations and even cancer development (Wang, Lee, Chiu, Lin, & Chiu, 2020).

Current trends advocate for a reduction in the amount of plastic wrapped around foods, which is not always possible. In the case of sliced dry-cured Iberian ham, the packaging does not act as a mere container, but also protects the product during processing by high pressure and isolates it to prevent further recontamination. If the container is also an active packaging, it improves the performance of the high pressure processing (Hereu et al., 2012). A cumulative effect of HPP was observed along with NCP and RBECP, however, this effect was not as great as the sum of the two separate treatments. This may be because both treatments exert their action on the membrane of the microorganisms and therefore a synergistic effect could be hindered. Moreover,

considering that we have reached much lower concentration levels of *L. monocytogenes*, it was more difficult to reduce the last remains until total elimination than in the case of reduction of high concentrations of bacteria (Sokołowska et al., 2014).

#### 5.6.4 Conclusion

All the treatments tested have demonstrated a listericidal ability. The maximum inactivation by HPP of *L. monocytogenes* in sliced dry-cured Iberian ham was reached at 600 MPa during 8 min. When HPP was not applied, nisin and RBE have a synergistic effect against *L. monocytogenes* when included in a chitosan-based film package. Factorial 2-levels design showed that the most effective treatment was the combination HPP + nisin, however ANOVA test showed that the combinations HPP + rice bran extract and HPP + nisin + rice bran extract were equally effective. The combination of both technologies studied is a guarantee for the microbiological safety of the product, being potentially able to reduce the occurrence of outbreaks caused by this pathogen. Furthermore, biopolymer packaging appears as an alternative to plastics, contributing to the environment protection.



Discusión general



## VI. Discusión general

En la actualidad existe una creciente necesidad de cambio en el proceso productivo, desde la economía lineal, en la que se utilizan recursos naturales y se desechan gran cantidad de residuos, hacia una economía circular, basada en el uso y consumo responsable de productos, que pretende mantenerlos en la cadena de valor durante el mayor tiempo posible. Asimismo, la bioeconomía está basada en la producción de recursos biológicos renovables y su conservación. Este binomio ha generado un nuevo sistema de producción en el que se apuesta por la revalorización de los subproductos de la industria alimentaria. Esta revalorización se puede llevar a cabo mediante la obtención de sustancias con gran valor añadido a partir de subproductos, como pueden ser principios activos antioxidantes, antimicrobianos, etc. En este contexto, el arroz es el segundo cereal más consumido del mundo, siendo Extremadura la segunda región productora de España, y de cuya industria se obtiene como subproducto el salvado de arroz, rico en compuestos bioactivos.

El uso tradicional del salvado de arroz es la alimentación del ganado, una actividad que no genera valor añadido. Por ello, se presenta como un modelo ideal para su adecuación a un sistema productivo basado en la economía circular y la bioeconomía, que permita aumentar la competitividad y empleabilidad del sector agroalimentario. En este sentido, el salvado de arroz es una fuente de fitoquímicos con alta bioactividad, algunos de los cuales se encuentran de forma casi exclusiva en él, como es la familia compuesta por ésteres del ácido *trans*-ferúlico y fitoesteroles, conocida como  $\gamma$ -oryzanol, que se ha propuesto en esta Tesis, junto con los compuestos fenólicos como moléculas objetivo para su obtención, caracterización y aplicación.

La fase inicial para el cambio del modelo productivo implica la optimización del proceso de extracción, para la cual se han tenido en cuenta algunos de los principios de la Química Verde, como son el empleo de un material renovable o el uso de disolventes de baja toxicidad, minimizando los insumos de energía. Con objeto de llevar a cabo el mínimo número de experimentos que generaran la mayor información posible, se propuso un diseño de experimentos basado en la metodología de superficie de respuesta. En el primer capítulo de la presente Tesis, se establecen los parámetros óptimos para la obtención de dos extractos, uno acuoso y otro etanólico, en los que se encuentran los principales compuestos bioactivos característicos del salvado de arroz, los cuales sirven de base para el resto de las investigaciones llevadas a cabo en este Trabajo. El extracto acuoso optimizado, que presentó un mayor rendimiento en compuestos fenólicos, se obtuvo mediante extracción con agua a 41,8 °C durante 138,6

minutos, siendo el producto mayoritariamente obtenido el ácido *trans*-ferúlico. Otros autores han encontrado cantidades similares de este compuesto, pero usando para ello solventes como el metanol o el acetato de etilo (Pang et al., 2018) que presentan una mayor toxicidad, lo cual evidencia la potencialidad de aplicación industrial de nuestros resultados. Por otro lado, para la obtención de la familia  $\gamma$ -oryzanol, uno de los fitoquímicos de mayor relevancia presentes en el salvado de arroz, dada su naturaleza lipófila fue necesario optimizar un proceso extractivo empleando como solvente el etanol, con unas condiciones de extracción de 60 °C durante 97 minutos. Nuestros resultados entran en concordancia con investigaciones previas (Imsanguan et al., 2008).

Dentro de las actuaciones destinadas a la aplicabilidad de estos fitoquímicos en los diferentes sectores, una fase inicial supuso conocer la biodisponibilidad de estos compuestos, que nos indica la capacidad de los compuestos bioactivos para ejercer su función en los tejidos diana. Para ello, los extractos obtenidos bajo las condiciones optimizadas fueron sometidos a diversos procesos *in vitro* que simulan la digestión humana. De los resultados obtenidos en este estudio, se desprende que los compuestos fenólicos mayoritarios en el extracto acuoso, como consecuencia de la ruptura de estructuras complejas para convertirse en compuestos fenólicos simples, aumentaban su biodisponibilidad tras la digestión gástrica, viéndose reducida en los procesos llevados a cabo a nivel de intestinos delgado y grueso. La reducción a nivel intestinal es más acusada en el intestino grueso, que es donde se realiza la absorción mayoritaria de los compuestos hidrófilos. En este mismo sentido, el estudio puso de manifiesto que la biodisponibilidad del extracto liposoluble disminuyó drásticamente en la fase gástrica, posiblemente como consecuencia de la hidrólisis ácida de  $\gamma$ -oryzanol, manteniendo una cierta estabilidad en el resto del proceso. Estos resultados se encuentran en consonancia con otros descritos previamente (Mandak & Nyström, 2012), que se basan en un modelo *in vitro* en diferentes tipos de salvado, y en el que no se tiene en cuenta la acción de la microbiota, aspecto crítico en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (Braune & Blaut, 2016), y que se establece por primera vez en la presente Tesis.

La digestión no sólo afecta a la accesibilidad de estos fitoquímicos, sino que también se ve afectada su funcionalidad (Williamson & Clifford, 2010); por ello, se analizó la actividad antioxidante total a lo largo del proceso de digestión *in vitro*. Los resultados obtenidos indicaron que esta actividad sigue las mismas tendencias expuestas para la biodisponibilidad de los compuestos contenidos en ambos extractos, destacando el aumento de la actividad antioxidante observada en el extracto acuoso a nivel del

intestino grueso, como consecuencia, posiblemente, de las modificaciones moleculares producidas por la microbiota (Williamson & Clifford, 2010).

Una vez optimizado el proceso extractivo, se propuso como objetivo de esta Tesis evaluar otras técnicas que permitieran mejorar el rendimiento de obtención de fitoquímicos, como es la extracción asistida por enzimas, para lo cual se emplearon diversas enzimas hidrolíticas. De las enzimas ensayadas, sólo la celulasa tuvo un efecto significativo en la concentración final de fitoquímicos, por ello las condiciones de extracción se optimizaron exclusivamente para esta enzima. En este sentido, se validaron los parámetros implicados en dicha técnica: temperatura, pH, tiempo y concentración de celulasa. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que ni el rendimiento extractivo de los fitoquímicos empleando la celulasa ni su funcionalidad son relevantes desde el punto de vista de una futura aplicabilidad industrial, ya que no supondría una ventaja competitiva (Carciochi et al., 2017). Por ello, y con objeto de buscar aplicabilidad como modelo productivo industrial al trabajo descrito en la presente Memoria, se descartó esta vía de estudio para la innovación empresarial.

Otra de las fases de este trabajo implicaba la evaluación de las propiedades bioactivas de los extractos mediante modelos *in vitro* e *in vivo*. Por una parte, las técnicas *in vitro* son más factibles de realizar, reproducibles y económicas en la validación de ensayos multiparámetros, mientras que las técnicas *in vivo* resultan más fiables, ya que en muchos de los casos los estudios *in vitro* no son directamente extrapolables a los modelos productivos industriales (Delgado-Adámez, Bote, Parra-Testal, Martín, & Ramírez, 2016). Ambos extractos exhibieron actividad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados (*E. coli* y *L. innocua*), sin embargo, el extracto etanólico mostró una mayor inhibición de la proliferación microbiana. Por el contrario, los estudios de actividad antioxidante *in vitro* mostraron mayor bioactividad en el extracto acuoso respecto del extracto etanólico. Esta bioactividad se debe a la concentración de ácidos fenólicos, principalmente el ácido ferúlico, perteneciente a la familia de los ácidos hidroxicinámicos, cuyas múltiples funciones fisiológicas como capacidad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena o antidiabética, han sido ampliamente descritas (Zduńska, Dana, Kolodziejczak, & Rotsztejn, 2018).

Como ya se indicó anteriormente, para dar aplicabilidad a los extractos dentro de la industria alimentaria deben corroborarse los hallazgos observados *in vitro*, para ello, se propuso un modelo experimental que permitiera la extrapolación directa a los procesos industriales de diversas matrices alimentarias. Se utilizó una emulsión de tipo mayonesa, por su naturaleza tanto hidrófila como lipófila. En este modelo experimental

se ensayaron ambos extractos verificando las propiedades bioactivas exhibidas *in vitro*, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana, así como el potencial, para ambos extractos, como conservante de la emulsión tipo mayonesa respecto de los parámetros color instrumental, pH, estabilidad de la emulsión, peroxidación lipídica y estabilidad microbiológica. Otros autores han descrito la efectividad de los fitoquímicos del arroz en la conservación de alimentos, como es el caso de Supawong et al., (2018) que observaron una reducción en la oxidación lipídica y proteica del pescado equivalente a la lograda por la mezcla BHA/BHT, o Chotimarkorn et al., (2008) que observaron el efecto protector de extractos de salvado de arroz en la oxidación de aceites de atún. Sin embargo, hasta donde nosotros conocemos, no se ha estudiado el rol de estos fitoquímicos en la conservación de alimentos, como aditivos antimicrobianos, si bien sí se ha descrito su papel en la prevención de infecciones bacterianas en modelos clínicos animales (Kondo et al., 2011).

Por todo ello, ambos extractos, acuoso y etanólico, suponen una alternativa real como sucedáneos de los conservantes sintéticos empleados habitualmente en alimentación. Otros autores que han empleado extractos similares en otras matrices alimentarias (Chotimarkorn et al., 2008), respaldan los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral. No obstante, el extracto etanólico presentó unas propiedades más adecuadas como conservante que el acuoso, posiblemente debido a su capacidad para interactuar con la matriz alimentaria, favoreciendo la interacción entre fitoquímicos y moléculas/microorganismos dianas. Son varias las publicaciones que ponen de manifiesto que las actividades bioactivas exhibidas por los extractos naturales se producen, principalmente, por contacto directo (Martillanes et al., 2017). En general, los extractos acuosos presentan mayor dificultad para difundirse en la matriz alimentaria y, por tanto, las actividades encontradas en estudios *in vitro* no se presentan con la misma intensidad (Amaro-Blanco, Delgado-Adámez, Martín, Ramírez, et al., 2018).

En este sentido, y atendiendo a la viabilidad de la investigación, se abordó el estudio con el extracto etanólico en modelos cárnicos reales, *burger meat* de cerdo y jamón ibérico loncheado; validándolo tanto como aditivo alimentario como principio bioactivo de envases activos.

En primer lugar, se estudió el empleo del extracto etanólico como aditivo alimentario para combatir los procesos oxidativos y deterioro microbiológico en *burger meat* de cerdo. Para ello, se realizaron aplicaciones combinadas con nuevas tecnologías de conservación como son las altas presiones hidrostáticas. Se estudiaron parámetros tanto físico-químicos (color instrumental, oxidación lipídica y oxidación proteica) como

microbiológicos para determinar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de extracto y de su combinación con las altas presiones hidrostáticas, tanto en el momento de elaboración como durante la vida útil del producto. Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que los tratamientos aplicados conseguían una ligera mejoría de todos los parámetros estudiados al día 0 de análisis, haciéndose estas diferencias más evidentes durante el almacenamiento respecto a las muestras control, lo cual puso de manifiesto, por un lado, que las altas presiones generan daños subletales en los microorganismos con una pérdida de viabilidad durante el almacenamiento (Schottroff et al., 2018) y, por otro, se constata que los extractos no exhiben una alta capacidad para revertir los procesos de oxidación o higienización de los productos, pero sí para prevenir la oxidación lipídica y para controlar la proliferación de microorganismos patógenos causantes del deterioro de los alimentos. Otros autores han encontrado resultados similares en la aplicación de extractos en hamburguesas (Abdel-Naeem & Mohamed, 2016; Andrés et al., 2017b; Lorenzo et al., 2018). Asimismo, otros parámetros, como son las propiedades organolépticas, que no están directamente relacionados con el deterioro del alimento pero que constituyen índices de calidad en la comercialización, no se ven alterados por los tratamientos aplicados tras el cocinado requerido para su consumo.

Una vez validada la efectividad de los extractos como aditivo natural, se planteó el estudio de la viabilidad de éstos como componentes del envase. Esto supuso un nuevo reto, ya que, como se indicó anteriormente, su actividad depende en gran medida del contacto con la matriz alimentaria, y han de tenerse en cuenta la capacidad de los extractos para migrar del film del envasado hasta el alimento. Para la incorporación de principios activos pueden emplearse varias tecnologías, entre las que destacan la impregnación del film y la incorporación, por su facilidad de aplicación y su viabilidad técnica dado el carácter termolábil de algunos fitoquímicos, de polímeros de baja temperatura de polimerización. En este sentido, inicialmente se procedió a la impregnación del film de envasado de jamón loncheado con el extracto etanólico, obteniéndose un envase con una película bioactiva que al contacto con el jamón envasado al vacío difundía hacia éste ejerciendo una acción protectora. Para evaluar su aplicabilidad industrial, se realizaron estudios de caracterización sensorial, físico-química y microbiológica, después del procesado y a lo largo de seis meses de conservación, tanto a temperaturas de refrigeración, que son las habitualmente empleadas para este tipo de productos, como a temperatura ambiente. En este sentido, se observó que los tratamientos no afectaron sustancialmente a los parámetros relacionados con la calidad percibida por los consumidores, como son el color

instrumental, los parámetros sensoriales y la rancidez, pero, a su vez, el envasado activo mejoró los parámetros relacionados con la vida útil del producto, conservando durante mayor tiempo la calidad e inocuidad de éstos a ambas temperaturas de estudio. Los datos empíricos obtenidos en esta investigación son concluyentes y concordantes con otras investigaciones donde se emplearon condiciones de estudio similares (Garriga et al., 2004; Pateiro et al., 2019). Por ello, los extractos etanólicos se proponen como una alternativa que puede aplicarse en el envasado activo de alimentos con el objeto de ampliar su vida útil.

Pese a haber obtenido estos resultados prometedores, y teniendo en cuenta que en los últimos años se está creando una conciencia social encaminada a minimizar el uso de envasados plásticos en alimentación, sobre todo aquellos de un solo uso, se hace necesario un cambio en el modelo productivo. En este proceso, las nuevas tendencias en el envasado de alimentos deben basarse en la utilización de biopolímeros o plásticos biodegradables. Por ello, se contemplaron diversas sustancias para la obtención de biopolímeros que mantuvieran la coherencia de sostenibilidad y bioeconomía marcada como objetivo general de esta Tesis Doctoral, siendo la fuente del polímero seleccionado, la quitina, un subproducto de la agroindustria del sector del marisco, los caparzones de crustáceos.

Antes del estudio precomercialización de este biopolímero activo como sistema de envasado de alimentos, fueron necesarios realizar estudios que permitieran evaluar la viabilidad de los mismos y, por ello, se propuso realizar un estudio que, basado en modelos matemáticos, permitiera predecir la efectividad de este biopolímero frente a la inactivación de un patógeno alimentario como es *L. monocytogenes*. Para ello, se estableció un modelo de experimentación basado en un *challenge test* en el que se ensayaron diversas formulaciones de biopolímeros y se aplicaron altas presiones como tecnología de conservación en una estrategia multibarrera que, con una menor intensidad de los tratamientos de procesado de los productos, garantizara la alta calidad del jamón loncheado, muy apreciada por el consumidor. Los resultados descritos en el último capítulo ponen de relevancia un hito en investigaciones de este ámbito, ya que la combinación de ambas tecnologías logra la reducción de hasta 6 log UFC g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* presentes en el jamón loncheado. Esto muestra que la sinergia que se establece entre los diferentes componentes del biopolímero que también exhiben propiedades antimicrobianas, no sólo tienen un efecto de conservación ralentizando la proliferación de los microorganismos, sino que actúa inactivando altas concentraciones de patógenos, de esta forma se reducen los riesgos de intoxicación alimentaria. Otros autores han descrito efectos similares que confirman nuestros hallazgos (Hereu, Bover-



Cid, Garriga, & Aymerich, 2012), pero sin llegar a alcanzar estos niveles de protección para el consumidor final.

Nuestro grupo de investigación está desarrollando nuevas investigaciones en una fase preindustrial de la aplicación de este biopolímero al envasado del jamón loncheado, así como su preservación durante la vida útil del mismo con resultados preliminares muy prometedores.



Conclusiones



## VII. Conclusiones

1.- La extracción de los fitoquímicos del salvado de arroz depende principalmente del disolvente utilizado y en menor medida de la temperatura y el tiempo de extracción. Los compuestos fenólicos se extrajeron del salvado de arroz con agua, siendo el ácido ferúlico el más abundante en el extracto, mientras que la familia del  $\gamma$ -oryzanol se obtuvo con etanol al 100%. El extracto rico en ácido ferúlico presentó biodisponibilidad y conservó parte de su actividad antioxidante, mientras que el  $\gamma$ -oryzanol del extracto etanólico no se encontró biodisponible en ninguna etapa de la digestión.

2.- La enzima celulasa fue la única que presentó la capacidad de mejorar significativamente el proceso de extracción de compuestos bioactivos del salvado de arroz, siendo las condiciones óptimas para su extracción 35 °C, pH 3.0, 4 horas y 1,0 % de celulasa. Todos estos parámetros afectaron de forma significativa a la concentración de compuestos fenólicos extraídos, sin embargo, la influencia en la actividad antioxidante fue muy limitada. Desde el punto de vista de su aplicabilidad industrial, esta mejora en la extracción no fue relevante como para continuar estudiando esta metodología de extracción.

3.- Ambos extractos mostraron poseer capacidad antioxidante y antimicrobiana en modelos *in vitro*. Sin embargo, cuando se utiliza una emulsión de tipo mayonesa como modelo *in vivo*, el extracto etanólico presentó mayor capacidad, a diferentes temperaturas, que el extracto acuoso para prevenir la oxidación y el crecimiento de microorganismos durante el almacenamiento. Por ello, se propone el extracto etanólico como alternativa viable de origen natural en la conservación de productos cárnicos para sucesivos estudios.

4.- El extracto etanólico de salvado de arroz aplicado en un 1 y un 2% consiguió retrasar significativamente la oxidación lipídica y proteica en *burger meat* de cerdo, sin que fuera detectado por los panelistas cuando las muestras se trataron con alta presión. La combinación del extracto con alta presión fue muy efectiva en la inactivación de microorganismos, manteniéndose la carne en condiciones óptimas durante 21 días a temperatura de refrigeración.

5.- El extracto de salvado de arroz con alto contenido en  $\gamma$ -oryzanol aplicado sobre films plásticos empleados habitualmente en el envasado activo de jamón ibérico loncheado previno la oxidación lipídica y el deterioro microbiológico, manteniendo la calidad organoléptica durante su vida útil en refrigeración y no así a temperatura ambiente. Este extracto fue eficaz tanto solo o cuando se aplica en combinación con altas presiones.

6.- El tratamiento de altas presiones hidrostáticas optimizado mediante superficie de respuesta para la inactivación de *L. monocytogenes* en jamón ibérico loncheado supone la aplicación de 600 MPa durante ocho minutos. Asimismo, un biopolímero al que se añadieron 0,25 g de extracto rico en  $\gamma$ -oryzanol por cada 100 gramos, presentó capacidad de inhibir el patógeno inoculado, siendo la combinación de ambos tratamientos la que garantizó la inocuidad de este producto cárnico reduciendo 6 log UFC g<sup>-1</sup> de dicho patógeno.

## Conclusions

1.- The phytochemical extraction of rice bran depended mainly on the solvent used and, in lesser extent, on the temperature and time of extraction. Phenolic compounds were extracted from rice bran with water, with ferulic acid being the most abundant in the extract, while the  $\gamma$ -oryzanol family was extracted with 100% ethanol. The extract rich in ferulic acid was bioavailable and maintained some of its antioxidant activity during digestion, while the  $\gamma$ -oryzanol from the ethanol extract was not found to be bioavailable at any step of digestion.

2.- Cellulase was the only enzyme that showed the ability to significantly improve the process of extraction of bioactive compounds from rice bran, with the optimal conditions for extraction being 35 °C, pH 3.0, 4 hours and 1.0 % of cellulase. All these parameters significantly affected the concentration of extracted phenolic compounds, however, the influence on the antioxidant activity was very limited. From the point of view of its industrial applicability, this improvement in extraction was not relevant enough to continue studying this extraction methodology.

3.- Both extracts showed antioxidant and antimicrobial capacity in *in vitro* models. However, when a mayonnaise-type emulsion was used as an *in vivo* model, the ethanolic extract showed higher ability to prevent oxidation and growth of microorganisms during storage, at different temperatures, than the aqueous extract. For this reason, the ethanolic extract was proposed as a viable alternative of natural origin in the preservation of meat products for subsequent studies.

4.- The ethanolic extract of rice bran applied in 1 and 2% was able to significantly delay lipid and protein oxidation in pork burger meat, without being detected by the panellists when the samples were treated with high pressure. The combination of the extract with high pressure was very effective in inactivating microorganisms, keeping the meat in optimum conditions for 21 days at refrigeration temperature.

5.- Rice bran extract with a high content of  $\gamma$ -oryzanol applied to plastic films regularly used in the active packaging of sliced Iberian ham prevented lipid oxidation and microbiological deterioration, maintaining the organoleptic quality during its shelf life when refrigerated but not at room temperature. This extract was effective either alone or when applied in combination with high pressure.

6.- The high hydrostatic pressure treatment optimised by response surface for the inactivation of *L. monocytogenes* in sliced Iberian ham involves the application of 600 MPa for eight minutes. Likewise, a biopolymer to which 0.25 g of extract rich in  $\gamma$ -oryzanol

was added per 100 grams, showed the capacity to inhibit the inoculated pathogen. The combination of both treatments guaranteed the innocuousness of this meat product by reducing 6 log CFU g<sup>-1</sup> of the pathogen.



## Bibliografía



## Bibliografía

- Abdel-Naeem, H. H. S., & Mohamed, H. M. H. (2016). Improving the physico-chemical and sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. *Meat Science*, *118*, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.021>
- Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(21), 6182–6187.
- Al-nehlawi, A., Guri, S., Guamis, B., & Saldo, J. (2014). Synergistic effect of carbon dioxide atmospheres and high hydrostatic pressure to reduce spoilage bacteria on poultry sausages. *LWT - Food Science and Technology*, *58*(2), 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.041>
- Alves, F. C. B., Barbosa, L. N., Andrade, B. F. M. T., Albano, M., Furtado, F. B., Marques Pereira, A. F., ... Júnior, A. F. (2016). Short communication: Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. *Journal of Dairy Science*, *99*(3), 1831–1836. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2015-10025>
- Amaro-Blanco, G., Delgado-Adámez, J., Martín, M. J., & Ramírez, R. (2018). Active packaging using an olive leaf extract and high pressure processing for the preservation of sliced dry-cured shoulders from Iberian pigs. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *45*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.017>
- Andrés, A. I., Petrón, M. J., Delgado-Adámez, J., López, M., & Timón, M. L. (2017a). Food by-products as potential antioxidant and antimicrobial additives in chill stored raw lamb patties. *Meat Science*, *129*, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.013>
- Andres, A. I., Petron, M. J., Delgado-Adamez, J., Lopez, M., & Timon, M. (2017b). Effect of Tomato Pomace Extracts on the Shelf-Life of Modified Atmosphere-Packaged Lamb Meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(4), e13018.
- Andrés, A. I., Møller, J. K. S., Adamsen, C. E., & Skibsted, L. H. (2004). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *European Food Research and Technology*, *219*(3), 205–210.
- Arab, F., Alemzadeh, I., & Maghsoudi, V. (2011). Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Scientia Iranica*, *18*(6), 1402–1406. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.09.014>

- Arnau, J. (2013). *Principales problemas tecnológicos en la elaboración del jamón curado*.
- Baines, D., & Seal, R. (2012). *Natural food additives, ingredients and flavourings*. New Delhi, India: Elsevier.
- Bajovic, B., Bolumar, T., & Heinz, V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Science*, 92(3), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.024>
- Bak, K. H., Bolumar, T., Karlsson, A. H., Lindahl, G., & Orlie, V. (2019). Effect of high pressure treatment on the color of fresh and processed meats: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(2), 228–252.
- Bano, N., Younas, T., Shoaib, F., Rashid, D., & Jaffri, N. (2020). Plastic: Reduce, Recycle, and Environment. In *Environmentally-Benign Energy Solutions* (pp. 191–208). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-20637-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20637-6_10)
- Bearth, A., Cousin, M.-E., & Siegrist, M. (2014). The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. *Food Quality and Preference*, 38, 14–23.
- Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429–452. <https://doi.org/10.1111/nure.12114>
- Boulila, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Amor, I. Ben, Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Industrial Crops and Products*, 74, 485–493.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Aymerich, T., & Garriga, M. (2015). Modeling the protective effect of aw and fat content on the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *Food Research International*, 75, 194–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.052>
- Braune, A., & Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, 7(3), 216–234. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>
- Breukink, E., Van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., ... De Kruijff, B. (2003). Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19898–19903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301463200>

- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21(7), 901.
- Butsat, S., & Siriamornpun, S. (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119(2), 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.001>
- Campus, M. (2010). High pressure processing of meat, meat products and seafood. *Food Engineering Reviews*, 2(4), 256–273.
- Carciochi, R. A., D'Alessandro, L. G., Vauchel, P., Rodriguez, M. M., Nolasco, S. M., & Dimitrov, K. (2017). Valorization of Agrifood By-Products by Extracting Valuable Bioactive Compounds Using Green Processes. In *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food* (pp. 191–228). Elsevier.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- Cava, R., Ventanas, J., Ruiz, J., Andrés, A. I., & Antequera, T. (2000). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. *Food Science and Technology International*, 6, 235–242.
- Cava, R, Higuero, N., & Ladero, L. (2020). High-pressure processing and storage temperature on *Listeria monocytogenes*, microbial counts and oxidative changes of two traditional dry-cured meat products. *Meat Science*, 171, 108273.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., & Ramírez, M. R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(1), 76–81.
- Cheetangdee, N., & Benjakul, S. (2016). Oxidation and colloidal stability of oil-in-water emulsion as affected by pigmented rice hull extracts. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(4), 519–529.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46(3), 211–236.
- Chotimarkorn, C., Benjakul, S., & Silalai, N. (2008). Antioxidative effects of rice bran extracts on refined tuna oil during storage. *Food Research International*, 41(6), 616–622.

- Coles, L. T., Moughan, P. J., & Darragh, A. J. (2005). *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 421–444.
- Commission, E. (2011). Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union*, 295, 1–177.
- Cui, H. Y., Wu, J., Li, C. Z., & Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8598–8606. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2016-11658>
- de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2016). Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chemistry*, 212, 395–402.
- de Sousa Guerra, C. G., Aguiar, J. P. L., Duncan, W. L. P., Kluckzosvki, A. M., & do Amaral Souza, F. das C. (2017). Effect of Brazil nut oil (*Bertholletia excelsa* HBK) on the physical, chemical, sensory and microbiological characteristics of a mayonnaise-type emulsion. *African Journal of Biotechnology*, 16(13), 657–663.
- del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Delgado-Adámez, J., Fernández-León, M. F., Velardo-Micharet, B., & González-Gómez, D. (2012). *In vitro* assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2481–2486.
- Delgado-Adámez, J., Gamero- Samino, E., Valdés Sánchez, E., & González-Gómez, D. (2012). *In vitro* estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 24(1–2), 136–141.
- Delgado-Adámez, J., Bote, E., Parra-Testal, V., Martín, M. J., & Ramírez, R. (2016). Effect of the olive leaf extracts in vitro and in active packaging of sliced Iberian pork

- loin. *Packaging Technology and Science*, 29(12), 649–660.
- Depree, J. A., & Savage, G. P. (2001). Physical and flavour stability of mayonnaise. *Trends in Food Science and Technology*, 12(5–6), 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00079-6)
- Devcich, D. A., Pedersen, I. K., & Petrie, K. J. (2007). You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, 48(3), 333–337.
- Domínguez, B. M., & Hernando, B. R. (2012). Effect of storage temperature on survival of *Listeria monocytogenes* inoculated on dry cured iberian meat products. In *Microbes In Applied Research: Current Advances and Challenges* (pp. 253–257). World Scientific.
- Dreosti, I. E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, 16(7), 692–694.
- Elder, A. S., Coupland, J. N., & Elias, R. J. (2019). Antioxidant activity of a winterized, acetic rye bran extract containing alkylresorcinols in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 272, 174–181.
- Espina, L., García-Gonzalo, D., Laglaoui, A., Mackey, B. M., & Pagán, R. (2013). International Journal of Food Microbiology Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 161(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.015>
- Espinal-Ruiz, M., Restrepo-Sánchez, L.-P., Narvaez-Cuenca, C.-E., & McClements, D. (2015). Impact of pectin properties on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of citrus and banana passion fruit (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*) pectins. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 52). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.042>
- EURL-Lm. (2014). Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *EURL Lm-ANSES*, 1–47.
- Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R. D., & Johnson, S. K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 60–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.002>
- Farhoosh, R., Tavassoli-Kafrani, M. H., & Sharif, A. (2011). Antioxidant activity of sesame, rice bran and bene hull oils and their unsaponifiable matters. *European*

- Journal of Lipid Science and Technology*, 113(4), 506–512.  
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201000402>
- Fernández León, A. M. (2015). *Estudio de la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos funcionales presentes en brócoli y col de milán*. Universidad de Extremadura.
- Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2011). The effects of high hydrostatic pressure on the polyphenols and anthocyanins in red fruit products. *Procedia Food Science*, 1, 847–853.
- Ferreira, M., Almeida, A., Delgadillo, I., Saraiva, J., & Cunha, A. (2016). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to high pressure processing: A review. *Food Reviews International*, 32(4), 377–399.
- Franquet Bernis, J. M., & Borràs Pàmies, C. (2004). *Varietades y mejora del arroz (Oryza sativa, L.)* (Primera Ed). Tortosa: Universitat Internacional de Catalunya.
- Garriga, M., Grèbol, N., Monfort, J. M., & Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, 451–457.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.07.001>
- Ghorbani Gorji, S., Smyth, H. E., Sharma, M., & Fitzgerald, M. (2016). Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 56, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.002>
- González-Gómez, D., Cardoso, V., Bohoyo, D., Ayuso, M. C., & Delgado-Adamez, J. (2014). Application of experimental design and response surface methodology to optimize the procedure to obtain a bactericide and highly antioxidant aqueous extract from orange peels. *Food Control*, 35(1), 252–259.
- Goodyear, A., Kumar, A., Ehrhart, E. J., Swanson, K. S., Grusak, M. A., Leach, J. E., ... Ryan, E. P. (2015). Dietary rice bran supplementation prevents Salmonella colonization differentially across varieties and by priming intestinal immunity. *Journal of Functional Foods*, 18, 653–664.
- Goufo, P., & Trindade, H. (2014). Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid. *Food Science & Nutrition*, 2(2), 75–104.
- Guil-Guerrero, J. L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J. C., Carlosama-Yeppez, M., & Ruales, P. (2016). Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review



- focusing on the tropics. *Livestock Science*, 189, 32–49. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.021>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals, other reactive species and disease. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3, 617–783.
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.040>
- Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Alfarez, M.-J., & Vazquez, C. (1998). The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. *Nutrition*, 14(6), 513–520.
- Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., & Aymerich, T. (2012). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.027>
- Hermund, D. B., Yeşiltaş, B., Honold, P., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., & Jacobsen, C. (2015). Characterisation and antioxidant evaluation of Icelandic *F. vesiculosus* extracts *in vitro* and in fish-oil-enriched milk and mayonnaise. *Journal of Functional Foods*, 19, 828–841. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.020>
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73–82.
- Huang, H. W., Wu, S. J., Lu, J. K., Shyu, Y. T., & Wang, C. Y. (2017). Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, 72(12), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.019>
- Hunt, M. C., King, A., Barbut, S., Clause, J., Cornforth, D., Hanson, D., ... Mohan, A. (2012). Meat Color Measurement Guidelines. In *American Meat Science Association, Champaign, Illinois USA* (Vol. 61820).
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12.
- Huynh, N. T., Smagghe, G., Gonzales, G. B., Van Camp, J., & Raes, K. (2014). Enzyme-assisted extraction enhancing the phenolic release from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) outer leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- 62(30), 7468–7476.
- ICMSF. (2004). Microorganismos indicadores. In *Microorganismos de los alimentos. 1. Técnicas de análisis microbiológico* (pp. 3–5). Zaragoza: Acribia.
- Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borirak, R., Pongamphai, S., Douglas, S., & Douglas, P. L. (2008). Extraction of  $\alpha$ -tocopherol and  $\gamma$ -oryzanol from rice bran. *LWT - Food Science and Technology*, 41(8), 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.028>
- Iqbal, S., Bhangar, M., & Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, 93, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.024>
- Jeng, T. L., Shih, Y. J., Ho, P. T., Lai, C. C., Lin, Y. W., Wang, C. S., & Sung, J. M. (2012).  $\gamma$ -Oryzanol, tocol and mineral compositions in different grain fractions of giant embryo rice mutants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1468–1474.
- Jia, N., Kong, B., Liu, Q., Diao, X., & Xia, X. (2012). Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage. *Meat Science*, 91(4), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.010>
- Jongberg, S., Skov, S. H., Tørngren, M. A., Skibsted, L. H., & Lund, M. N. (2011). Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. *Food Chemistry*, 128(2), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.015>
- Jovanović, G. D., Klaus, A. S., & Nikšić, M. P. (2016). Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(2), 128–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.02.003>
- Juliano, B. O. (1994). *El arroz en la nutrición humana*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Kameník, J., Saláková, A., Hulánková, K., & Borilova, G. (2015). The effect of high pressure on the microbiological quality and other characteristics of cooked sausages packed in a modified atmosphere or vacuum. *Food Control*, 57, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.010>
- Ketelsen, M., Janssen, M., & Hamm, U. (2020). Consumers' response to

- environmentally-friendly food packaging - A systematic review. *Journal of Cleaner Production*, 254, 120123. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120123>
- Khaneghah, A. M., Hashemi, S. M. B., & Limbo, S. (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioprocess Processing*, 111, 1–19.
- Kim, J. S., Suh, M. H., Yang, C. B., & Lee, H. G. (2003). Effect of  $\gamma$ -oryzanol on the flavor and oxidative stability of refrigerated cooked beef. *Journal of Food Science*, 68(8), 2423–2429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07040.x>
- Kim, S.-M., & Lim, S.-T. (2016). Enhanced antioxidant activity of rice bran extract by carbohydrase treatment. *Journal of Cereal Science*, 68, 116–121.
- Kołodziejczyk, K., Sójka, M., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S., & Baron, A. (2013). Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Industrial Crops and Products*, 51, 279–288.
- Komiyama, Y., Andoh, A., Fujiwara, D., Ohmae, H., Araki, Y., Fujiyama, Y., ... Kanauchi, O. (2011). New prebiotics from rice bran ameliorate inflammation in murine colitis models through the modulation of intestinal homeostasis and the mucosal immune system. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 46(1), 40–52.
- Kondo, S., Teongtip, R., Srichana, D., & Itharat, A. (2011). Antimicrobial activity of rice bran extracts for diarrheal disease. In *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*.
- Kumar, A., Henderson, A., Forster, G. M., Goodyear, A. W., Weir, T. L., Leach, J. E., ... Ryan, E. P. (2012). Dietary rice bran promotes resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonization in mice. *BMC Microbiology*, 12(1), 71.
- Lai, P., Li, K. Y., Lu, S., & Chen, H. H. (2009). Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. *Food Chemistry*, 117(3), 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.031>
- Landbo, A.-K., & Meyer, A. S. (2001). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3169–3177.
- Lee, S.-J., Lee, S. Y., Chung, M.-S., & Hur, S. J. (2016). Development of novel *in vitro* human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. *Journal of Functional Foods*, 22, 113–121.

<https://doi.org/10.1016/J.JFF.2016.01.005>

- Leheska, J. M., Boyce, J., Brooks, J. C., Hoover, L. C., Thompson, L. D., & Miller, M. F. (2006). Sensory attributes and phenolic content of precooked pork breakfast sausage with fruit purees. *Journal of Food Science*, *71*(3), S249–S252.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B. ena, Zielinski, R., Soffers, A. E., & Rietjens, I. M. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*(7), 869–881.
- Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., Simó-Alfonso, E. F., Mendonça, C. R. B., & Ramis-Ramos, G. (2009). Composition, industrial processing and applications of rice bran  $\gamma$ -oryzanol. *Food Chemistry*, *115*(2), 389–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.063>
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*, *48*(2), 189–196.
- Li, C. Y., Kim, H. W., Li, H., Lee, D. C., & Rhee, H. I. (2014). Antioxidative effect of purple corn extracts during storage of mayonnaise. *Food Chemistry*, *152*, 592–596. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.152>
- Li, X., Hu, H., Xu, F., Liu, Z., Zhang, L., & Zhang, H. (2019). Effects of aleurone-rich fraction on the hydration and rheological properties attributes of wheat dough. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(5), 1777–1786.
- Lima, V. L. A. G., Mélo, E. A., Maciel, M. I. S., Prazeres, F. G., Musser, R. S., & Lima, D. E. S. (2005). Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry*, *90*(4), 565–568.
- Lopez-Bote, C. J. (1998). Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Science*, *49*, S17–S27.
- Lorenzo, J. M., Vargas, F. C., Strozzi, I., Furtado, M. M., Ana, A. S. S., Barba, F. J., ... José, P. (2018). Influence of pitanga leaf extracts on lipid and protein oxidation of pork burger during shelf-life. *Food Research International*, *114*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.046>
- Lu, W., Niu, Y., Yang, H., Sheng, Y., Shi, H., & Yu, L. (2014). Simultaneous HPLC quantification of five major triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran oil using a single reference standard. *Food Chemistry*, *148*, 329–334.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.027>

- Ma, H. J., Ledward, D. A., Zamri, A. I., Frazier, R. A., & Zhou, G. H. (2007). Effects of high pressure/thermal treatment on lipid oxidation in beef and chicken muscle. *Food Chemistry*, *104*(4), 1575–1579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.006>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747.
- Mandak, E., & Nyström, L. (2012). The effect of in vitro digestion on steryl ferulates from rice (*Oryza sativa* L.) and other grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(24), 6123–6130. <https://doi.org/10.1021/jf300781a>
- Martillanes, S., Ayuso-Yuste, M. C., Gil, M. V., Manzano-Durán, R., & Delgado-Adámez, J. (2018). Bioavailability, composition and functional characterization of extracts from *Oryza sativa* L. bran. *Food Research International*, *111*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.057>
- Martillanes, S., Ramírez, R., Amaro-Blanco, G., Ayuso-Yuste, M. C., Gil, M. V., & Delgado-Adámez, J. (2020). Effect of rice bran extract on the preservation of pork burger treated with high pressure processing. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(1), e14313. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14313>
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., & Delgado-Adámez, J. (2017). Application of Phenolic Compounds for Food Preservation: Food Additive and Active Packaging. In . In M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, & M. del R. Garcia-Mateos (Eds.), *Phenolic Compounds - Biological Activity* (pp. 39–58). <https://doi.org/10.5772/66885>
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Victoria Gil, M. V., Ayuso-Yuste, M. C., & Delgado-Adámez, J. (2020). Antioxidant and antimicrobial evaluation of rice bran (*Oryza sativa* L.) extracts in a mayonnaise-type emulsion. *Food Chemistry*, *308*, 125633. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125633>
- Martín-Vertedor, D., Garrido, M., Pariente, J. A., Espino, J., & Delgado-Adámez, J. (2016). Bioavailability of Bioactive Molecules from Olive Leaf Extracts and its Functional Value. *Phytotherapy Research*, (October 2015), 1172–1179. <https://doi.org/10.1002/ptr.5625>
- Mataix Verdú, J., & Martínez de Victoria, E. (1988). *El aceite de oliva. Bases para el futuro*. Jaén: Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias.

- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. Boca Ratón, EEUU: CRC press.
- Medina-Meza, I. G., Barnaba, C., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2014). Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.10.012>
- Méndez-Cid, F. J., Lorenzo, J. M., Martínez, S., & Carballo, J. (2017). Oxidation of edible animal fats. Comparison of the performance of different quantification methods and of a proposed new semi-objective colour scale-based method. *Food Chemistry*, 217, 743–749.
- Min, B., McClung, A. M., & Chen, M. (2011). Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *Journal of Food Science*, 76(1), C117–C126.
- Montiel, R., Peirotén, Á., Ortiz, S., Bravo, D., Gaya, P., Martínez-Suárez, J. V., ... Medina, M. (2020). Inactivation of *Listeria monocytogenes* during dry-cured ham processing. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108469. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108469>
- Morales, P., Calzada J., & Núñez, M. (2006). Effect of High-Pressure Treatment on the Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in Sliced Vacuum-Packaged Iberian and Serrano Cured Hams. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2539–2543. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.10.2539>
- Muñoz, I., Díaz, M. T., Apeleo, E., Pérez-Santaescolástica, C., Rivas-Cañedo, A., Pérez, C., ... Fuente, J. de la. (2017). Valorisation of an extract from olive oil waste as a natural antioxidant for reducing meat waste resulting from oxidative processes. *Journal of Cleaner Production*, 140, 924–932. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.175>
- Mun, S., Kim, Y. L., Kang, C. G., Park, K. H., Shim, J. Y., & Kim, Y. R. (2009). Development of reduced-fat mayonnaise using 4 $\alpha$ GTase-modified rice starch and xanthan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(5), 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.02.008>
- Munekata, P. E. S., Paseto Fernandes, R. de P., de Melo, M. P., Trindade, M. A., & Lorenzo, J. M. (2016). Influence of peanut skin extract on shelf-life of sheep patties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(7), 586–596. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.05.002>
- Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., & Rizvi, S. S. H. (2015). Enzyme-

- assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 122–131.
- Mushtaq, M., Sultana, B., Bhatti, H. N., & Asghar, M. (2015). RSM based optimized enzyme-assisted extraction of antioxidant phenolics from underutilized watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) rind. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5048–5056.
- Myers, R. H., & Montgomery, D. C. (1995). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments* (Vol. 4). Wiley New York.
- Nagendra Chari, K. L., Manasa, D., Srinivas, P., & Sowbhagya, H. B. (2013). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food Chemistry*, 139(1–4), 509–514.
- Naveena, B. M., Sen, A. R., Kingsly, R. P., Singh, D. B., & Kondaiah, N. (2008). Antioxidant activity of pomegranate rind powder extract in cooked chicken patties. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(10), 1807–1812.
- Neri, D., Antoci, S., Iannetti, L., Ciorba, A. B., D'Aurelio, R., Del Matto, I., ... Migliorati, G. (2019). EU and US control measures on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in certain ready-to-eat meat products: An equivalence study. *Food Control*, 96, 98–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.001>
- Nicoli, M. C., Calligaris, S., & Manzocco, L. (2000). Effect of enzymatic and chemical oxidation on the antioxidant capacity of catechin model systems and apple derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4576–4580.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., & Stadtman, E. R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5488–5491.
- Özkan, G., & Bilek, S. E. (2015). Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food Chemistry*, 176, 152–157.
- Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medrano, A., Goñi, M. G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2018). Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 25–31.
- Pang, Y., Ahmed, S., Xu, Y., Beta, T., Zhu, Z., Shao, Y., & Bao, J. (2018). Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and

- black rice. In *Food Chemistry* (Vol. 240).  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.095>
- Parra, V., Viguera, J., Sánchez, J., Peinado, J., Espárrago, F., Gutierrez, J. I., & Andrés, A. I. (2010). Modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period chilled storage of dry-cured Iberian ham. *Meat Science*, *84*(4), 760–768.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.11.013>
- Pascual, M. del R., & Calderón, V. (2000). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. *Madrid, España: Díaz de Santos*.
- Pateiro, M., Domínguez, R., Bermúdez, R., Munekata, P. E. S., Zhang, W., Gagaoua, M., & Lorenzo, J. M. (2019). Antioxidant active packaging systems to extend the shelf life of sliced cooked ham. *Current Research in Food Science*, *1*, 24–30.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crf.2019.10.002>
- Pérez-Baltar, A., Serrano, A., Montiel, R., & Medina, M. (2020). *Listeria monocytogenes* inactivation in deboned dry-cured hams by high pressure processing. *Meat Science*, *160*, 107960. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107960>
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004). Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(5), 1177–1180.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 2111–2117.
- Pinelo, M., Zornoza, B., & Meyer, A. S. (2008). Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. *Separation and Purification Technology*, *63*(3), 620–627.
- Pinelo, M., Molina M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, *85*(2), 267–273.
- Possas, A., Valdramidis, V., García-Gimeno, R. M., & Pérez-Rodríguez, F. (2019). High hydrostatic pressure processing of sliced fermented sausages: A quantitative exposure assessment for *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *52*(October 2018), 406–419.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.01.017>



- Proctor, A., & Bowen, D. J. (1996). Ambient-Temperature Extraction of Rice Bran Oil with Hexane and Isopropanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(6), 811–813.
- Prokopov, T., Nikolova, M., Dobrev, G., & Taneva, D. (2017). Enzyme-assisted extraction of carotenoids from Bulgarian tomato peels. *Acta Alimentaria*, 46(1), 84–91.
- Pu, C., & Tang, W. (2017). The antibacterial and antibiofilm efficacies of a liposomal peptide originating from rice bran protein against *Listeria monocytogenes*. *Food & Function*, 8(11), 4159–4169.
- Ramírez, M. R., & Cava, R. (2008). Effect of Iberianx Duroc genotype on composition and sensory properties of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(4), 667–675.
- Rodrigues, I., Trindade, M. A., Caramit, F. R., Candoğan, K., Pokhrel, P. R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). Effect of high pressure processing on physicochemical and microbiological properties of marinated beef with reduced sodium content. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38 (B), 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.020>
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., & Estévez, M. (2011). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat Science*, 89(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.013>
- Rodríguez Marín, P. (2018). La exportación de jamón curado en España. *Distribución y Consumo*, 2, 18-24.
- Rubio, B., Possas, A., Rincón, F., García-Gímeno, R. M., & Martínez, B. (2018). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation by high hydrostatic pressure processing in Spanish chorizo sausage. *Food Microbiology*, 69, 18–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.012>
- Ruiz, J., Garcia, C., Muriel, E., Andrés, A. I., & Ventanas, J. (2002). Influence of sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science*, 61(4), 347–354.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andres, A., & Garcia, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52(1), 19–27. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(98\)00144-2](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00144-2)

- Rutherford, T. J., Marshall, D. L., Andrews, L. S., Coggins, P. C., Wes Schilling, M., & Gerard, P. (2007). Combined effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. *Food Microbiology*, 24(7), 703–710. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.011>
- Sabio, E., Vidal-Aragón, M. C., Bernalte, M. J., & Gata, J. L. (1998). Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. *Food Chemistry*, 61(4), 493–503. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00079-4)
- Schottroff, F., Fröhling, A., Zunabovic-Pichler, M., Krottenthaler, A., Schlüter, O., & Jäger, H. (2018). Sublethal injury and viable but non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2773.
- Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485–6501. <https://doi.org/10.1021/jf902107d>
- Shah, M. A., Bosco, S. J. D., & Mir, S. A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.020>
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 32(1), 67–103.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4067–4079.
- Shao, Y., & Bao, J. (2015). Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. *Food Chemistry*, 180, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.027>
- Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., & Beta, T. (2014). Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 59(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.01.004>
- Sharif, M. K., Butt, M. S., Anjum, F. M., & Khan, S. H. (2014). Rice Bran: A Novel Functional Ingredient. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), 807–816. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608586>
- Soares Carochó, M. (2017). *Development of new foods: incorporation of plant extracts*

- as functional ingredients and natural preservatives. Universidad Complutense de Madrid.
- Sokołowska, B., Skapska, S., Niezgoda, J., Rutkowska, M., Dekowska, A., & Rzoska, S. J. (2014). Inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice. *High Pressure Research*, 34(1), 147–155.
- Sørensen, G., & Jørgensen, S. S. (1996). A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 202(3), 205–210. <https://doi.org/10.1007/BF01263541>
- Srinivasan, S., & Hultin, H. O. (1994). Hydroxyl radical modification of fish muscle proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 18(6), 405–425.
- Stevenson, D. E., & Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2900–2916.
- Suman, S. P., & Joseph, P. (2013). Myoglobin chemistry and meat color. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 79–99.
- Sung-Min, K., Hyun-Jung, C., & Lim, S.-T. (2014). Effect of various heat treatments on rancidity and some bioactive compounds of rice bran. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 243–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.04.001>
- Supawong, S., Thawornchinsombut, S., & Park, J. W. (2018). Controlling Lipid Oxidation and Volatile Compounds in Frozen Fried Fish Cake Prepared with Rice Bran Hydrolysate. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(8), 885–899. <https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1508103>
- Tabaraki, R., & Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1279–1286. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.004>
- Tamura, M., Okazaki, Y., Kumagai, C., & Ogawa, Y. (2017). The importance of an oral digestion step in evaluating simulated in vitro digestibility of starch from cooked rice grain. *Food Research International*, 94, 6–12.
- Tananuwong, K., & Tewaruth, W. (2010). Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice. *LWT-Food Science and Technology*, 43(3), 476–481.

- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F. M., & Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “montanera” feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chemistry*, *124*(3), 997–1004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.058>
- Tomás-Barberán, F. . (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, *10*(2), 41–53.
- Turoli, D., Testolin, G., Zanini, R., & Bellù, R. (2004). Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, *93*(12), 1569–1574. <https://doi.org/10.1080/08035250410022495>
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M., Herrero-Martínez, J., & Simó-Alfonso, E. F. (2015). Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food Chemistry*, *169*, 28–33.
- Wang, H., Qian, J., & Ding, F. (2018). Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(2), 395–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04528>
- Wang, W., Guo, J., Zhang, J., Peng, J., Liu, T., & Xin, Z. (2015). Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. *Food Chemistry*, *171*, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.095>
- Wang, Y.-L., Lee, Y.-H., Chiu, I.-J., Lin, Y.-F., & Chiu, H.-W. (2020). Potent impact of plastic nanomaterials and micromaterials on the food chain and human health. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5), 1727.
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(1), 3–13.
- White, P. J., & Xing, Y. (1997). Antioxidants from cereals and legumes. *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*, 25–63.
- Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, *104*(SUPPL.3), 48–66. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003946>
- Xue, X., Wang, J., Li, S., Zhang, X., Dong, J., Gui, L., & Chang, Q. (2019). Effect of micronised oat bran by ultrafine grinding on dietary fibre, texture and rheological characteristic of soft cheese. *International Journal of Food Science & Technology*.

- Yamamoto, K. (2017). Food processing by high hydrostatic pressure. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(4), 672–679. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1281723>
- Yuste, J., Capellas, M., Pla, R., Fung, D. Y. C., & Mor-Mur, M. (2001). High pressure processing for food safety and preservation: A review 1. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 9(1), 1–10.
- Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., & Rotsztejn, H. (2018). Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(6), 332–336.
- Zhang, Hongcheng, Shao, Y., Bao, J., & Beta, T. (2015). Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice. *Food Chemistry*, 172, 630–639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.118>
- Zhang, Huiyun, Wu, J., & Guo, X. (2016). Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*, 5(1), 39–48.
- Zigoneanu, I. G., Williams, L., Xu, Z., & Sabliov, C. M. (2008). Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. *Bioresource Technology*, 99(11), 4910–4918. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.067>

## Publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral

Martillanes, S., Ayuso-Yuste, M. C., Gil, M. V., Manzano-Durán, R., & Delgado-Adámez, J. (2018). Bioavailability, composition and functional characterization of extracts from *Oryza sativa* L. bran. *Food research international*, 111, 299-305.

Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Gil, M. V., Ayuso-Yuste, M. C., & Delgado-Adámez, J. (2020). Antioxidant and antimicrobial evaluation of rice bran (*Oryza sativa* L.) extracts in a mayonnaise-type emulsion. *Food chemistry*, 308, 125633.

Martillanes, S., Ramírez, R., Amaro-Blanco, G., Ayuso-Yuste, M. C., Gil, M. V., & Delgado-Adámez, J. (2020). Effect of rice bran extract on the preservation of pork burger treated with high pressure processing. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(1), e14313.

Martillanes, S., Ayuso-Yuste, M. C., Bernalte, M.J., Gil, M. V., & Delgado-Adámez, J. Cellulase-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from rice bran (*Oryza sativa* L.): Process optimization and characterization. *Under review in Journal of Food Measurement and Characterization*.

Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Llera-Oyola, J., Gil, M. V., Ayuso-Yuste, M. C., García-Parra, J. & Delgado-Adámez. Control of *Listeria monocytogenes* in sliced dry-cured Iberian ham by high pressure processing in combination with an eco-friendly packaging based on chitosan, nisin and phytochemicals from rice bran. *Under review in Food Control*