

EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y EL DESARROLLO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN CARNE BOVINA

Giménez¹ Belén, Rodríguez² Hernán B., Giannuzzi¹ Leda, Graiver¹ Natalia, Zaritzky^{1,3} Noemí

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Fac. de Cs Exactas, UNLP. 47 y 116, La Plata (1900), Argentina. ² INIFTA (UNLP-CONICET), Fac. de Cs Exactas, UNLP, Diag. 113 y Calle 64, La Plata, Argentina. ³Depto. de Ing. Qca, Fac. de Ingeniería, UNLP. belengimenez@live.com.ar

INTRODUCCIÓN

Las APH es una tecnología emergente que se destaca sobre los procesos térmicos porque dichos procesos causan inevitablemente una pérdida de nutrientes y sabores en los alimentos. Utilizando el tratamiento de APH se obtienen productos cuyas vitaminas, sabores, aromas y colores se conservan casi intactos, permitiendo extender su vida útil. Se basa en la aplicación de presiones entre 100 y 900 MPa por tiempos cortos a alimentos envasados en vacío que luego se conservan bajo refrigeración. La aplicación de APH produce modificaciones conformacionales de las proteínas de la carne produciendo desnaturalización, agregación o gelificación de las mismas, alteraciones principalmente causada por la ruptura de las interacciones no covalentes proteína-proteína y la generación de nuevos enlaces inter e intramoleculares (Sun y Holley, 2010).

Al aplicar APH a niveles superiores a 300 MPa en carne bovina se afectan los parámetros de color, atenuando significativamente la tonalidad roja característica en la carne. Para contrarrestar este efecto se necesita un tratamiento previo con preservadores químicos como el nitrito que permita la formación de nitrosomioglobina, proteína más resistente a las altas presiones, manteniendo un color adecuado en la superficie de la carne (Giménez et al, 2015).

Es importante analizar si el método permite controlar el desarrollo de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* (microorganismo ubicuo que sobrevive mucho tiempo en los alimentos) y que constituye una preocupación para la industria agroalimentaria. Se lo considera un patógeno psicrótrofo, capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración (0-8°C), puede crecer a 4°C en pocos días a diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas y además es capaz de desarrollarse a pH de 4.4 a 9.6. Asimismo, crece en concentraciones altas de NaCl 10% y sobrevive a concentraciones entre 16 y 20%. (Schöbitz et al, 2009).

El objetivo del trabajo fue: a) estudiar el efecto de la concentración de cloruro de sodio en la solución utilizada en el tratamiento químico previo a la aplicación de APH y de los niveles de presión sobre las características fisicoquímicas de un producto cárnico bovino; b) estudiar el efecto del tratamiento de APH sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* inoculada en carne bovina sometida a un pre-tratamiento con preservadores químicos durante el almacenamiento refrigerado a 4°C y 10°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las materias primas: Se utilizaron cortes vacunos de cuartos traseros (nalga, músculos *adductor femoris* y *semimembranosus*). Los músculos se separaron luego de 48 horas postmortem y se recortó la grasa visible. Las materias primas tenían un valor de pH entre 5.4 y 5.7.

Tratamiento con solución salina de preservadores químicos: El proceso incluyó una etapa de inmersión de discos de carne (3 mm de espesor y 6 cm de diámetro, 2.5 h) en una solución preservadora compuesta por 0.62 g/L NaNO₂, 8.5 g/L ácido ascórbico y NaCl en dos concentraciones: 30 g/L (S1) o 60 g/L (S2).

Envasado de las muestras y aplicación del tratamiento de APH: Las muestras de carne se envasaron al vacío en bolsas Cryovac BB4L (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina) y se sometieron al proceso de APH. Este tratamiento se llevó a cabo en un sistema de Stansted Fluid Power (modelo FPG9400:922, cilíndrico de 2 litros de capacidad, presión máxima de trabajo 900 MPa,

rango de temperatura: de -20 a 120 °C) en el Laboratorio del INTA Castelar. La velocidad de presurización con la que opera el equipo es de 300 MPa/min y la despresurización se realizó instantáneamente. Se utilizaron seis niveles de presión (100, 200, 300, 400, 500 y 600 MPa), el tiempo de mantenimiento de APH fue de 5 min a 20 °C \pm 5 °C.

Preparación del inóculo y proceso de inoculación: Se realizó un ensayo con muestras que fueron inoculadas con *Listeria monocytogenes* cepa L261, (cultivo provisto por la Fac. de Ciencias Veterinarias, UNLP). Posteriormente a la etapa de tratamiento químico de la muestra, se inoculó cada una de forma individual con 100 μ l de un cultivo de 24 h de *Listeria monocytogenes*. El ensayo se llevó a cabo utilizando concentraciones de inóculo 10^3 y 10^5 UFC/gramo de tejido

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC): Se analizó la desnaturalización proteica por efectos de la difusión de las sales de curado seguida del tratamiento de alta presión a través de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC Q100 controlada por el módulo TA 5000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Se obtuvieron muestras de 9-10 mg que fueron colocadas en cápsulas de aluminio y selladas herméticamente. Se empleó una velocidad de calentamiento en el DSC de 10 °C/min en el rango de 20 a 100 °C utilizando como referencia una cápsula vacía. Cada ensayo fue realizado utilizando 4 muestras.

Espectroscopía Infrarroja (FTIR): Los espectros FTIR de las muestras de carne se registraron utilizando un Espectrómetro infrarrojo Nicolet™ iS™10, Thermo Scientific™, (Madison, USA) equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) de diamante. El análisis se realizó a temperatura ambiente. Los espectros FTIR se obtuvieron de 400 a 4000 cm^{-1} con 32 escaneos a 4 cm^{-1} de resolución. La interferencia de fondo se eliminó usando el software Omnic 8 (Thermo Scientific™, Madison, USA).

Determinación de parámetros de color: Se realizó con un colorímetro triestímulo Minolta C400 el cual utiliza la escala de color CIE L*a*b*, mediante la cual el color es descripto por los parámetros de luminosidad L*, y de cromaticidad a* y b*. Las determinaciones se realizaron sobre 3 muestras de carne (6 medidas para cada muestra).

Reflectancia Difusa: Los estudios de color se complementaron con la determinación de los espectros de reflectancia difusa que fueron obtenidos en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz marca PG Instruments modelo T90+, equipado con accesorio de esfera integradora perteneciente al INIFTA (CONICET, UNLP). Se interpuso una placa de cuarzo (2 mm de espesor) entre las muestras y la esfera para evitar la contaminación de la misma, utilizándose BaSO₄ con la misma placa como referencia del 100% de reflectancia. Se seccionaron muestras circulares de carne (3 cm de diámetro, 4 mm de espesor) que se ajustaban a las dimensiones del porta-muestras del equipo. Se registraron medidas entre 400 y 800 nm.

Análisis Estadístico: Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software SYSTAT (SYSTAT Inc., 1990, v. 10.0). Las diferencias significativas entre las medias fueron determinadas por el método LSD (P<0.05).

RESULTADOS

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas de la carne obtenidos por DSC se vieron afectados por los diferentes niveles de presión del tratamiento APH y por la composición de la solución de inmersión, como se muestra en la Fig. 1 Se observaron diferentes picos de transición particularmente en la carne fresca. Los primeros picos registrados entre 50 y 70 °C representan el rango de temperatura de desnaturalización de la miosina y el último pico entre 74-84 °C está relacionado con la desnaturalización de actina (ambas proteínas miofibrilares). Al analizar los termogramas para las muestras tratada con APH en el rango de presiones entre 100 y 600 MPa, se observa una disminución en el área de los picos de

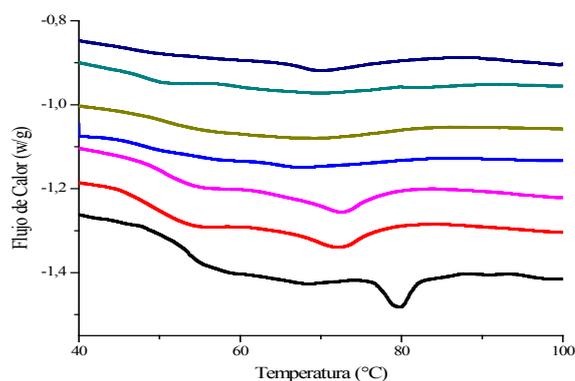


Figura 1: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de carne fresca (—), carne sumergida en la solución de inmersión S1 (3%) (—) y carne sumergida S1 y sometida a 400 MPa (—) y a 600 MPa (—) y carne sumergida en la solución de inmersión S2 (6%) (—) y carne sumergida S2 y sometida a 400 MPa (—) y a 600 MPa (—)

las proteínas miofibrilares. A partir de 500 MPa desaparecen los picos lo que implica desnaturalización de las proteínas por presión. Presiones del orden de 100-300 MPa inducen una desnaturalización reversible y presiones superiores a 300 MPa provocan la desnaturalización irreversible de las proteínas (Hoover *et al.*, 1989). La desnaturalización parcial de la proteína causada por los tratamientos de APH estaría relacionada con la desestabilización de interacciones no covalentes en estructuras terciarias y secundarias (Chapleau *et al.*, 2004). Para el caso de las muestras tratadas con los preservadores químicos y no sometidas a APH, se observó la disminución de la entalpía total con respecto a la carne fresca; esto podría deberse a la adición de NaCl. Barbut *et al.* (1991) estudiaron el efecto que produce la adición de NaCl, KCl o MgCl₂ en diferentes concentraciones (12.5, 25 y 50 g/L) en carne vacuna y concluyeron que un incremento en la concentración de las sales desestabiliza térmicamente a la miosina y a la actina.

Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

La banda de la Amida I entre 1600 y 1700 cm⁻¹ (Fig. 2) fue investigada debido a que esta región es más sensible a cambios en las proteínas miofibrilares (Martínez *et al.*, 2017). Se obtuvieron los espectros de deconvolución de Fourier (FSD) de esta región para mejorar la resolución espectral y para obtener una visión de los cambios en las estructuras secundarias, tales como hoja β (**β -Sheet**), α -hélice, giros β (**β -Turn**), así como estructuras al azar o desordenadas.

Se observa que las muestras tratadas con la solución de inmersión presentaron una mayor estabilidad a las altas presiones, observándose una disminución más atenuada en el porcentaje de α -Hélice. Al comparar el efecto de las concentraciones de cloruro de sodio (S1 y S2) las muestras que tenían mayor cantidad de NaCl, resultaron menos estables; esto puede estar relacionado con la desestabilización que produce esta sal en las proteínas (Graiver *et al.*, 2006) (Fig 2). Se encontraron cuatro bandas correspondientes a estructuras de las proteínas localizadas en las siguientes regiones de la Amida I: entre 1622-1624 cm⁻¹ correspondiente a **β -Sheet**; 1654-1656 cm⁻¹ a la fracción de α -Hélice, 1673-1678 cm⁻¹ a **β -Turn** y una banda en 1640 cm⁻¹ correspondiente a una estructura desordenada.

En el ensayo se encontró que al someter las muestras a APH se produce una disminución del contenido de α -hélice y un aumento del contenido de estructura desordenada respecto a la carne sin tratamiento (Fig 2). Estos cambios inducidos por APH indican que las presiones producen un desdoblamiento parcial de las proteínas debido a la modificación de las interacciones no covalentes que estabilizan la estructura secundaria.

Determinaciones de color

En la Fig 3 se observa la variación del color en las distintas muestras de carne sometidas dos niveles de presión utilizados (100 y 600 MPa). Se observa un mayor efecto de blanqueamiento (decoloración) en las muestras sometidas a alta presión sin un tratamiento previo con preservadores químicos. Las diferentes condiciones de tratamiento previo a APH (S1, S2 o control), las presiones empleadas y la interacción entre los dos factores, influyeron significativamente ($P < 0.05$) en los parámetros de color. La luminosidad (L^*) de las muestras aumentó significativamente ($P < 0.05$) al incrementarse la presión en la CF paso de 44.44 ± 0.43 a 0 MPa a 57.77 ± 0.34 a 600 MPa,

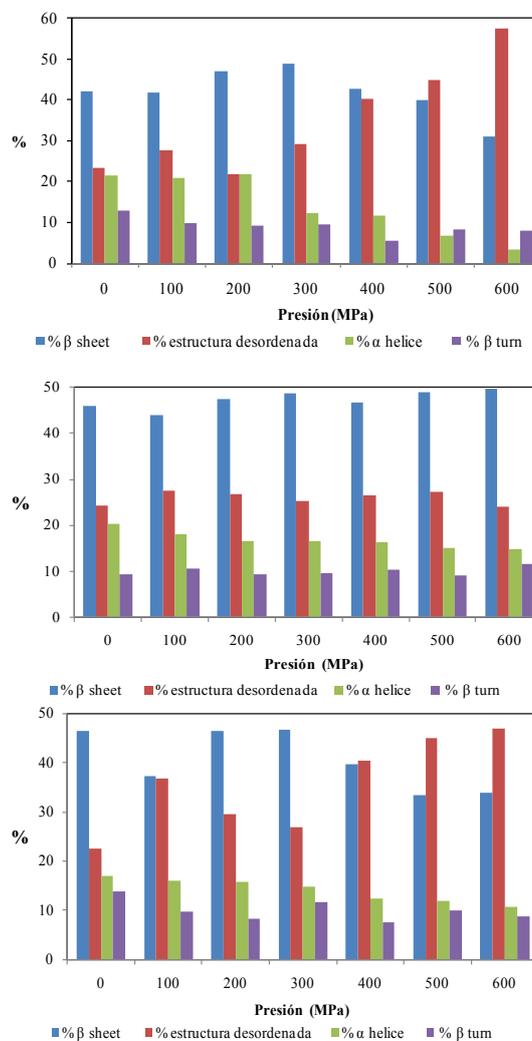


Figura 2: Porcentaje de estructuras de proteínas (β -Sheet, Estructura desordenada, α -Hélice, β -Turn) de muestras de carne sometida a diferentes presiones (100-600 MPa): a) carne fresca, b) carne sumergida en la solución S1 (3%), carne sumergida en la solución S2 (6%).

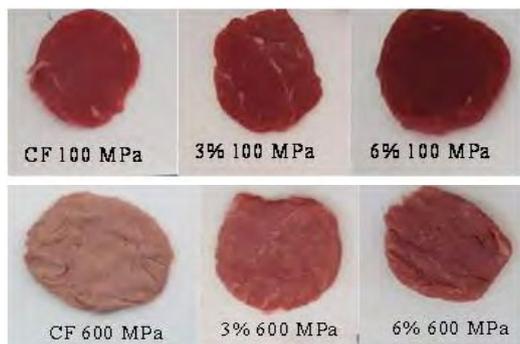


Figura 3: Cambios de coloración en muestras cárnicas frescas (CF) y tratadas con 3 y 6 % de NaCl sometidas a 100 y 600 MPa.

en la muestra sumergida en la solución S1 (3%) pasó de 44.15 ± 0.51 a 0MPa a 58.0 ± 30.14 a 600MPa y en la S2 de 37.86 ± 0.40 a 0MPa a 51.4 ± 60.35 a 600MPa. Esto puede deberse a que los tratamientos de alta presión conducen a cambios en la estructura de las proteínas miofibrilares, provocando despolimerización como principal efecto (Suzuki *et al.*, 2006) incrementando la relación de la luz reflejada y absorbida por el material (Campus *et al.*, 2008). En las muestras que no fueron tratadas con la solución de inmersión (CF), el proceso de APH provocó una disminución del valor de a^* de 18.32 ± 0.40 (0MPa) a 14.24 ± 0.26 (600MPa); esto se debe a que la mioglobina responsable del color rojo de la carne, no es estable a las altas presiones, oxidándose a metamioglobina (Rubio *et al.*, 2007). En cambio el valor de a^* se incrementó con el aumento de la presión en las muestras sumergidas en la solución de inmersión, (S1 pasó de 17.47 ± 0.37 (0MPa) a 21.52 ± 0.18 (600 MPa) y en S2 de 18.77 ± 0.40 (0MPa) a 24.00 ± 0.30 (600MPa)) lo cual podría atribuirse a la formación de nitrosomioglobina, proteína más estable a las altas presiones debido a su mayor resistencia a la oxidación que la mioglobina y la oximioglobina (Rubio *et al.*, 2007). El incremento del valor de a^* con la presión de trabajo indicaría que la misma favorece la formación de nitrosomioglobina acentuando la coloración rojiza. En función de la solución de inmersión, las muestras que tienen mayor concentración de NaCl presentaron valores de a^* mayores, lo cual está relacionado con la mayor difusión efectiva de NaNO_2 favorecida por el NaCl (Graiver *et al.*, 2006).

Reflectancia Difusa

La reflectancia difusa se refiere a la fracción de la luz incidente que es reflejada por una superficie, que ha sido parcialmente absorbida y parcialmente dispersada como resultado de su penetración en el interior de la muestra, y que presenta una distribución angular de reflexión (a diferencia de la reflexión especular que es direccional). La teoría más comúnmente aceptada sobre la reflectancia difusa ha sido desarrollada por Kubelka y Munk (Wendlandt y Hecht, 1966; Kortüm, 1969) y es válida para muestras poco absorbentes en sistemas reflectantes difusos.

En el marco de esta teoría, la carne se considera como una matriz de material celular capaz de dispersar la luz, constituida por proteínas miofibrilares, tejido conectivo y pigmentos responsables de la absorción de la radiación (McDougall, 1970). La intensidad de la luz reflejada, y por lo tanto su color y apariencia, se rige por la interrelación entre la luz dispersada por componentes en el sistema, y la concentración y propiedades espectrales de absorción de los pigmentos. Los pigmentos rojos absorben luz en el espectro visible mientras que las estructuras no coloreadas y las proteínas miofibrilares dispersan y absorben (Bevilacqua y Zaritzky 1986).

Para poder determinar las concentraciones o variaciones en los pigmentos de la carne, en el marco de la teoría Kubelka-Munk se puede calcular, a partir de la reflectancia difusa de muestras cárnicas ópticamente gruesas (transmitancia despreciable), la función de Kubelka-Munk, $F(R_\lambda)$, a partir de la siguiente ecuación:

$$F(R_\lambda) = \frac{(1 - R_\lambda)^2}{2R_\lambda} = \frac{K}{S} = \frac{\sum K_i C_i}{\sum S_i C_i} \quad \text{Ec. 1}$$

donde R_λ es la reflectancia difusa de la muestra, K_i son los coeficientes de absorción de los pigmentos y la matriz, S_i es el coeficiente de dispersión y C_i es la concentración de cromóforos en la muestra. Esta función es proporcional a la concentración del cromóforo. Para independizar los valores de la función $F(R)$ de los cromóforos respecto a los correspondientes a la matriz, se sustrajo el valor de dicha función evaluada a $\lambda = 750$ correspondiente a la matriz sin colorear.

En la Figuras 4a y 4b, se muestran a modo de ejemplo $F(R)$, en función de la longitud de onda para carne fresca y tratada con distintas concentraciones de sal, para dos presiones diferentes (200 y 600 MPa). Puede notarse que a una presión fija a medida que aumentaba la concentración de cloruro de sodio y por lo tanto la cantidad de nitrito en el tejido, se incrementó el valor de $F(R)$, lo cual indica una mayor concentración del cromóforo fundamentalmente nitrosomioglobina. Al

comparar las Figuras 4b y 4c se observa que a mayor presión en el tratamiento (600 MPa) la función $F(R)$ adopta valores más bajos que a 200 MPa lo cual indicaría una menor estabilidad del pigmento a mayores presiones hidrostáticas. La presencia de nitrosomioglobina estabiliza el color rojo disminuyendo la oxidación del pigmento con formación de metamioglobina

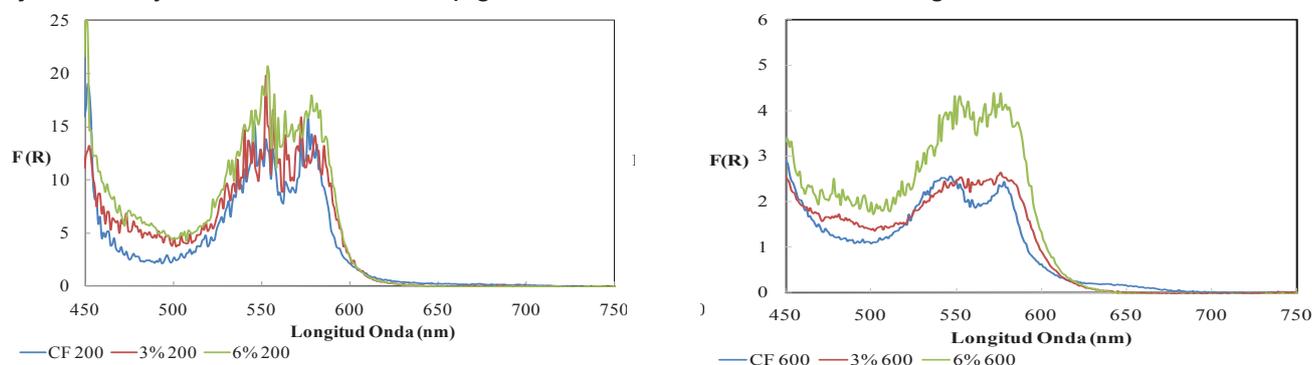


Figura 4: Espectro de la función de Kubelka Munk en función de la longitud de onda para: a) metamioglobina, oximioglobina y nitrosomioglobina (curvas patrón), a) y b) muestras sometidas a 200 MPa y 600 MPa.

Análisis microbiológicos

Los modelos matemáticos permiten predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos en función de condiciones ambientales. La ecuación de Gompertz es una función doble exponencial basado en 4 parámetros que describen una curva sigmoideal asimétrica. De los parámetros de la ecuación se deriva: la velocidad específica de crecimiento μ .

$$\text{Log } N = A + C \exp \{ - \exp[-B(t-M)] \} \quad \text{Eq 2}$$

Para ejemplificar la aplicación del modelo de Gompertz, en la Fig 5 se muestran los datos experimentales así como la curva ajustada mediante SYSTAT al desarrollo de *Listeria* en el medio de cultivo sometido a distintos tratamientos, durante su almacenamiento refrigerado a 4°C y 10°C.

La Fig 5 a,b corresponde a muestras inoculadas con 10^3 UFC/g y almacenadas a dos temperaturas diferentes 4°C (Fig 5 a) y 10°C (Fig 5 b).

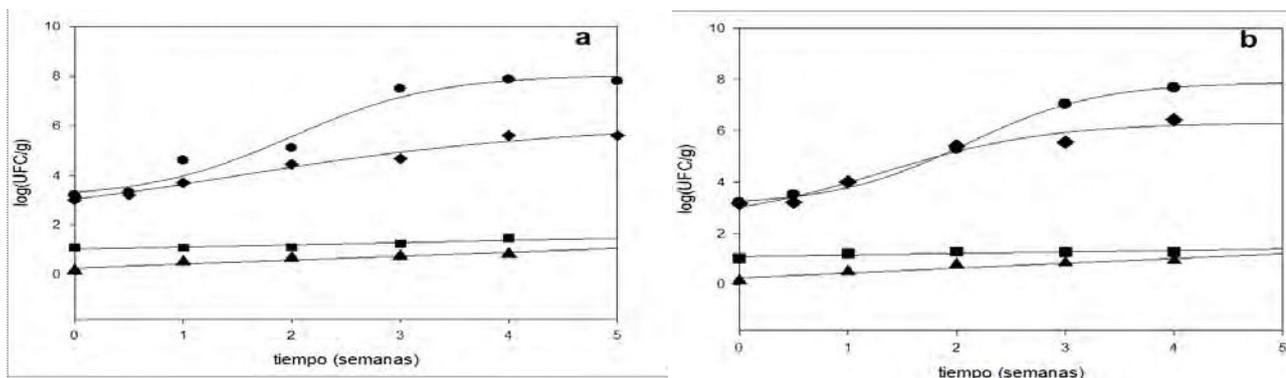


Figura 5: Aplicación del modelo de Gompertz a los recuentos de *Listeria monocytogenes* en carnes almacenadas inoculada en niveles de 10^3 UFC/g y almacenadas a) 4°C y b) 10°C ● carne fresca, ♦ carne con solución, ■ 400 MPa y ▲ 600 MPa.

Las muestras tratadas con la solución de aditivos químicos, inoculadas y sometidas a APH en los dos niveles de presión y almacenadas tanto a 4°C como a 10 °C, presentaron recuentos por debajo del límite de detección (2 log UFC/g) lo cual significa que las altas presiones afectaron a las bacterias, impidiendo así su desarrollo normal. Debe señalarse la notoria disminución del recuento

inicial después del tratamiento con altas presiones disminuyendo la concentración microbiana en alrededor de 3 ciclos logarítmicos. En contraste las muestras frescas (CF) y las tratadas con la solución de aditivos químicos (CS) que fueron inoculadas, presentaron recuentos por encima de 3 log UFC/g, aumentando a lo largo del almacenamiento refrigerado. En el caso de las muestras almacenadas a una temperatura de refrigeración de 10°C, se observó un crecimiento mayor. Para las muestras tratadas con APH se observa que las sometidas a 600 MPa presentaron un menor crecimiento que las muestras sometidas a 400 MPa, evidenciando el mayor efecto que produce las altas presiones sobre las bacterias. Con respecto a las temperaturas de almacenamiento, no se observó crecimiento a 4°C para las muestras tratadas a 600 MPa durante todo el almacenamiento y en el caso de las muestras tratadas a 400 MPa, durante la primera semana no se registró crecimiento microbiano. En cambio a 10°C, se notó crecimiento durante la primera semana para 400 MPa y luego de la segunda semana para el tratamiento de 600 MPa. Se observa que las bacterias que fueron sometidas a APH presentan una cinética de crecimiento distinta a la de las muestras no sometidas a altas presiones; esto podría deberse a una adaptación de la bacteria luego de estar expuesta a condiciones adversas. Se observa la influencia que presenta el tratamiento de APH sobre la velocidad de crecimiento de dicho microorganismo (velocidad específica de crecimiento (μ) para CF 6.51log (UFC/ml)/h, carne sumergida 2.36 log (UFC/ml)/h, muestras sometidas a 400 MPa 0.09±0.02 log (UFC/ml)/h y a 600MPa 0.16±0.03 log (UFC/ml)/h), el cual se mantiene durante mayor tiempo en fase de latencia.

CONCLUSIONES

Mediante los ensayos de DSC y FTIR se observó que las APH modificaron las estructuras de las proteínas. Se evidenció en los termogramas de DSC la desaparición de los picos correspondientes a las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares cuando son sometidas a los diferentes niveles de presión y concentración de preservadores químicos. A partir de los espectros de FTIR se observó una disminución en el contenido de estructuras α -Hélice y un aumento de la estructura desordenada. Se encontró que el tratamiento de APH afectó los parámetros de color, presentando las muestras tratadas a mayor presión un menor valor de a^* (disminución de la coloración rojiza) y un mayor valor de L^* , lo cual se pudo correlacionar con las mediciones de reflectancia difusa. Los preservadores químicos mejoraron la estabilidad del cromóforo disminuyendo el blanqueamiento de las muestras (producido por la aplicación de APH). La formación de nitrosomioglobina estabilizó el color rojo evitando la formación de metamioglobina. Se puede concluir que la utilización de APH como procedimiento de control del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un producto cárnico fue efectivo para disminuir los recuentos iniciales después del tratamiento. La utilización de la Microbiología Predictiva permite predecir la durabilidad y seguridad de los alimentos y determinar la estabilidad microbiana de nuevos productos alimenticios.

BIBLIOGRAFIA

- Barbut, S.; Findlay, C. (1991). *Influence of sodium, potassium and magnesium chloride on thermal properties of beef muscle*. J. of Food Science, 56, 180-182.
- Bevilacqua E.; Zaritzky N. E. (1986). *Rate of pigment modifications in Packaged refrigerated beef using Reflectance spectrophotometry*. Journal of Food Processing and Preservation 10: 1-18
- Campus, M.; Flores M., Martinez A.; Toldran F. (2008). *Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin*. Meat Science. 80: 1174-1181
- Chapleau, N.; Mangavel, C.; Compont, P.; De Lamballerie-Anton, M. (2004). *Effect of high-pressure processing on myofibrillar protein structure*. J. Sci. Food Agric., 84(1), 66–74.
- Giménez, B.; Graiver, N.; Califano, A.; Zaritzky, N. (2015). *Physicochemical characteristics and quality parameters of a beef product subjected to chemical preservatives and high hydrostatic pressure*. Meat Science, 100, 179–188.
- Graiver, N.; Pinotti, A.; Califano, A.; Zaritzky, N. (2006). *Diffusion of sodium chloride in pork tissue*. J. of Food Engineering, 77, 910–918.
- Hoover, D.; Metrick, C.; Papineau, A.; Farkas, D.; Knorr, D. (1989). *Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms*. Food Technol, 43, 99-107.
- Mcdougall, D. B. (1970). *Characteristics of the Appearance of Meat I. The luminous absorption scatter and internal transmittance of the lean of bacon manufactured from normal and pale pork*. J.

Sci. Food Agric. 21, 568-571.

Schöbitz R., Ciampi L., Nahuelquin Y. (2009) *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur* 37(1): 1-8

Rubio, B.; Martinez, B.; Garcia-Cachan, M.; Rovira, J. Jaime, I. (2007). *Effect of high pressure preservation on the quality of dry cured beef "Cecina de Leon"*. *Innovation Food Science and Emerging Technologies*, 8(7), 102-110.

Suzuki, A.; Kim, K.; Tangi, H.; Nishiumi, T.; Ikeuchi, Y. (2006). *Application of high hydrostatic pressure to meat and meat processing*. In I. M. Noller & F. Toldra (Eds,) *Advanced Technologies for Meat Processing*, 193-217.

Wendlandt, W. N.; Hecht, H. G. (1966). *Reflectance Spectroscopy*. Interscience Publishers, New York.