

Acción de los Lípidos y Aminas en la Reacción de Coloración Superficial de la Sardina Enlatada

Angélica Wakao y Melva Pazos

Departamento de Química – Instituto Tecnológico Pesquero del Perú
Carretera a Ventanilla Km. 5.2 – Callao

ABSTRACT

Browning reactions that occur during the canning of Sardines have been studied using model reaction assay. Various combinations of ribose, glycine, trimethylamine, sardine lipids and sardine muscle were investigated.

Extracted pigments were fractionated into lipophilic and hydrophilic fractions. Those pigments involved in the browning reactions were primarily lipophilic, and the presence of oxygen and fat were necessary for the reactions. It was also found that volatile amines, such as trimethylamine and ammonia react with oxidized lipids.

RESUMEN

Se estudió a los principales elementos que intervienen en la reacción de coloración superficial en la sardina enlatada, provocando la formación de pigmentos mediante sistemas de reacciones-modelos con azúcares, aminas volátiles, aminas no volátiles y la grasa de la sardina; así como con el músculo de la sardina.

Los pigmentos se fraccionaron de acuerdo a su solubilidad, en hidrofílicos y lipofílicos, lográndose identificar que los pigmentos de la conserva de sardina son mayormente del tipo lipofílico y que su formación se halla influenciada por la presencia de oxígeno y grasa. Los datos indican que son las aminas volátiles (trimetil amina, dimetil amina y amoníaco) los que reaccionan directamente con la grasa oxidada y que la temperatura acelera estas reacciones.

INTRODUCCION

La presencia de una coloración pardo rojiza en la superficie de la carne de sardina enlatada, conocida también como "tostado", es considerada como un problema técnico de calidad en la industria conservera de sardina. Los mecanismos de las reacciones que provocan el cambio de coloración en alimentos de origen animal aún presentan interrogantes debido a la complejidad de reacciones involucradas. Por la característica de la materia prima en estudio, así como de las condiciones del proceso esta reacción estaría clasificada como del tipo amino carbonilo⁽¹⁰⁾ no enzimático. Considerando que la es-

pecie sardina (*Sardinops sagax sagax*) normalmente presenta un alto contenido de grasa, cuyo porcentaje en el filete varía de 4% a 8%⁽¹⁶⁾ y que la intensidad del color pardo rojizo va en razón inversa al grado del vacío de la conserva⁽¹²⁾, se considera a los lípidos oxidados como uno de los elementos claves en la reacción^(8,22). Al respecto, han sido enunciados numerosas teorías sobre los mecanismos de reacción de las grasas oxidadas en el proceso del cambio de coloración, considerando en uno de los casos a la etanolamina oxidada como precursora del empardeamiento⁽¹¹⁾. Pryde responsabiliza a los aldehídos originados por la oxidación de las grasas, los cuales al polimerizarse con compuestos fenólicos, úrea, trimetil-amina u otra amina, formarían productos coloreados de gran tamaño molecular, cuya intensidad de color estaría en función directa al tamaño de la fracción lipídica^(17,23). Nonaka al estudiar el empardeamiento del aceite de pescado propuso que ésta sería provocada por reacciones entre los compuestos ácido-carbónicos de la grasa oxidada, donde el amoníaco actuaría como catalizador de la reacción⁽¹⁵⁾. Otra vía sería la reacción de la grasa oxidada con los grupos amínicos de la proteína^(1,4). Como quiera que los lípidos al oxidarse dan lugar a un gran número de compuestos intermedios, las vías de reacciones han de ser múltiples, pudiéndose presentar simultáneamente varios tipos de reacciones, inclusive en el caso de reaccionar un ácido graso con una proteína pura. Al final, todas las vías dan lugar a la formación de pigmentos coloreados y que agrupándolos de manera muy general pueden dividirse en: Pigmentos hidrosolubles (hidrofílicos) tal es el caso del producto de la reacción entre azúcares y aminoácidos llamado también reacción de Maillard, y pigmentos liposolubles (lipofílicos) producidos generalmente por una reacción entre compuestos lipídicos y aminas volátiles^(13,8).

Uno de los factores que influyen en la formación de estos pigmentos, cuando existen reacciones entre lípidos y aminas, es la humedad del producto⁽⁵⁾. Es así que en productos de alta humedad como sucede en las conservas, es posible la formación de pigmentos hidrosolubles y liposolubles. En cambio en un ambiente de poca humedad (menor del 3%) o en productos cuyo A_w es próximo a cero se formarían tan sólo pigmentos liposolubles. A medida que aumenta la humedad del medio las posibilidades de formación de pigmentos liposolubles disminuyen conforme se llega a valores de 0.41 de A_w , mientras que la producción de pigmentos hidrosolubles va en aumento a medida que aumenta la humedad del medio. A partir de un valor de A_w de 0.41 la producción de pigmentos liposolubles tienden a ir en aumento, presentándose la máxima productividad de pigmentos cuando el valor de A_w es 0.84; estas condiciones son de gran importancia para el procesamiento de productos deshidratados.

Suyama propone alternativas sobre probables mecanismos de reacción entre grasa oxidada y compuestos aminados, enfatizando que en el caso de reacciones tipo aminocarbonilo, los grupos carbonilos procedentes de la grasa tienen mayor reactividad que los α -dicarbonilos procedentes de los azúcares⁽²⁰⁾. Dentro de los compuestos carbonílicos de la grasa, los aldehídos de cadena abierta α , β insaturados tales como el crotonalaldehído 2-hexenal serían los que poseen mayor reactividad con los grupos amino libre^(2,9).

A fin de contribuir al esclarecimiento de las reacciones que ocasionan el cambio de color superficial de la carne de sardina, se estudió en el presente trabajo los tipos de pigmentos que se presentan en la superficie de la carne de sardina enlatada, mediante combinaciones de reacciones que reflejarían experimentalmente lo que sucede durante el procesamiento térmico de la sardina.

MATERIALES Y METODOS

La grasa de la sardina fue extraída de ejemplares procedentes del Terminal Pesquero Zonal del Callao, empleando la mezcla cloroformo metanol (2: 1v/v) de acuerdo al método de Folch y col⁽⁷⁾.

Los lípidos neutros se obtuvieron a partir de la grasa de la sardina, eluyéndolos con cloroformo a través de una columna cromatográfica empacada con ácido silícico y celite (2: 1p/p), procedimiento que se repitió para una mejor purificación.

Modelo de Reacciones Químicas

Para las reacciones entre reactivos puros y la grasa se prepararon sistemas de reacciones combinando los componentes mencionados en la Tabla No. 1 y llevando a cabo las reacciones en atmósfera de aire (oxígeno) y de nitrógeno. Para éste último caso se burbujeó nitrógeno al tubo conteniendo el sistema de reacción por unos minutos para evacuar la mayor cantidad posible de oxígeno y luego cerrándolo herméticamente con una tapa provisto de protector de teflón.

TABLA No. 1

SISTEMA DE REACCION A		SISTEMA DE REACCION B	
Ribosa	0.20 mmol	Grasa	25 mg
Lisina	0.20 mmol	Trimetil amina	25 mg
Grasa	0.25 g	Glicocola	25 mg
Celite	1.00 g	Tampón pH 7 csp	2.0 ml
Tampón pH 7 csp	10 ml	Autoclave:	105°C/15 min
Autoclave:	110°C/60 min		

csp: cantidad suficiente para

Pruebas con Sardina

Los especímenes procedentes del Callao de buena calidad organoléptica, fueron pre-cocidos a vapor por 40 minutos, luego se separó el músculo ordinario y se distribuyó en tubos con tapa, en cantidades de 2 g. Con el objeto de observar diferencias se trabajó bajo dos condiciones: a un grupo de tubos se le burbujeó nitrógeno antes de autoclavarlos por 15 minutos a 105°C, mientras que el otro grupo de tubos fueron introducidos directamente al autoclave. A las 24 horas luego de concluido el tratamiento térmico, se procedió a la separación de los productos de la reacción siguiendo la técnica de separación de pigmentos que se describe más adelante.

Prueba con Conservas de Sardina

Se utilizó conserva de sardina tipo sólido, esterilizadas a 115°C por 75 minutos sin líquido de cobertura, para asegurar la formación de color pardo y conservas de sardina en agua-sal, procesadas de acuerdo a Li y col.⁽¹²⁾. Los pigmentos presentados en la zona superficial de la carne fueron retirados cuidadosamente del resto de la muestra. 2 gr. de dicha muestra fue sometido a la prueba de separación de pigmentos. Paralelamente se procedió de igual manera con el tejido de la zona central de la misma conserva, como medida de comparación.

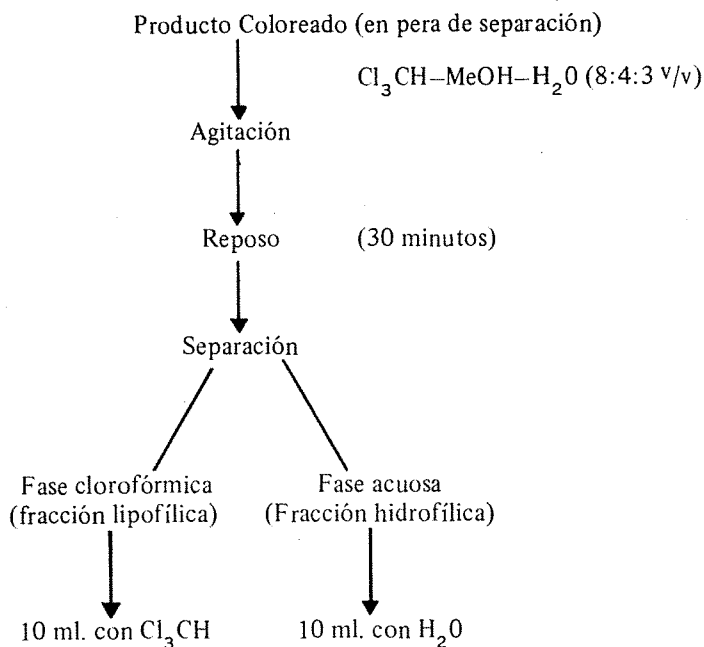
Separación de Pigmentos

Los pigmentos formados como consecuencia de las reacciones efectuadas con reactivos puros o los de la carne de sardina fueron separados y clasificados de acuerdo a su solubilidad en: pigmentos hidrofílicos y pigmentos lipofílicos, siguiendo los pasos del esquema No. 1.

Los extractos separados fueron completados a 10 ml de volumen con agua o cloroformo según la fracción y finalmente se determinó la absorbancia en un espectro-fotómetro Shimadzu UV-200 a 420 nm.

La oxidación de la grasa fue medida mediante la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA) de acuerdo a la técnica de Sinhuber y Yu⁽¹⁹⁾, empleando BHA en propilen glicol como antioxidante y expresando los resultados en mg de malonaldehído por Kg de grasa (mgMA/Kg).

ESQUEMA No. 1.— PROCESO DE SEPARACION DE LOS PIGMENTOS FORMADOS LUEGO DE REACCIONAR CON LOS DIFERENTES SISTEMAS.



RESULTADOS Y DISCUSION

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados de la solubilidad de los pigmentos pardo rojizo formados en las reacciones de los sistemas A y B indicados en la Tabla 1.

En la figura 1 se reproducen las reacciones donde intervienen azúcares y amoniácidos, estas reacciones corresponderían al grupo de reacciones tipo aminocarbonilo conocido también como reacción de Maillard^(10,18) donde los pigmentos formados son del tipo hidrosoluble. Cuando al mismo sistema de ensayo se le añade la grasa de la sardina, la intensidad del color resultante es visiblemente mayor que en la reacción sin grasa. Pero luego de haberse procedido a la separación de los pigmentos se pudo observar que el aumento de coloración es debido principalmente a la formación de pigmentos liposolubles no presentes en los sistemas de reacciones sin la grasa.

La figura 2 muestra los efectos de la grasa oxidada al reaccionar con compuestos aminados tanto en ambiente de oxígeno como en ambiente de nitrógeno, pudiéndose apreciar, por los valores de TBA de la grasa luego de ser sometida a la acción térmica, que ésta ha influenciado notablemente en la oxidación de la grasa y que el nitrógeno burbujeado ha logrado inhibir en más o menos 3 veces el grado de oxidación. A pesar de no haberse logrado la total inhibición de la oxidación de la grasa con el burbujeo de nitrógeno (160 mgMA/Kg) existe apreciable diferencia entre los resultados del ensayo con aire o sin presencia de éste tanto para el sistema grasa-aminoácido (glicocola) así como en el sistema grasa-amina volátil (TMA), lo cual demuestra la necesaria presencia del oxígeno en la reacción formadora de pigmentos.

De otro lado, las lecturas de la absorbancia de las fracciones hidrofílicas y lipofílicas de los ensayos efectuados en ambientes de oxígeno, evidencian notables diferencias según el tipo de aminas reaccionantes. Esto se observa en el caso de la reacción grasa-oxígeno-glicocola, donde los pigmentos que se solubilizan, pertenecen mayormente a la fracción hidrofílica; mientras que los pigmentos de la

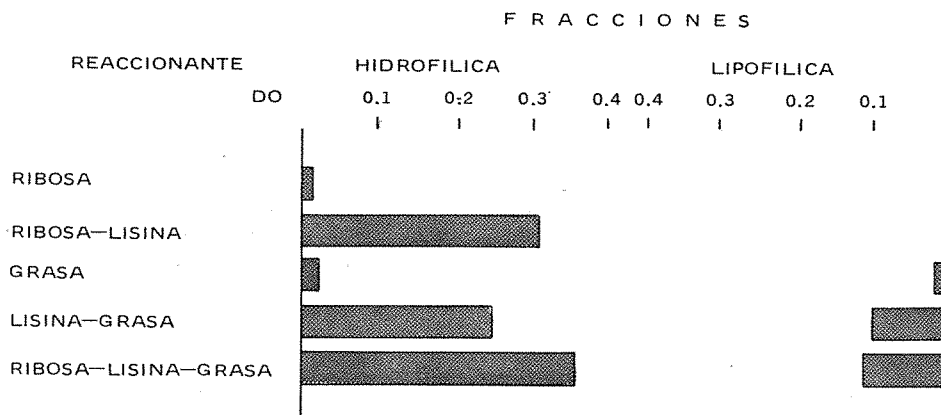
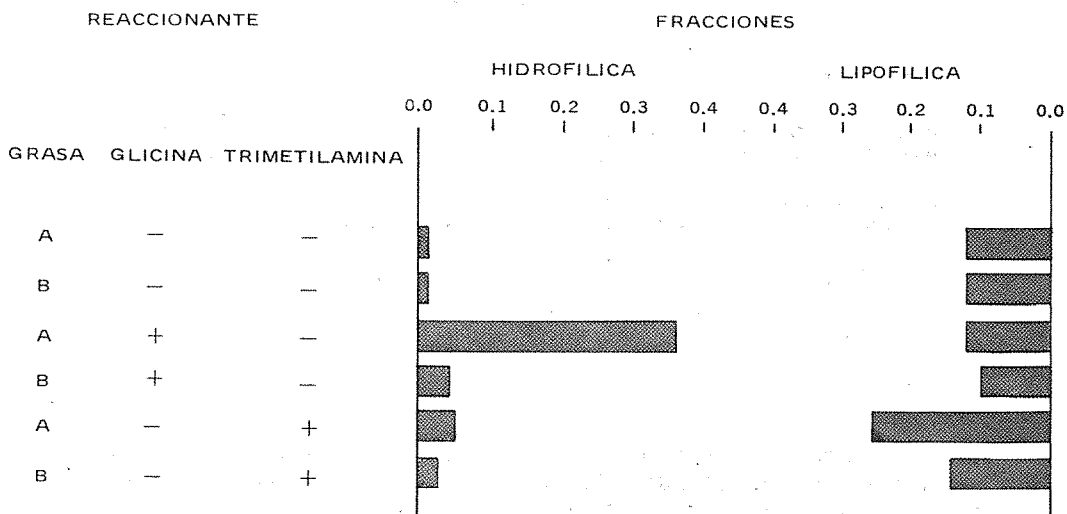


FIG. 1. Lecturas a 420 nm de las fracciones del producto de la reacción del Sistema de Reacción-A.



REACCION A : GRASA EN ATMOSFERA DE AIRE
 REACCION B : GRASA EN ATMOSFERA DE NITROGENO
 TBA de la grasa reaccionado en atmósfera de aire : 469 mgMA/Kg
 TBA de la grasa reaccionado en atmósfera de nitrógeno : 160 mgMA/Kg

FIG. 2. Lecturas a 420 nm de las fracciones del producto de la reacción del Sistema de Reacción-B.

reacción grasa-oxígeno TMA se solubilizan mayormente en la fracción lipofílica. Estos resultados coinciden con los reportados por Nakamura⁽¹³⁾ quien trabajó con fracciones nitrogenadas volátiles y nitrogenadas no volátiles del músculo de jurel y ésteres metilados de ácidos grasos autooxidados, demostrando que, si bien ambos compuestos nitrogenados en presencia de grasa y oxígeno provocan la formación de pigmentos coloreados pardo rojizos, éstos son estructuralmente diferentes. El autor, al analizar los cromógenos formados mediante el espectro infrarojo y la electroforesis constató que el cromógeno formado con las aminas no volátiles contiene 4.51% de nitrógeno en su composición, mientras que el cromógeno obtenido de la reacción con aminas volátiles, el contenido de nitrógeno sólo alcanzó el 0.92%.

A fin de conocer el tipo de pigmento originado en el músculo ordinario de sardina sometida a temperaturas altas, la muestra pre-cocida a vapor fue introducida al autoclave a 105°C por 15 minutos, dividiendo un grupo con ambiente de aire y otro con ambiente de nitrógeno, habiéndose detectado visualmente en los tubos conteniendo la carne de sardina en ambiente de aire, la presencia de coloración pardo rojiza y no así en los tubos esterilizados en ambiente de nitrógeno, permaneciendo así aún después de 30 días de almacenamiento. Esto demuestra la presencia necesaria del oxígeno para provocar la reacción de coloración. Efectuada la separación de los pigmentos, éstos se solubilizan mayormente en la zona lipofílica (figura No. 3).

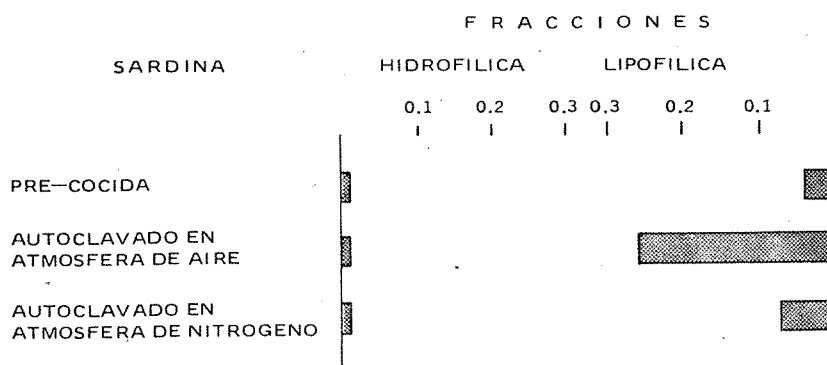


FIG. 3. Lecturas a 420 nm de las fracciones de las muestras: Músculo de Sardina

Al efectuarse el mismo experimento cuando las sardinas presentaron los efectos del Fenómeno del Niño, ocurrido entre Diciembre de 1982 y Marzo de 1983, los resultados de la prueba en el músculo ordinario en ambiente de aire, a diferencia de las pruebas ejecutadas en épocas normales; no presentaron la coloración superficial pardo rojiza, pudiéndose atribuir esta excepción a la variación en la composición de lípidos y humedad en el músculo del pescado, los cuales de porcentajes normales de 2 a 4% de lípidos en el músculo ordinario, disminuyeron a valores entre 0.5 y 1%, mientras que el contenido de humedad de 76 a 78% experimentaron un alza hasta presentar porcentajes mayores a 80%.

Los resultados obtenidos en las extracciones de los pigmentos tanto para la zona superficial como de la zona interna de la sardina enlatada, con evidente cambio de coloración superficial, se presentan en la figura No. 4 donde se demuestra que los pigmentos correspondientes a la muestra de la zona superficial solubilizan mayormente en la zona lipofílica. Los extractos al 20% del concentración dieron lecturas mayores a 0.2 unidades de absorbancia para las fracciones lipofílicas mientras

que las fracciones hidrofílicas dieron lecturas inferiores al 0.1 de absorbancia, a excepción de la muestra C-1 donde pudiera presentarse la reacción amino carbonilo tipo Maillard entre azúcares y aminas paralela a la reacción entre lípidos y aminas y que el azúcar procedería de una avanzada glicolisis de la materia prima.

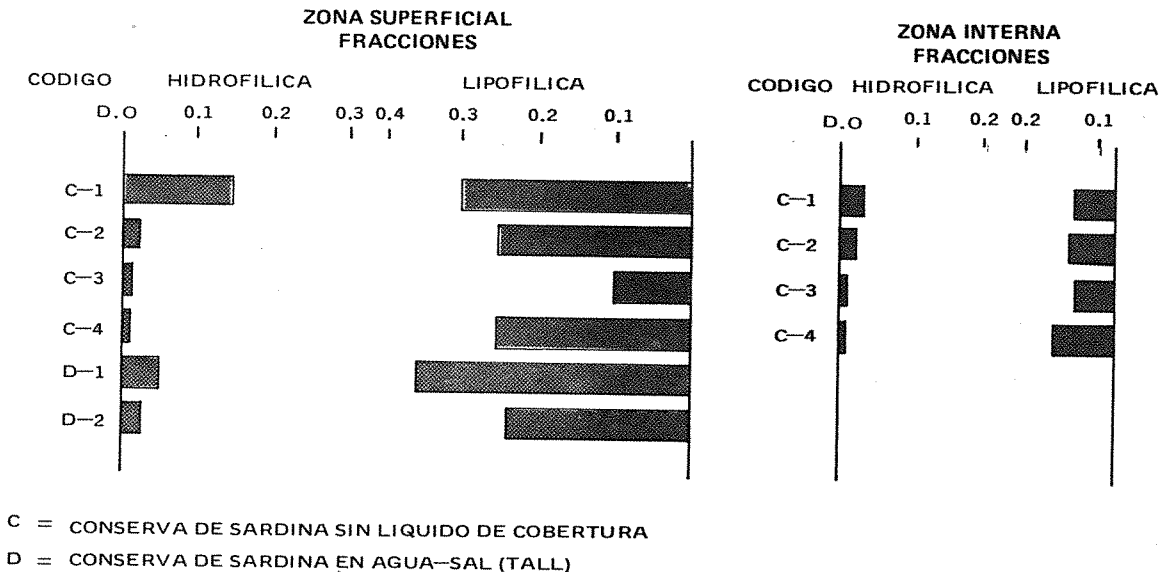


FIG. 4. Lecturas a 420 nm de las fracciones de las muestras: Conservas de Sardina.

De otro lado, pruebas paralelas realizadas de las zonas internas de la carne de sardina nos dan lecturas inferiores a 0.1 de absorbancia, tanto en la fracción lipofílica como hidrofílica, lecturas que pueden atribuirse a la grasa oxidada.

Comparando los resultados obtenidos en el curso de la experimentación, se asume que los pigmentos formados en la superficie de la carne de sardina enlatada presentan el mismo comportamiento que los pigmentos formados en el sistema de reacción grasa-TMA oxígeno-alta temperatura de la figura No. 2, y que los pigmentos pudieran originarse mediante la siguiente ruta:

- I. La grasa normalmente abundante en la sardina es oxidada en presencia de oxígeno, y la reacción acelerada por la temperatura alta; dando lugar a la formación de aldehídos.
- II. Los aldehídos (formados por reacción de condensación aldólica en presencia de aminas primarias o secundarias) por medio de la vía de formación de enaminas dan lugar a aldehídos α , β -insaturados (tales como la (crotonalaldehído, 4-hidroxi-2hexenal, 4-hidroxi-2octenal, elementos detectados en aceites oxidados)^(9,14), o también por condensación aldólica entre los aldehídos que originan aldehídos dienólicos.
- III. Los aldehídos α , β -insaturados o los dienólicos seguirían la vía propuesta por Buttery^(3,6) de reaccionar con aminas volátiles (amoníaco, tri y di-metil aminas, cuya presencia se originaría ya sea por efecto de la acción térmica o por reducción del óxido de trimetil amina en el proceso de degradación de la frescura⁽²²⁾ y que a altas temperaturas y en presencia de oxígeno formarían cromógenos o compuestos nitrogenados coloreados como podría ser la piridina.

En consecuencia, es la reacción entre lípidos y aminas volátiles en presencia de oxígeno la que principalmente origina la formación de pigmentos en la superficie de la sardina enlatada.

REFERENCIAS

1. Andrews F., Bojorksten I., Trenk F. B., Henick A.S., Koch R. B. (1965). The reaction of an autoxidized lipid with proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol. 42: 779-781.
2. Burton D.J., Mc Weeny S., Biltcliffe D.O. (1963). Non enzymic browning: The role of unsaturated carbonyl compounds as intermediates and of SO₂ as an inhibitor of browning. *J. Sci. Fd. Agric.* Vol. 14:911-920.
3. Buttery R., Ling L. Teranishi B., Mon T. (1977). Roasted lamb fat basic volatile components. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 25(6): 1227-1229.
4. Buttkus H. (1967). The reaction of myosin with malonaldehyde. *J. Food Sci.* Vol. 32:432-434.
5. Chung Young Chung Toyomizu M. (1976). Studies on the browning of dehydrated foods as a function of water activity I: Effect of Aw on browning in amino and lipid system. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* Vol. 42: 697-702.
6. Cramer D. (1983). Chemical compound implicated in lamb flavor. *Food Technol.* May: 249-257.
7. Folch J., Lees M., Sloam S.G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* Vol. 226: 497-509.
8. Fujimoto K., Saito J., Kaneda T. (1971). Studies on the brown discoloration of fish products III Effect of ribose on the browning reaction derived from autoxidized oil. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* Vol. 37: 44-47.
9. Fujimoto K., Kaneda T. (1973). Studies on the brown discoloration of fish products V: Reaction mechanism in the early stage. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* Vol. 39: 185-190.
10. Hodge J. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *Agric. Food. Chem.* Vol. 1: 928-943.
11. Lea C.H. (1957). Deteriorative reaction involving phospholipids and lipoprotein. *J. Sci. Food Agric.* Vol. 8:1.
12. Li O., Olivares W., Pineda R., Rochabrun J. (1983). Cambio de coloración superficial en la sardina enlatada I. *Bol. Inv. Inst. Tec. Pes.* No. 1: 19-27.
13. Nakamura T., Yoshitake K., Toyomizu M. (1973). The discoloration of autoxidized lipid by the reactions with VBN or Non VBN fraction from fish muscle. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* Vol. 39: 791-796.
14. Nakamura T., Toyomizu M. (1977). Lipid degradation products capable of reaction with amino acid. Identification of 4-hydroxi 2-hexenal, 9-formyl methyl 8-nonenote and 10-formyl methyl 9-decenoate from autoxidized methyl linoleate. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* Vol. 43: 1097-1104.
15. Nonaka J. (1957). Studies on the chemical essentials to the discussion of fish oil. *J. Tokyo Univ. Fisheries.* Vol. 43: 127.

16. Pazos M., Vicetti R., (1984). Estudio sobre las características de los lípidos y ácidos grasos de la sardina (*Sardinops sagax*). Bol. Inv. Ins.Tec.Pes. No. 2:
17. Pryde E., Anders D., Teeter H.M., Cowan J.C. (1963). Unsaturated aldehyde oils by the partial ozonization of soy bean oil. J.Am.Oil Chem.Soc. Vol. 40:497.
18. Reynolds T.M. (1965). Chemistry of non enzymic browning 2. Adv.Food Res. Vol. 14: 168–283.
19. Sinhuber R., Yu T.C. (1977). The 2–tiobarbituric acid reaction an objective measure of the oxidative deterioration occurring in fats and oils. Technical Papers No. 4485 Oregon Agricultural Experiments Station.
20. Suyama K. (1981). Amino carbonyl reaction in fatty aldehyde primary amine system. Nippon Hogeikagaku Kaishi Vol. 55: 1131–1138.
21. Tokunaga T. (1980). Biochemical and food scientific study on trimetilamine oxide and its related substances in marine fishes. Bull.Tokai Reg.Fish.Lab. No. 101. Feb: 1–29.
22. Toyomizu M., Cheng–Young Ch. (1968). Studies on discoloration of fishery products V: Mechanism of rusting in aminoacid reducing sugar–lipid system. Bull.Japan Soc.Sci.Fish. Vol. 34: 853–862.
23. Toyomizu M., Ynouye R., Nakamura T. (1973). Studies on discoloration of oxidized lipid by gel filtration. J. Food Hyg.Soc.Japan. Vol. 14: 45–49.