

# ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD DE AGUA ELECTROLIZADA ÁCIDA EN LA VIDA ÚTIL DE LUBINA FRESCA

Tribuzi, G.; Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.

## RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia del empleo de agua electrolizada ácida (EAW) sobre la evolución de la calidad físico-química y microbiológica de lubina fresca durante su almacenamiento en refrigeración. Para ello se estudió la evolución de diferentes parámetros físico-químicos (humedad, pH, índice de TBA y nitrógeno básico volátil total (NBVT)), bioquímicos (valor  $K_1$ ) y microbiológicos (aerobios mesófilos, y *Enterobacteriaceae*) durante el almacenamiento de lubina fresca tratada con agua electrolizada ácida durante diferentes tiempos de inmersión. En el estudio preliminar llevado a cabo se observó que la inmersión en EAW con 55 ppm de cloro libre, durante 2,5 y 5 min, consiguió una reducción de la carga microbiana total de hasta 2 ciclos logarítmicos, a día 6 de almacenamiento. Sin embargo, en el estudio definitivo se concluyó que, ni la inmersión de lubina fresca durante 2.5 min ni durante 10 min en EAW, tuvieron efecto en la evolución de los parámetros físico-químicos indicadores del deterioro, como el NBVT o el valor  $K_1$ , ni en la calidad microbiológica. La diferencia encontrada en cuanto al efecto antimicrobiano entre el estudio preliminar y el definitivo se debió a que el EAW empleada en esta última parte del trabajo, sufrió una pérdida de cloro libre. Este hecho pone de manifiesto que el poder conservante del agua electrolizada ácida sobre lubina fresca, única y exclusivamente se debió al alto contenido en cloro libre y no al alto potencial de oxido-reducción o al bajo pH del EAW.

## RESUM

En aquest treball s'ha estudiat la influència de l'ús d'aigua electrolitzada àcida (EAW) sobre la evolució de la qualitat físico-química, bioquímica i microbiològica de llobarro fresc durant el seu emmagatzematge en refrigeració. Per a aquest fi es va estudiar la evolució de diferents paràmetres físico-químics (humitat, pH, índex de TBA i nitrogen bàsic volàtil total (NBVT)), bioquímics (valor  $k_1$ ) i microbiològics (aerobis mesòfils i *Enterobacteriaceae*) durant el emmagatzematge de llobarro fresc tractat amb aigua electrolitzada àcida durant diferents temps de immersió (2,5 i 10 min). A l'estudi preliminar dut a terme es va observar que la immersió en EAW amb 55 ppm de clor lliure, durant 2,5 i 5 minuts, va aconseguir una reducció de la càrrega microbiana total de fins a 2 cicles logarítmics, a dia 6 d'emmagatzematge. No obstant, a l'estudi definitiu es va concloure que, ni la immersió de llobarro fresc durant 2,5 min ni durant 10 min en EAW, van tenir efecte en l'evolució dels paràmetres físico-químics indicadors del deteriorament, com el NBVT o el valor  $K_1$ , ni en la qualitat microbiològica. La diferència trobada respecte a l'efecte antimicrobià entre l'estudi preliminar i el

definitiu va ser deguda al fet que el EAW utilitzada en aquesta última part del treball, va patir una pèrdua de clor lliure. Aquest fet posa de manifest que el poder conservant de l'aigua electrolítica àcida sobre llobarro fresc, única i exclusivament es va deure a l'alt contingut en clor lliure i no a l'elevat potencial de oxidació-reducció o al baix pH del EAW.

## **ABSTRACT**

In this paper we have studied the influence of the use of electrolyzed acidic water (EWA) in the development of physico-chemical, biochemical and microbiological characteristics in fresh sea bass during storage under refrigeration. To do this we studied the evolution of different physical-chemical parameters (pH and total volatile basic nitrogen (BVT-N)) biochemical ( $K_1$  value) and microbiological (mesophilic bacteria and *Enterobacteriaceae*) during storage of fresh sea bass treated with electrolyzed acidic water during different immersion times. In the preliminary study, it was observed that immersion in EAW with 55 ppm of free chlorine, for 2.5 and 5 min, achieved a reduction of total microbial load of 2 log units at day 6 of storage. However, in the final study it was concluded that neither the immersion of fresh sea bass for 2.5 min or for 10 min in EAW, had no effect on the evolution of the physico-chemical indicators of deterioration, such as TVB-N,  $K_1$  value, or microbiological quality. The difference found in the antimicrobial effect between the preliminary and the final studies was due to that EAW used in this last part of the work, suffered a loss of free chlorine. This fact shows that the preservative activity of acidic electrolyzed water on fresh sea bass, was due only to the high chlorine content and not to the high oxidation-reduction potential or the low pH of EAW.

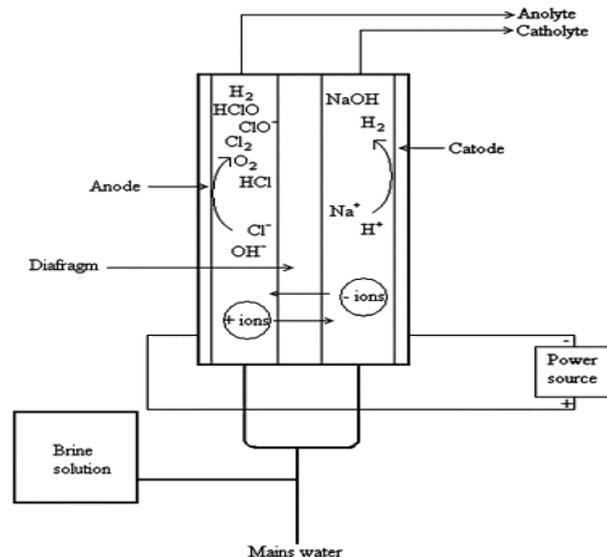
**PALABRAS CLAVE:** lubina, agua electrolizada, parámetros físico-químicos, microbiología, conservación, valor  $k_1$ .

## 1. INTRODUCCIÓN

El pescado es uno de los alimentos más sensibles al deterioro, principalmente ocasionado por causas químicas y microbiológicas. Por estas dos razones alrededor del 25% de la producción pesquera acaba destruida en el mundo cada año (Gram y Dalgaard, 2002).

Las degradaciones químicas y microbiológicas que afectan al pescado pueden limitarse, respetando siempre la cadena de frío, mediante la utilización de aditivos conservantes de origen natural o artificial. La necesidad de aditivos para frenar el deterioro de los productos alimenticios, se contrapone con el rechazo, cada vez mayor de los consumidores a la presencia de conservantes en los alimentos. En este contexto surge la necesidad de investigar métodos de conservación alternativos a los aditivos químicos que permitan garantizar la seguridad del producto alimenticio, manteniendo las características organolépticas del alimento fresco. Es por ello que el estudio de la viabilidad del uso del agua electrolizada ácida como método para prolongar la vida útil del pescado es especialmente interesante.

El agua electrolizada ácida (EAW) es un estado metaestable del agua, que se forma por fenómenos físico-químicos basados en una tecnología de activación electroquímica. El EAW se genera cuando una disolución de cloruro sódico se somete a un proceso de electrólisis. En los equipos comerciales diseñados para generar agua electrolizada, una disolución de NaCl atraviesa una célula electrolítica, dentro de la cual el ánodo y el cátodo se encuentran separados por una membrana de intercambio iónico (figura1).



**FIGURA 1.** Esquema de obtención del agua electrolizada (Fuente: Hsu, 2003).

Al someter los electrodos a una corriente voltaica directa los iones cargados negativamente, como el cloruro (Cl<sup>-</sup>) y el ión hidroxilo (OH<sup>-</sup>) presentes en la disolución de NaCl, se dirigen hacia el ánodo cediendo electrones y formando oxígeno, cloro gaseoso, iones hipoclorito, ácido hipocloroso y ácido clorhídrico, mientras que los iones cargados positivamente, como el hidrógeno y sodio, se dirigen hacia el cátodo para tomar electrones, generándose hidrógeno gas e hidróxido sódico (Huang et al., 2008).

Existen dos hipótesis acerca del funcionamiento antimicrobiano del agua electrolizada ácida. La primera atribuye el efecto conservante a un elevado potencial redox que modifica los flujos metabólicos y la producción de ATP (Rionder et al., 2000). Sin embargo, otros autores atribuyen la capacidad antimicrobiana al efecto desinfectante del ácido hipocloroso gracias a su efecto altamente oxidante (Tsuji et al., 1999).

En la actualidad, el EAW se está empleando como desinfectante para material quirúrgico, así como en la limpieza y desinfección de utensilios y superficies de cocina, así como de la industria agroalimentaria (Northcutt et al., 2007). En los últimos años se han realizado varios estudios sobre el efecto del EAW en distintos alimentos, donde se ha demostrado un interesante efecto antimicrobiano. La acción conservante del EAW se ha estudiado en distintos en vegetales frescos como lechuga (Vandekinderen et al. 2008; Isobe e Itoh, 2004; Koseki et al., 2001), fresa (Isobe e Itoh, 2004), pepino (Huang et al., 2008) y col (Koide et al., 2009). En huevos se ha demostrado también la eficacia del EAW sobre la inactivación de *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* (Park et al., 2005). En pescado existen estudios en especies como paparda del Pacífico (Kim et al., 2000), salmón (Ozer y Demirci, 2006), y tilapia (Huang et al., 2006).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de agua electrolizada ácida sobre la evolución de la calidad físico-química y microbiológica de lubina fresca durante su almacenamiento en refrigeración.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Materia prima**

La materia prima utilizada fue lubina fresca (*Dicentrarchus labrax*) procedente de acuicultura (Dias Aquaculture S.A. Argolis, Grecia). Las lubinas eran comercializadas enteras en cajas de 6 kg con fecha de caducidad, dada por el productor, de 10 días después del sacrificio. El calibre de los pescados utilizados fue 400-600 g.

En el presente trabajo se realizó un estudio preliminar, con el objeto de establecer las condiciones óptimas de tratamiento que se aplicarían en el estudio definitivo.

A su llegada al laboratorio las lubinas frescas fueron descabezadas, evisceradas y fileteadas obteniendo dos filetes de cada pescado. Los filetes así obtenidos se distribuyeron aleatoriamente en diferentes lotes con el objeto de reducir la variabilidad de la materia prima en el estudio.

El agua electrolizada ácida utilizada en el estudio fue generada por un equipo ROX-10WB-E (figura 2) proporcionado por la empresa Hoshizaki Iberia (El Prat de Llobregat, Barcelona, España). El agua se dejaba fluir durante un tiempo de 20 min antes de tomar la cantidad necesaria para llevar a cabo los tratamientos. El EAW se mantuvo en refrigeración aproximadamente 2 h hasta el momento de su utilización con el fin de asegurar que su temperatura en el momento del tratamiento eran 4 °C.

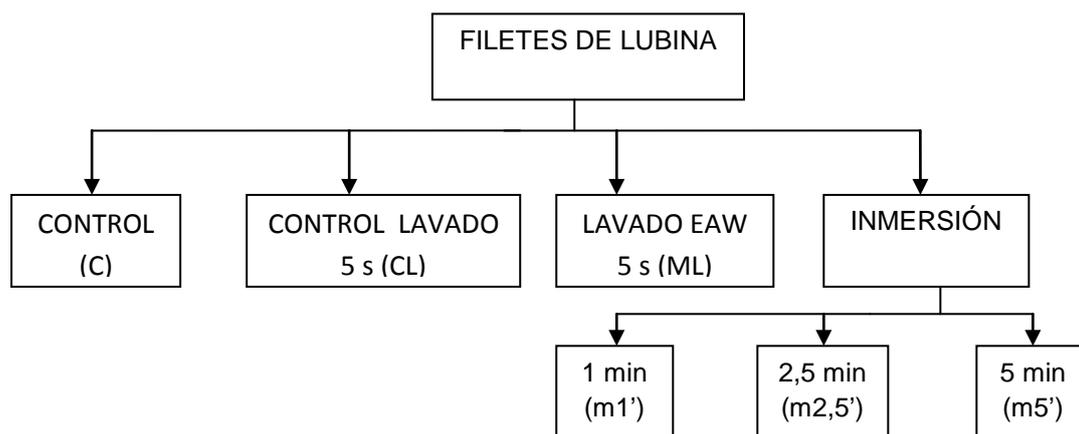


**FIGURA 2.** Equipo de producción de agua electrolizada ácida ROX-10WB-E.

## 2.2. Preparación de las muestras

### *Estudio preliminar*

Se realizó un estudio previo sobre la efectividad del EAW en la conservación de lubina fresca, con el objetivo de seleccionar las condiciones óptimas en el trabajo definitivo (figura 3).



**FIGURA 3.** Diseño experimental del estudio preliminar.

En este estudio preliminar los filetes de lubina se sometieron a distintos tratamientos (figura 3):

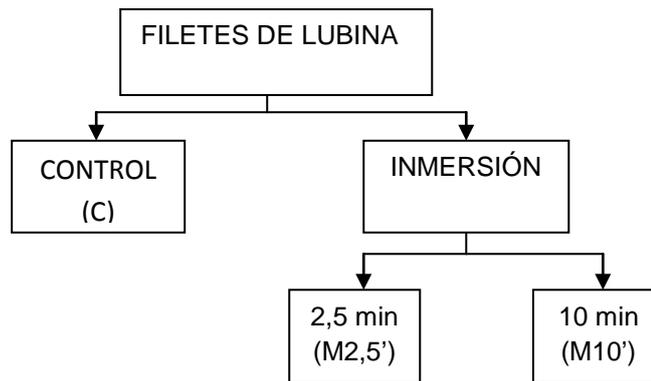
- Lavado 5 s con agua electrolizada ácida a 4°C (ML).

- Inmersión en agua electrolizada ácida a 4°C en una proporción 1/3 p/v, durante 3 tiempos distintos: 1, 2,5 y 5 min.

Se analizaron también 2 tipos de muestra control: muestra sin tratar (C) y muestra lavada con agua de red durante 5 s (CL).

### **Estudio definitivo**

Los tratamientos empleados en esta parte del trabajo se muestran en la figura 4. En el estudio definitivo se utilizó una muestra control (lubina fresca sin tratar) y se ensayaron dos tiempos de inmersión de la lubina en el EW ácida: 2,5 min y 10 min.



**FIGURA 4.** Diseño experimental del estudio definitivo.

Después de cada tratamiento se eliminó el exceso de agua con papel de filtro. A continuación los filetes fueron envueltos en film LDPE y almacenados en refrigeración a 4°C hasta el momento de los análisis.

## **2.3. Determinaciones analíticas**

### **2.3.1. Análisis del agua electrolizada ácida**

Antes de comenzar el estudio preliminar, se determinaron los valores de pH, conductividad y sólidos disueltos totales (TDS) empleando un multímetro MM 40 (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España). El potencial de oxido-reducción (POR) se determinó mediante pH-metro con un electrodo metálico de platino (Crison Instruments S.A).

El contenido en cloro libre se determinó con un fotómetro PCCHACKIT CHLORINE (Lovibond® Water Testing, Postmund, Alemania) siguiendo las especificaciones dadas por el fabricante.

### **2.3.2. Determinaciones analíticas en las muestras de pescado**

Se llevó a cabo la determinación de la composición centesimal (contenido en humedad, lípidos, proteínas y cenizas), así como el pH y  $a_w$  de la materia prima de partida (lubina fresca).

En el estudio preliminar se determinó el pH y se llevó a cabo el recuento de aerobios mesófilos, en las muestras inmediatamente después de los tratamientos (día 0), y a los 3 y 6 días de almacenamiento a 4 °C.

Los análisis llevados a cabo en el estudio definitivo fueron: pH, contenido en humedad y en nitrógeno básico volátil total (NBVT), test del ácido tiobarbitúrico (TBA), valor  $K_1$  y determinaciones microbiológicas (aerobios mesófilos y enterobacterias). Todos los análisis se llevaron a cabo a día 0, 3, 6 y 9 de almacenamiento.

La determinación del contenido en humedad, cenizas, lípidos y proteínas se realizó siguiendo los procedimientos 950.46, 920.153, 991.36 y 928.08, respectivamente, descritos por la AOAC (1997).

En la determinación del valor de  $a_w$  se empleó un higrómetro de punto de rocío (GBX scientific FA-st/lab, Cédex, Francia).

El pH de las muestras de lubina se midió directamente sobre los filetes empleando un pH-metro Crison micropH 2001 (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España) con electrodo de punción. De cada filete se tomaron 6 lecturas en puntos diferentes del mismo, a partir de las cuales se calculó el valor promedio de pH.

La determinación del contenido en nitrógeno básico volátil total (NBVT) se realizó mediante destilación por arrastre de vapor y valoración con ácido sulfúrico, según el método descrito por Malle y Tao (1987).

Para la realización de los análisis microbiológicos se pesaron asepticamente 10 g de muestra en una bolsa de stomacher, se añadieron 90 mL de agua de peptona tamponada y se homogeneizaron en un stomacher durante 1 min (dilución  $10^{-1}$ ). A partir de esta dilución se prepararon las diluciones decimales seriadas.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se hizo mediante siembra en profundidad en Agar Plate Count (PCA), después de 72 h de incubación a 30 °C (ISO 4833:2003).

El recuento de enterobacterias se realizó mediante siembra en doble capa en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Scharlau). Las placas se incubaron a  $37 \pm 1$  °C durante 24 h (Pascual y Calderón, 2000).

Con el objeto de evaluar la oxidación lipídica se realizó el test del ácido tiobarbitúrico (índice del TBA), según el procedimiento colorimétrico descrito por Vyncke (1995).

Los compuestos relacionados con la degradación del ATP, inosina monofosfato (IMP), inosina (Ino) y la hipoxantina (Hx) fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en un cromatógrafo Jasco (Essek, UK) con detector Diode-Array, siguiendo el método descrito por Barat et al. (2008). La identificación de los metabolitos estudiados se realizó por comparación de los tiempos de retención de los analitos en las muestras con los de patrones analizados en las mismas condiciones. Se confirmó por el método de adición de patrón. El método de cuantificación empleado fue el del estándar externo.

Con las concentraciones de IMP, Ino y Hx se calculó el valor del parámetro  $K_1$ , empleando la ecuación 1:

$$K_1(\%) = \frac{[Ino] + [Hx]}{[IMP] + [Ino] + [Hx]} \times 100. \text{ (ec. 1)}$$

## 2.4. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de la varianza simple para comprobar si existían diferencias significativas entre tratamientos, tomando como variables los parámetros analizados y como factor el tratamiento. En el estudio definitivo, para cada uno de los parámetros se realizó un análisis multifactor tomando como factores el tiempo y el tratamiento, teniendo en cuenta la interacción entre ambos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Caracterización del agua electrolizada

En la tabla 1 se muestran los valores de pH, TDS, potencial de oxidoreducción (POR), conductividad y cloro libre del agua electrolizada ácida y del agua de red (tabla 1).

**TABLA 1.** Caracterización físico-química del agua electrolizada ácida (EAW) y del agua de red (AR).

	pH	TDS (g/l)	POR (mV)	Conductividad (μS/cm)	Cloro libre <sup>-</sup> (mg/l)
EAW	2,61±0,04	1,829±0,761	1012	2063,6±721,2	55
AR	7,47±0,20	0,623±0,099	546	980±42	1,16

Los valores promedios del agua electrolizada ácida producida por el equipo ROX-10WB-E, coinciden con la bibliografía consultada (Mahmoud et al. 2006; Koide et al., 2008; Huang et al., 2005; 2008).

### 3.2. Caracterización de la materia prima.

Los valores promedio obtenidos en la caracterización físico-química de la lubina fresca, empleada como materia prima en este estudio se muestran en la tabla 2.

La composición centesimal (humedad, cenizas, lípidos y proteínas) de la lubina empleada como materia prima coincide con la obtenida por otros autores para esta misma especie de pescado (Erkan y Özden, 2007; Fuentes et al., 2010; Kyrana y Lougovois, 2002).

Los valores de actividad de agua ( $a_w$ ) obtenidos en este estudio se encuentran entre los valores típicos de pescado fresco (0,980-0,990). Los valores de  $a_w$  obtenidos fueron altos, y similares a los dados por otros autores para esta misma especie de pescado (Cakli et al., 2007; Fuentes et al., 2010). Los valores de pH en las muestras de lubina fresca fueron

similares a los obtenidos por otros autores para esta misma especie de pescado (Fuentes et al., 2010), encontrándose dentro de los límites establecidos por Belitz y Grosch (1997) para el pescado fresco (6,0-6,5).

**TABLA 2.** Composición centesimal y parámetros físico-químicos de lubina.

<i>Composición centesimal (g/100g)</i>	
Humedad	74,56±0,26
Lípidos	4,38±0,72
Proteína	19,10±0,33
Cenizas	1,21±0,02
<i>Parámetros físico-químicos</i>	
a <sub>w</sub>	0,988±0,002
pH	6,25±0,09

### 3.3. Estudio preliminar

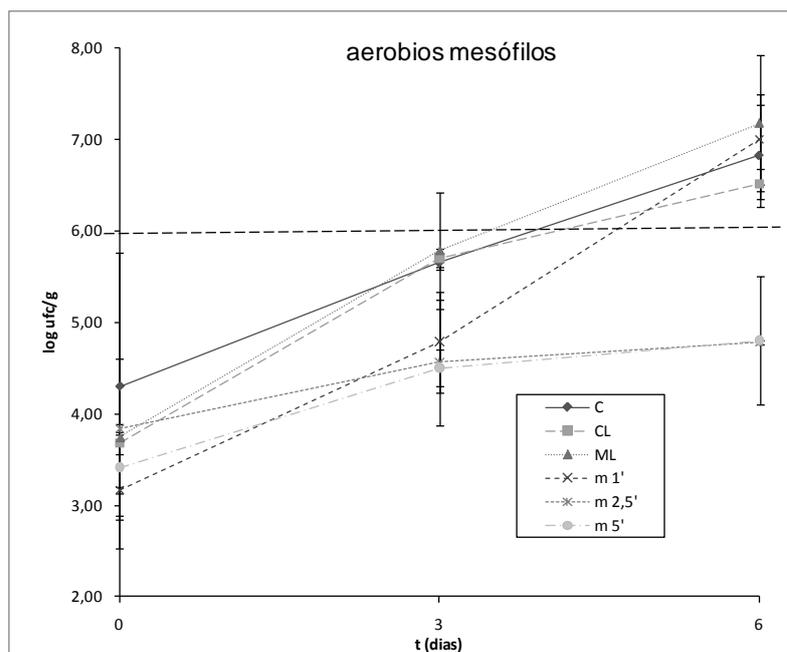
Con el objetivo de seleccionar los tratamientos más adecuados para llevar a cabo un estudio completo sobre el posible efecto conservante del agua electrolizada ácida en lubina fresca, se estudiaron 3 tiempos distintos de inmersión en agua electrolizada, así como un tratamiento que incluía solo un lavado durante 5 s. Asimismo, se emplearon dos muestras control, tal y como se describe en Material y Métodos. En la tabla 3 se muestran los valores de pH obtenidos.

**TABLA 3.** Valores de pH para las distintas muestras de lubina fresca almacenadas durante 6 días. (Códigos de las muestras dados en la figura 3).

Muestra	C	CL	ML	m 1'	m 2,5'	m 5'
t (días)						
0	6,25±0,09	6,34±0,12	6,05±0,08	6,06±0,08	6,03±0,20	6,14±0,11
3	6,21±0,12	6,36±0,05	6,30±0,12	6,26±0,05	6,36±0,15	6,28±0,08
6	6,32±0,15	6,24±0,05	6,23±0,05	6,29±0,08	6,34±0,12	6,25±0,12

La evolución de pH fue similar en todas las muestras. El ligero aumento del pH durante el almacenamiento indica la aparición de bases volátiles que se forman durante el deterioro del pescado.

La evolución en los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos realizados en el estudio preliminar se muestran en la figura 5.



**FIGURA 5.** Evolución de microorganismos aerobios mesófilos en lubina fresca. (Códigos de las muestras dados en la figura 3). La línea horizontal corresponde al límite legal establecido.

Respecto al recuento de mesófilos, las diferencias encontradas entre las distintas muestras a día 0 no fueron significativas, lo que implica que el tratamiento no afectó al nivel de mesófilos en los filetes recién tratados. Sin embargo, la evolución de este microorganismo fue diferente según el tiempo de inmersión en el agua electrolizada. Las dos muestras control y la muestra lavada con EAW, mostraron recuentos cercanos a 6 ciclos logarítmicos (límite establecido por la legislación) (CEE, 2005a) a día 3 de almacenamiento. A día 6 de almacenamiento, estas tres muestras, junto con la que había sido tratada durante 1 min en el EAW habían superado ampliamente este límite. Sin embargo, las muestras m2,5' y m5', estuvieron por debajo del límite durante los 6 días de estudio. La inmersión en EAW durante 2,5 y 5 min, consiguió una reducción de la carga microbiana total de hasta 2 ciclos logarítmicos, al final del periodo de estudio. No se observaron diferencias significativas entre estos dos tratamientos. Estos resultados indicarían la efectividad del agua electrolizada ácida en la conservación del pescado fresco, para tiempos de inmersión de como mínimo 2,5 min.

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó el tratamiento de inmersión en EAW durante 2,5 min, ya que no había diferencias con el tratamiento de 5 min. Además se decidió someter a las muestras también a un tratamiento más largo (inmersión durante 10 min). Así el estudio definitivo se llevó a cabo con estos dos tratamientos y una muestra control.

### 3.4. Efecto del agua electrolizada en las muestras de lubina recién tratadas.

Los valores obtenidos en la determinación físico-química y microbiológica de las muestras de lubina a día 0 de almacenamiento se muestran en la tabla 4.

**TABLA 4.** Caracterización físico-química y microbiológica inicial (día 0 de almacenamiento) de la muestra de lubina fresca. (Códigos de las muestras dados en la figura 4).

	C	M 2,5'	M 10'	
pH	6,24±0,07 <sup>a</sup>	6,22±0,06 <sup>a</sup>	6,17±0,05 <sup>a</sup>	ns
Humedad (g/100 g)	69,87±1,03 <sup>a</sup>	71,02±2,10 <sup>a</sup>	69,30±1,47 <sup>a</sup>	ns
NBVT (mg NBVT/100 g)	16,793±0,906 <sup>ab</sup>	18,402±0,142 <sup>b</sup>	15,883±0,465 <sup>a</sup>	ns
TBA (mg malonaldehído/Kg)	0,060±0,006 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	ns
IMP (μmol/g)	9,78±0,99 <sup>a</sup>	7,57±1,27 <sup>a</sup>	8,16±1,27 <sup>a</sup>	ns
Ino (μmol/g)	3,26±0,42 <sup>a</sup>	2,04±0,71 <sup>a</sup>	2,00±0,57 <sup>a</sup>	ns
Hx (μmol/g)	1,87±0,71 <sup>a</sup>	1,76±0,33 <sup>a</sup>	1,70±0,28 <sup>a</sup>	ns
Valor K <sub>1</sub> (%)	34,21±2,72 <sup>a</sup>	33,15±2,36 <sup>a</sup>	31,05±1,60 <sup>a</sup>	ns
Mesófilos (log ufc/g)	4,57±0,31 <sup>a</sup>	4,97±0,50 <sup>a</sup>	4,56±0,16 <sup>a</sup>	ns
Enterobacterias (log ufc/g)	1,90±0,04 <sup>a</sup>	2,53±0,67 <sup>a</sup>	2,20±0,25 <sup>a</sup>	ns

Letras iguales en una misma fila indican la pertenencia a grupos homogéneos. ns: diferencias no significativas

Los tratamientos con agua electrolizada ácida no provocaron cambios significativos en el pH del pescado respecto a las muestras sin tratar.

Respecto a los valores de NBVT, se observaron diferencias entre las distintas muestras, siendo la lubina tratada durante 10 min la que presentó un menor valor para este parámetro y la tratada durante 2,5 min el valor mayor. Considerando que la concentración de NBVT en pescado recién capturado oscila entre los 5 y los 20 mg/100 g (Huss, 1998), y que niveles de 30 mg/100 g son generalmente considerados como el límite de aceptación para pescado almacenado en hielo (CEE, 2005b), todas las muestras analizadas se encontraban por debajo de este límite, y por tanto aptas para su consumo en el momento de análisis.

Los valores del índice de TBA a día 0 fueron similares a los obtenidos por diferentes autores para lubina fresca (Cakli et al., 2007; Kyrana y Lougovois, 2002), que relacionaron dichos valores con una buena calidad del pescado fresco. El agua electrolizada no tuvo efecto oxidante sobre las muestras recién tratadas.

Los altos valores de IMP y los bajos valores de Hx, así como el valor K<sub>1</sub> a día 0 indicaron una adecuada calidad de la materia prima. Los valores de IMP fueron mayores en las muestras control, lo que podría indicar la degradación de este compuesto por acción del EAW. Sin embargo, el análisis estadístico mostró que las diferencias encontradas entre las tres muestras no fueron significativas para ninguno de estos cuatro parámetros.

Por tanto, se puede decir que el EAW no tuvo ningún efecto en los parámetros físico-químicos estudiados en las muestras recién tratadas, ya

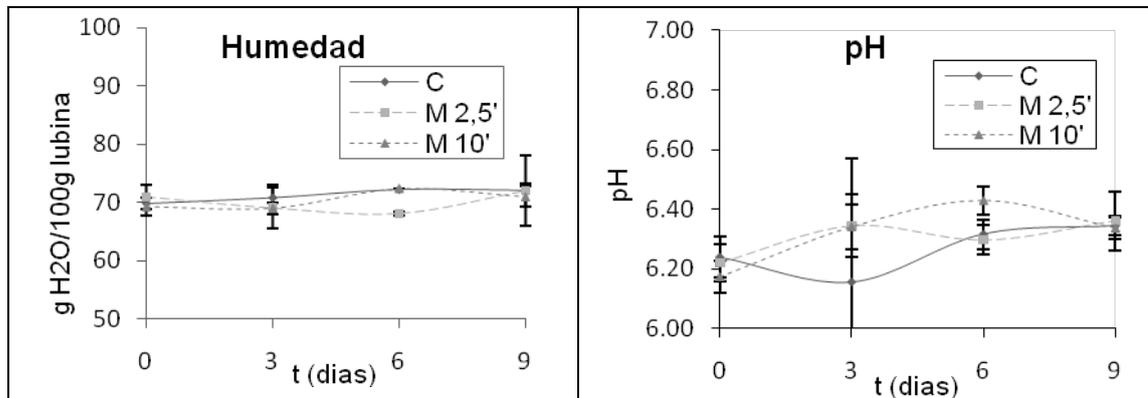
que las diferencias puntuales encontradas podrían deberse simplemente a la heterogeneidad en la materia prima.

Respecto a los microorganismos estudiados, cabe destacar que los recuentos de aerobios mesófilos obtenidos a día 0 fueron ligeramente superiores a los observados para la lubina empleada en el estudio previo. Los tiempos de inmersión en EAW ensayados no consiguieron reducir la carga microbiológica inicial del pescado.

### 3.5. Efecto del agua electrolizada en la evolución de la calidad físico-química y microbiológica de lubina fresca.

#### ***Evolución de parámetros físico-químicos***

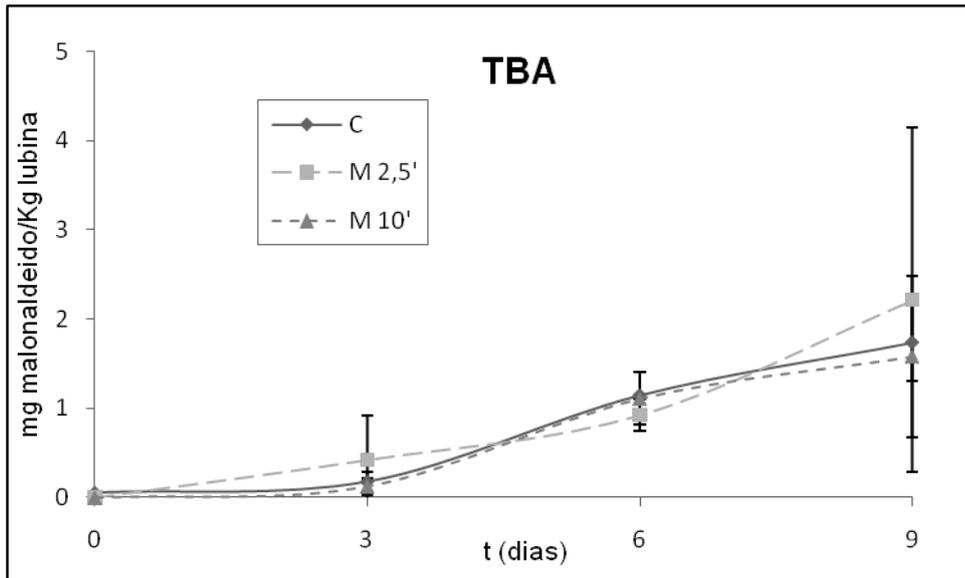
La figura 6 muestra la evolución de humedad y pH durante el almacenamiento en refrigeración. No se observó ninguna tendencia a lo largo del periodo de estudio en cuanto a la evolución de humedad. En relación a los valores de pH, se observó un ligero aumento a lo largo del tiempo de almacenamiento. En general, se considera que los valores de pH del músculo de pescado aumentan gradualmente durante el almacenamiento, debido a la producción de metabolitos alcalinos de origen bacteriano, por lo que, tal y como han señalado diferentes autores, existiría una relación directa entre los valores de pH y los recuentos de microorganismos totales (Kyra y Lougovois, 2002).



**FIGURA 6.** Evolución de humedad y pH en lubina fresca durante el almacenamiento en refrigeración. (Códigos de las muestras dados en la figura 4).

En la figura 7 se observa la evolución del índice del TBA. En las tres muestras estudiadas hubo un aumento progresivo en este parámetro, especialmente a partir del día 3 de almacenamiento. Aunque no hay límites legales establecidos para este parámetro, algunos autores han correlacionado los valores del índice de TBA con medidas sensoriales. Así, Connell (1995) estableció que a partir de 1-2 mg malonaldehído/kg el pescado es rechazado debido a sabores y aromas desagradables. Ruiz-Capillas y Morál (2001) determinaron que el nivel mínimo de malonaldehído en merluza detectable por los catadores correspondía a 1,44 mg/kg. El día 6

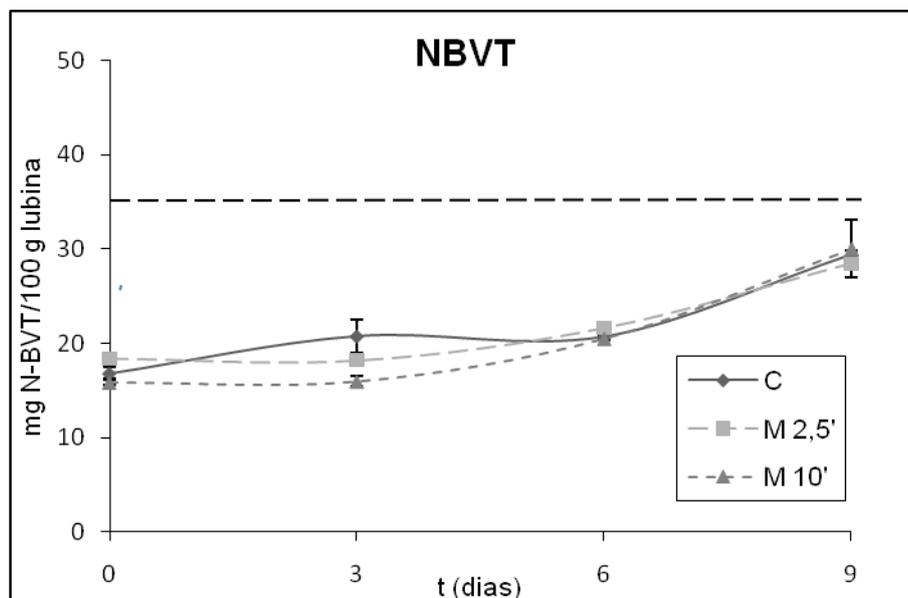
de almacenamiento, el índice de TBA para todas las muestras oscilaba entre 0,9 y 1,2. El día 9 todos los tratamientos superaron el valor de 1,5 mg malonaldehído/kg. El agua electrolizada ácida tiene poder oxidante; sin embargo, en este estudio no hubo diferencias en el enranciamiento lipídico entre la muestra control y las tratadas con EAW. Por tanto, se puede concluir que el agua electrolizada ácida no supone un problema de oxidación en esta especie de pescado.



**FIGURA 7.** Evolución del índice del TBA en lubina fresca durante el almacenamiento en refrigeración. (Códigos de las muestras dados en la figura 4).

La evolución del nitrógeno básico volátil total se muestra en la figura 8. El contenido en NBVT en las muestras de lubina aumentó significativamente durante el periodo de almacenamiento, independientemente del tratamiento utilizado. Este parámetro es empleado como índice de calidad en pescado, ya que se considera que su incremento está relacionado con el deterioro microbiano del producto. La Unión Europea ha establecido el límite de aceptación de 35 mg NBVT/100 g de pescado (CEE, 2005b), aunque con anterioridad, ya se habían establecido límites entre 25 y 35 mg/100 g, por encima de los cuales se podría considerar que el pescado está deteriorado. En este estudio los valores más altos alcanzados al final del almacenamiento fueron de 30 mg NBVT/100 g, por lo que en ningún momento se superó el límite establecido por la Unión Europea. Sin embargo, por los resultados microbiológicos que más adelante se comentan, se sabe que las muestras eran microbiológicamente inaceptables a partir de aproximadamente los 5 días de almacenamiento. El hecho de que los límites de este parámetro no hayan sido adecuados para evaluar la vida útil de la lubina se debe a que, según Dalgaard (2000) estos límites críticos pueden variar de un pescado a otro, o en función de si éste es fresco o procesado. Por ejemplo, en arenque se midió un contenido en NBVT de 75 mg/100 g, cuando aún el producto

tenía una calidad sensorial aceptable. Sin embargo, en gambas cocidas saladas envasadas en atmósfera modificada, a niveles de 10-20 mg NBVT/100 g, el producto era rechazado sensorialmente. Con respecto a la efectividad del EAW sobre la formación de NBVT, cabe destacar que no ejerció ningún efecto conservante, ya que no hubo diferencias significativas entre muestras, tal y como sucedía en los parámetros ya comentados.

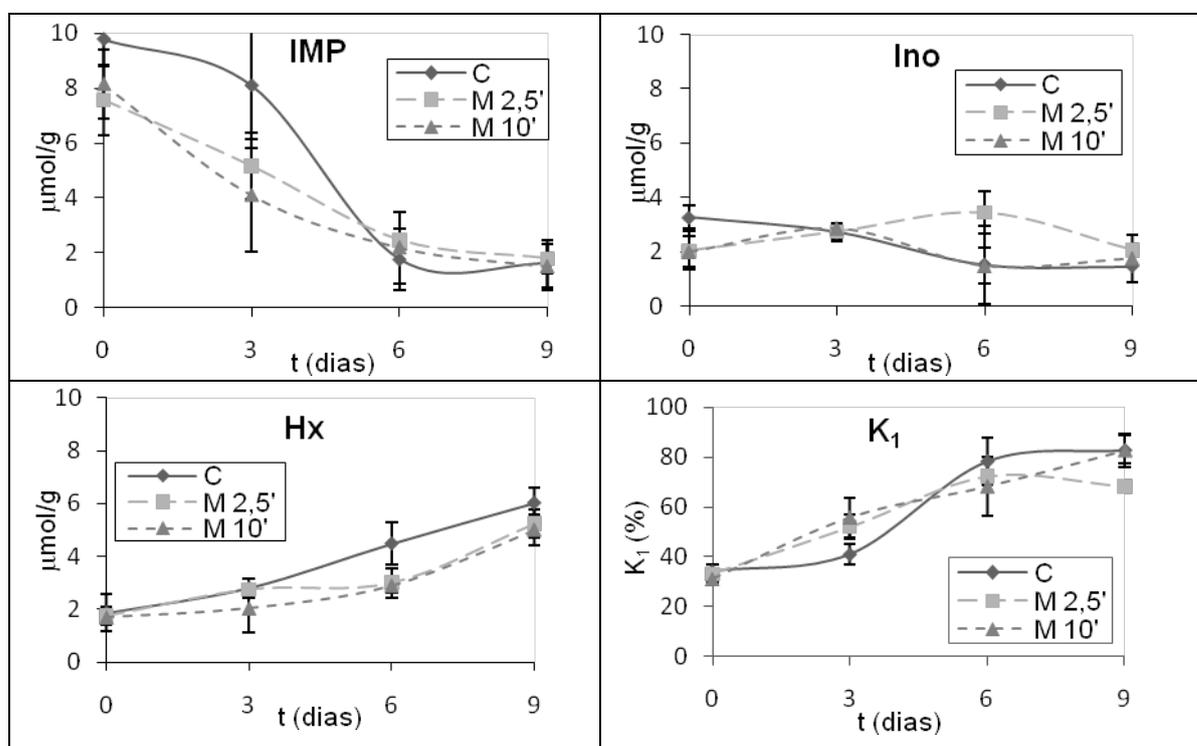


**FIGURA 8.** Evolución NBV-T en lubina fresca durante el almacenamiento en refrigeración. (Códigos de las muestras dados en la figura 4). La línea horizontal representa el límite de aceptación.

La evolución del contenido en IMP, inosina e hipoxantina, se muestra en la figura 9. Los metabolitos de nucleótidos que se acumulan en el músculo de pescado, así como la proporción en la que aumenta o disminuye su concentración es determinada por la actividad relativa de diferentes enzimas involucradas en la secuencia de cambios degradativos (Lougovois et al., 2002). El contenido en IMP descendió a lo largo del almacenamiento en la muestra control y en las tratadas con EAW, mientras que se observó un aumento de Hx. Este hecho pone de manifiesto la degradación que sufrieron las muestras de lubina fresca almacenadas en refrigeración. El principal metabolito del IMP al final del almacenamiento fue la hipoxantina, ya que la inosina, en general, se mantuvo estable durante el periodo de estudio. Los cambios en los metabolitos de nucleótidos contribuyen directamente en la calidad sensorial del pescado, mostrando el IMP un marcado efecto en la mejora del sabor, particularmente en combinación con el ácido glutámico. Por el contrario, la Hx contribuye al sabor amargo del pescado almacenado en refrigeración que está cerca del límite de aceptabilidad (Lindsay, 1994). En este sentido, algunos autores han puesto de manifiesto la correlación existente entre la evaluación sensorial de pescado y la concentración de IMP y la de Hx. Sin embargo, debido a las variaciones en la cantidad inicial de ATP presente en el músculo de diferentes pescados, parece poco probable

que la determinación individual del IMP o de la Hx, puedan dar información precisa sobre la vida útil restante en una especie de pescado determinada. El valor  $K_1$ , que mide principalmente la extensión de la degradación del IMP, reduce esta variabilidad y ha sido establecido como un indicador de calidad y frescura para un gran número de especies de pescado (Ehira y Uchiyama, 1987). En la figura 9 se muestra la evolución del valor  $K_1$ . En todos los tratamientos se observó un importante incremento a lo largo del almacenamiento, especialmente hasta el día 6. Özogul et al. (2006) establecieron un valor  $K_1$  de 72% cuando muestras de lubina fresca alcanzaban el límite de aceptabilidad dado por un panel de catadores. En este estudio ese valor se alcanzó aproximadamente a los 6 días de almacenamiento, lo que pondría de manifiesto que las muestras ya estaban fuera del rango de aceptabilidad. Esto concuerda con los análisis microbiológicos que se comentan a continuación.

El análisis estadístico demostró que el agua electrolizada no tuvo efecto significativo en la degradación de nucleótidos y de sus metabolitos.



**FIGURA 9.** Evolución del contenido en IMP, inosina, hipoxantina y valor  $K_1$ , en lubina fresca durante el almacenamiento en refrigeración. (Códigos de las muestras dados en la figura 4).

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis multifactor realizado. Se puede observar que el tratamiento no tuvo efecto significativo en la variación de los parámetros fisicoquímicos evaluados, tal y como se ha descrito anteriormente. El tiempo de almacenamiento afectó especialmente al valor  $K_1$  (F-ratio = 74,36), lo que confirma que este parámetro es un excelente

indicador de la pérdida de frescura del pescado. No hubo interacción entre el tratamiento empleado y el tiempo de almacenamiento en ningún caso.

**TABLA 5.** Resultados del análisis multifactor (ANOVA) realizado para los factores Tratamiento (T) y tiempo de almacenamiento (t).

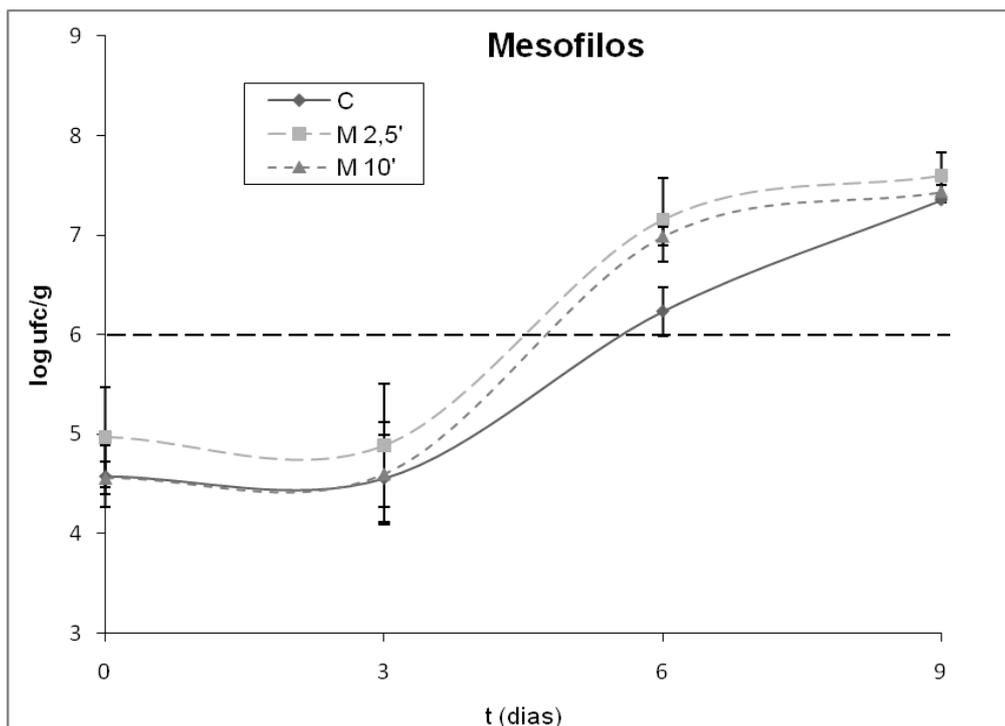
	T		t		T*t	
	F-ratio		F-ratio		F-ratio	
pH	0,37	ns	1,33	ns	0,54	ns
Humedad	0,53	ns	0,92	ns	0,77	ns
NBVT	0,79	ns	9,51	**	0,95	ns
Índice del TBA	0,47	ns	3,83	*	0,19	ns
IMP	1,61	ns	38,29	***	1,68	ns
Ino	1,64	ns	3,34	ns	2,78	ns
Hx	1,31	ns	5,67	*	0,63	ns
Valor K <sub>1</sub>	0,61	ns	74,36	***	2,74	ns
Mesofilos	3,53	ns	96,73	***	0,61	ns
Enterobacterias	4,00	*	21,65	***	0,27	ns

\*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns = no significativas

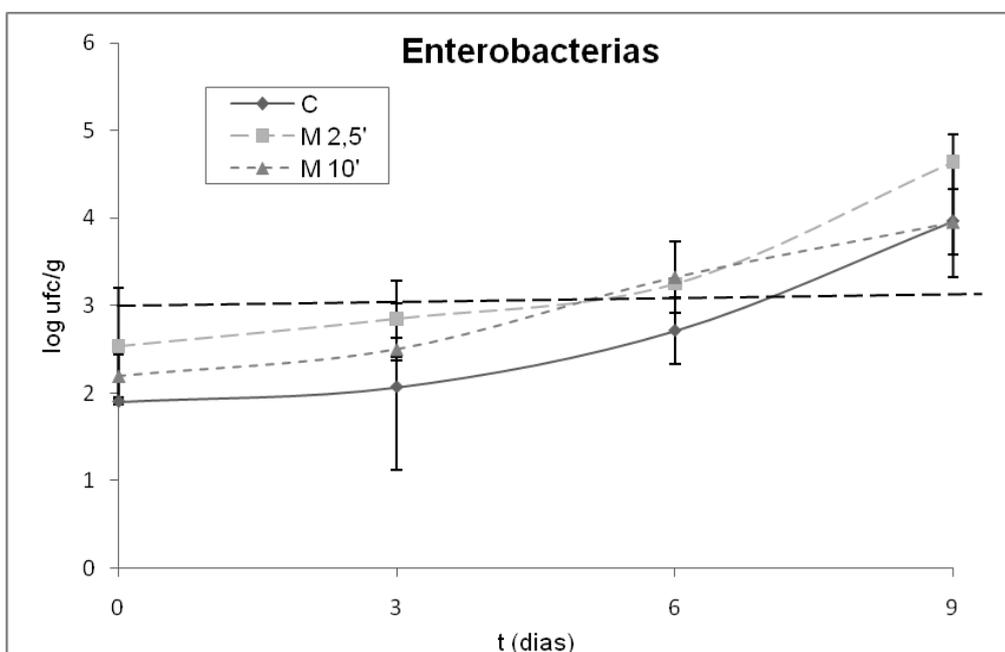
### ***Evolución de la calidad microbiológica***

La figura 10 muestra la evolución de microorganismos mesófilos en las distintas muestras de lubina fresca. Se puede observar un aumento durante el almacenamiento, tanto en las muestras control como en las tratadas con el agua electrolizada ácida. Considerando el límite legal de 6 ciclos logarítmicos (CEE, 2005a), las tres muestras alcanzaron este valor antes de los 6 días de almacenamiento. Este hecho demuestra que el EAW no tuvo ningún efecto en la conservación de lubina, tal y como se ha demostrado en la calidad físico-química. Al comparar estos resultados con los obtenidos en el estudio preliminar se observa que en el estudio previo, la muestra tratada durante 2,5 min con EAW presentaba recuentos de mesófilos mucho más bajos que en el estudio definitivo.

En relación al crecimiento de enterobacterias, en la figura 11 se observa la misma tendencia descrita para mesófilos. El límite de  $10^3$  cfu/g establecido por la legislación (CEE, 2005a) se superó antes de los 6 días de almacenamiento, excepto para la muestra control. Estos resultados pondrían de nuevo de manifiesto la incapacidad de los tratamientos realizados con EAW para prolongar la vida útil de lubina fresca almacenada en refrigeración.



**FIGURA 10.** Evolución de los recuentos de microorganismos mesófilos en lubina fresca durante el almacenamiento en refrigeración. (Códigos de las muestras dados en la figura 4). La línea horizontal corresponde al límite legal establecido.



**FIGURA 11.** Evolución de los recuentos de enterobacterias en lubina fresca durante el almacenamiento en refrigeración. (Códigos de las muestras dados en la figura 4). La línea horizontal corresponde al límite legal establecido.

Debido a la discrepancia en los resultados obtenidos entre el estudio preliminar y el estudio definitivo, en relación al efecto conservante del EAW sobre las muestras de pescado, se volvió a analizar el agua electrolizada ácida y se observó que todos los parámetros evaluados se mantuvieron, excepto el cloro libre que descendió a 0,14 ppm. Este hecho implica que el agua electrolizada ácida empleada en el estudio definitivo no contenía prácticamente cloro libre y, por tanto, el poder conservante sobre lubina fresca observado en el estudio preliminar, única y exclusivamente se debió al alto contenido en cloro libre y no al alto potencial de oxidación-reducción, como han determinado algunos autores (Rionder et al., 2000).

#### 4. CONCLUSIONES

La evolución de los parámetros físico-químicos y microbiológicos, pusieron de manifiesto que la inmersión de hasta 10 min con agua electrolizada ácida con bajo contenido en cloro libre, no consigue prolongar la vida útil de lubina fresca en refrigeración.

La inmersión en agua electrolizada ácida con un alto contenido en cloro libre (55 ppm), durante un mínimo de 2,5 min tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de microorganismos mesófilos en lubina almacenada en refrigeración. Sin embargo, cuando los niveles de cloro libre son similares a los del agua de red, el EAW no ejerce ningún efecto en la conservación de esta especie de pescado, a pesar de su alto potencial de oxidación-reducción y de su bajo pH.

#### 5. REFERENCIAS

- AOAC. 1997. Official Methods of analysis, 16th Ed. *Association of Official Analytical chemists*, Arlington, Virginia.
- Barat J.M.; Gil L.; Breijo E.; Aristoy M.C.; Toldrà F.; Martínez R.; Soto J. 2008. Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chemistry*, 108: 681–688.
- Belitz, H.D. y Grosch, D. 1997. Peces, ballenas, crustáceos y moluscos. Química de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 667-689.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., Tolasa, S. 2007. Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18: 391-397.
- CEE (2005a). Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. . Diario Oficial de la Unión Europea, L338, 1.
- CEE, (2005b). Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos (...). Sección II, Capítulo I: Valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT) para determinadas categorías de productos de la pesca y métodos de análisis que deberán utilizarse. Diario Oficial de la Unión Europea, L338, 36.
- Connell, J.J. 1995. Method of assessing and selecting for quality. En: Control fish quality (4<sup>th</sup> ed). *Fishing News Books Ltd*, Surrey, 157: 159-160.
- Dalgaard, P. 2000. Freshness, quality and safety in seafoods. *Flair-Flow Europe Technical Manual*. F-FE 380A/00.
- Hira, S. y Uchiyama, H. 1987. Determination of fish freshness using the k value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. *D. E. Kramer, & J. Liston* (Eds.), *Seafood quality determination*, 185-207.

- Erkan N. y Özden Ö. 2007. The changes of fatty acid and amino acid compositions in sea bream (*Sparus aurata*) during irradiation process. *Radiation Physics and Chemistry* 76: 1636-1641.
- Fuentes, A., Fernandez-Segovia, I., Serra, J.A., Barat, J.M. 2010. Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chemistry*, 119: 1514-1518.
- Gram L. y Dalgaard P. 2002. Fish spoilage bacteria. Problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3):262-266.
- Hsu S.Y. 2003. Effects of water flow rate, salt concentration and water temperature on efficiency of an electrolyzed oxidizing water generator. *Journal of Food Engineering*, 60: 469-473.
- Huang, Y.R.; Chyuan-Yuan Shiau; Yen-Con Hung; Deng-Fwu Hwang. 2005. Change of Hygienic Quality and Freshness in tuna Treated with electrolyzed Water and Carbon Monoxide Gas during Refrigerated and Frozen Storage. *Journal of Food Science*, 71: 127-133.
- Huang, Y.R.; Hung, Y.C; Hsu, S.Y; Huang, Y.W; Hwang, D-F. 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control*, 19: 329-345.
- Huang, Y.R; Hung-Sheng Hsieh; Shin-Yuan Lin; Shin-Jung Lin; Yen-Con Hung; Deng-Fwu Hwang. 2006. Application of electrolyzed oxidizing water on the reduction of bacterial decontamination for seafood. *Food Control*, 17: 987-993.
- Huss, H.H. 1998. Evaluación de la calidad del pescado. En: El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Colección FAO Pesca N° 348, Roma, 131-154.
- ISO 2003. Norma ISO 4833:2003. Microbiología de los alimentos para el consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C.
- Isobe, S. y Itoh K. 2004. Efficacy of acidic electrolyzed water ice for pathogen control on lettuce. *Journal of Food Protection*, 67-11: 2544-2549.
- Kim, C; Hung, Y.C; Brackett, R.E; Lin, C.S. 2000. Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for inactivation of food-related pathogens. *Journal of Food Protection*, 63: 19-24.
- Koide S.; Takeda J.; Shono H.; Griffiths G. 2009. Disinfection efficacy of slightly acidic electrolyzed water on fresh cut cabbage. *Food Control*, 20: 294-297.
- Koseki, S. y Itoh K. 2001. Prediction of Microbial Growth in fresh cut vegetables treated with Acidic Electrolyzed Water during storage under various temperature conditions. *Journal of Food Protection*, 64-12: 1935-1942.
- Kyranas V.R. y Lougovois V.P. 2002. Sensory and chemical and microbial assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 319-328.
- Lindsay, R. C. 1994. Flavour of fish. En F. Shahidi, & J. R. Botta (Eds.), *Seafoods chemistry, processing technology and quality* London: Blackie Academic & Professional, 75-84.
- Lougovois, V.P.; Kyranas, E.R.; Kyranas, V.R. 2003. Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, 36: 551-560.
- Mahmoud B.S.M.; Yamazaki K.; Shin I.; Suzuki T. 2006. A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. *Food Chemistry*, 99: 656-662.
- Malle, P. y Tao, S.H 1987. Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam distillation. *Journal of Food Protection*, 50-(9): 756-769.
- Northcutt, J; Smith, D; Ingram, K.D; Hinton Jr, A; Musgrove, M. 2007. Recovery of bacteria from broiler carcasses after spray washing with acidified electrolyzed water or sodium hypochlorite solutions. *Poultry Science*, 86: 2239-2244.
- Ozer Nil P. y Demirci, A. 2006. Electrolyzed oxidizing water treatment for decontamination of raw salmon inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Engineering*, 72: 234-241.
- Özogul, F.; Gökbulut, C.; Özogul, Y.; Özyurt, G. 2006. Biogenic amine production and nucleotide ratios in gutted wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice, wrapped in aluminium foil and wrapped in cling film at 4 °C. *Food Chemistry*, 98(1):76-84.

- Park, C.M; Hung, Y.C; Lin, C.S; Brackett, R. 2005. Efficacy of electrolyzed water in inactivating *Salmonella enteritidis* and *Listeria Monocytogenes* on shell eggs. *Journal of Food Protection*, 68(5): 986-990.
- Pascual, M.R. y Calderón V. 2000. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos, Madrid, España.
- Rionder C.; Cachon R.; Wachè Y.; Alcaraz G.; Divies C. 2000. Extracellular oxidoreduction potential modifies carbón and electron flow in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 128: 620-626.
- Ruiz-Capillas, C. y Moral, A. 2001. Residual effect of CO<sub>2</sub> on hake (*Merluccis merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, 212: 413-420.
- Tsuji S.; Kawano S.; Oshita M.; Ohmae A.; Shinomura Y.; Miyazaki Y.; Hiraoka S.; Matsuzawa Y.; Kamada T.; Hori M.; Maeda T. 1999. Endoscope Disinfection Using Acidic Electrolytic Water. *Endoscopy*, 31: 528-535
- Vandekinderen I.; Devlieghere F.; De'Meulenaer B.; Veramme K.; Ragaert P. 2008. Impact of decontamination agents and a packaging delay on the respiration rate of fresh-cut produce. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 277-282
- Vyncke W., 1995. The determination of total volatile bases in eye fluid as a non-destructive spoliage assessment test for fish. *Archiv-fuer-Lebensmittelhygiene*, 46: 96-98.