

EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE HAMBURGUESAS ELABORADAS A BASE DE PESCADO Y ALGAS



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y CALIDAD
ALIMENTARIA**

**Alumna
Laura Martí Frasquet**

**Directora
Ana Fuentes López**

**Codirectora
Isabel Fernández Segovia**

EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE HAMBURGUESAS ELABORADAS A BASE DE PESCADO Y ALGAS

Martí, L.; Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la vida útil de una nueva hamburguesa de atún y algas durante su almacenamiento en refrigeración, envasada en atmósfera modificada (30% CO₂ - 20% O₂ - 50% N₂) y a vacío. Para ello se llevaron a cabo periódicamente análisis físico-químicos y microbiológicos durante los 17 días de estudio. Se observó un aumento progresivo del N-BVT y N-TMA durante el almacenamiento, siendo éste más acusado en el envasado a vacío. Aunque los valores de TBA indicaron un nivel de oxidación muy bajo, tuvo lugar un ligero aumento de este parámetro durante el tiempo de almacenamiento. Se observó un menor grado de oxidación en las hamburguesas envasadas a vacío, debido a la ausencia de O₂. Los parámetros texturales de dureza, gomosidad y masticabilidad aumentaron a lo largo del estudio, especialmente en las muestras envasadas a vacío. Los cambios en los parámetros de color de las muestras indicarían un ligero pardeamiento de las hamburguesas durante el almacenamiento, especialmente en las envasadas a vacío. Los recuentos de mesófilos y enterobacterias aumentaron a lo largo del tiempo de estudio, siendo estos valores inferiores en el envasado en atmósfera modificada. En base al recuento de aerobios mesófilos se estableció una vida útil inferior a 10 días para las hamburguesas envasadas a vacío y a 14 días para las envasadas en atmósfera modificada.

PALABRAS CLAVE: atún, algas, hamburguesa, envasado a vacío, atmósfera modificada, vida útil.

RESUM

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar la vida útil d'una nova hamburguesa de tonyina i algues durant el seu emmagatzematge en refrigeració, envasada en atmosfera modificada (30% CO₂ - 20% O₂ - 50% N₂) i al buit. Per a realitzar-ho, es van dur a terme periòdicament anàlisis físicoquímics i microbiològics durant els 17 dies d'estudi. Es va observar un augment progressiu del N-BVT i N-TMA durant l'emmagatzematge, sent aquest més acusat en l'envasament a buit. Encara que els valors de TBA indicar un nivell d'oxidació molt baix, va tenir lloc un lleuger augment d'aquest paràmetre durant el temps d'emmagatzematge. Es va observar un menor grau d'oxidació en les hamburgueses envasades a buit, a causa de l'absència d'O₂. Els paràmetres texturals de duresa, gomositat i

masticabilidad van augmentar al llarg de l'estudi, especialment en les mostres envasades a buit. Els canvis en els paràmetres de color de les mostres indicarien un lleuger pardejament de les hamburgueses durant l'emmagatzematge, especialment en les envasades a buit. Els recomptes de mesòfils i enterobacteris van augmentar al llarg del temps d'estudi, sent aquests valors inferiors en l'envasat en atmosfera modificada. Sobre la base del recompte d'aerobis mesòfils es va establir una vida útil inferior a 10 dies per a les hamburgueses envasades a buit i de 14 dies per a les envasades en atmosfera modificada.

PARAULES CLAU: tonyina, algues, hamburguesa, envasat al buit, atmosfera modificada, vida útil.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the shelf-life of a new burger tuna and seaweed during refrigerated storage, packaged in modified atmosphere (30% CO₂ - 20% O₂ - 50% N₂) and vacuum. This will be carried out periodically physico-chemical and microbiological analyzes during the 17 day study. It was observed a progressive increase of the N-TMA and N-BVT during storage, this being more pronounced in the vacuum packaging. Although TBA values indicated a very low oxidation level, a small increase in this parameter took place during the storage time. A lower degree of oxidation was observed in vacuum packed hamburgers because of the absence of O₂. Textural parameters of hardness, gumminess and chewiness increased throughout the study, especially in vacuum-packed samples. The changes in the color parameters of the samples indicate a slight browning of burgers during storage, especially in a vacuum packaged. The mesophilic and enterobacteriaceae counts increased throughout the study period, and these lower values in modified atmosphere packaging. Based on the total plate count of mesophilic, it established 10 days shelf-life for vacuum packaged burgers and 14 days for modified atmosphere packaged.

KEYWORDS: tuna, seaweed, hamburguer, vacuum packaging, modified atmosphere, shelf-life.

1. INTRODUCCIÓN

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos productos alimentarios, que además de presentar un alto valor nutritivo también aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo. La utilización del pescado como base para el desarrollo de nuevos alimentos más saludables es una opción muy interesante, ya que es una fuente de proteínas de alto valor biológico, así como minerales, vitaminas y ácidos grasos ω -3, con efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares. Uno de los productos derivados de la pesca de más reciente incorporación en el mercado nacional son las hamburguesas de pescado. Aunque este tipo de productos surgiera principalmente pensando en el público infantil, con el objetivo de fomentar el consumo de pescado en uno de los colectivos que mayor rechazo muestra hacia los productos de la pesca, su creciente consolidación indica que es una buena alternativa en personas que no consumen habitualmente pescado (por la cantidad de espinas, por el olor o sabor, por no tener tiempo de limpiarlo o prepararlo) siendo también consumidores potenciales de este tipo de alimentos (Penalba, 2014).

Las algas son también un tipo de alimento que aparece cada vez más afianzado en el mercado, observándose cierta tendencia a incorporar algas en la dieta (Gómez, 2013). Las algas aportan vitaminas, minerales y compuestos bioactivos con elevada capacidad antioxidante, los cuales pueden mejorar la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento del alimento. Además, se caracterizan por su alto contenido en fibra, el cual puede oscilar entre el 30 y 62% del peso seco (Gómez, 2013), mucho mayor que en las frutas y hortalizas (Holdt & Kraan, 2011). Además de los beneficios para la salud que aportan el consumo de fibra, presentan también un interés tecnológico para la industria alimentaria. La fibra alimentaria consta de dos fracciones, la fibra soluble y la fibra insoluble. El contenido en fibra soluble suele ser mayor en las rojas (15-22% en peso seco) (Rupérez & Saura-Calixto, 2001; Holdt & Kraan, 2011) y se caracteriza por su habilidad de formar geles viscosos, en contacto con el agua. La fibra insoluble, mayoritaria en las algas pardas (27-40% en peso seco) (Murata & Nakazoe, 2001; Holdt & Kraan, 2011) no forma geles en contacto con el agua, sino que es capaz de retener agua en su matriz estructural. Debido a este interés tecnológico, la incorporación de algas en el desarrollo y/o mejora de algunos productos, ha sido estudiada principalmente en derivados cárnicos (Grupta & Abu-Ghannam, 2011); sin embargo en la actualidad no existen el mercado

productos elaborados donde se combinen como ingredientes el pescado y las algas.

El principal problema que tiene la comercialización de pescado fresco es que es uno de los alimentos más perecederos. Su vida útil se ve limitada en presencia de aire por los procesos oxidativos y por el crecimiento de microorganismos aerobios (Özogul et al., 2004), provocando cambios en sus características sensoriales, valor nutritivo y afectando la salud de los consumidores. En este sentido, el envasado es fundamental para garantizar la protección del producto y aumentar su vida útil, asegurando que el producto mantiene sus características sensoriales y condiciones higiénico-sanitarias (Hur et al., 2013). Los métodos de envasado más utilizados son el envasado al vacío y el envasado en atmósfera modificada.

El envasado en atmósfera modificada consiste en sustituir el aire del interior del envase por una mezcla de gases, siendo los gases más utilizados el dióxido de carbono (CO₂), nitrógeno (N₂) y oxígeno (O₂) que junto con el almacenamiento en frío pueden alargar la vida útil de un alimento, evitando, retardando o minimizando las reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas que ocasionan la degradación en los alimentos perecederos (Ospina & Cartagena, 2008). Por otro lado, el uso del envasado a vacío evita la oxidación del alimento y el deterioro del producto por microorganismos aerobios, debido a la eliminación del oxígeno en el entorno del producto, aumentando de esta manera la vida útil del mismo. Sin embargo, pueden tener lugar alteraciones producidas por microorganismos anaerobios y reacciones no-oxidativas, aunque éstas se minimizan cuando el producto se almacena en refrigeración (Fuentes, 2007).

El objetivo de este estudio fue evaluar la vida útil de una nueva hamburguesa de atún y algas durante su almacenamiento en refrigeración envasada en atmósfera modificada y a vacío.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparación de las muestras

En la elaboración de las hamburguesas se empleó como materia prima lomos de atún (*Thunnus albacares*) comercializados fileteados y congelados, con un glaseo declarado en el etiquetado del 10%. Las porciones congeladas fueron adquiridas envasadas a vacío, conteniendo cada envase 2 unidades. El peso neto de cada envase osciló entre 150 y 350 g en función del tamaño de las piezas.

Las algas empleadas fueron Kombu (*Laminaria ochroleuca*), Wakame (*Undaria pinnatifida*), Espagueti de mar (*Himanthalia elongata*) y agar-agar (*Gelidium sesquipedale*) adquiridas deshidratadas y en polvo, a la empresa Porto-Muiños (Cerceda, A Coruña, España).

Para la preparación de hamburguesas, el pescado fue descongelado en refrigeración durante 24 h. Una vez descongelado, se cortó a trozos pequeños y se pesó. A continuación, se añadieron a la picadora tanto el pescado correspondiente como la cantidad de algas necesaria para alcanzar en el producto final un contenido del 1% Wakame, 1% Kombu, 3% Espagueti de mar y 1,4% de agar-agar, donde se homogeneizaron hasta conseguir una masa uniforme. Finalmente, la mezcla se introdujo en pequeños moldes para darle la forma adecuada. La formulación empleada en la elaboración de las hamburguesas se basó en estudios previos (Penalba, 2014).

Las hamburguesas se dividieron aleatoriamente en dos lotes, un lote se envasó a vacío (V) y el otro lote en atmósfera modificada (M).

Para el lote envasado a vacío se emplearon bolsas de alta barrera donde se introdujeron 2 hamburguesas por bolsa que fueron selladas empleando una envasadora Tecnotrip mod. EV-25-CD (Barcelona, España).

Las muestras envasadas en atmósfera modificada se distribuyeron en barquetas de PP-EVOH-PP de alta barrera (dimensiones 15 x 11 x 5 cm) selladas empleando un film PP-PET de 84 µm de espesor. Dentro de las barquetas se colocaron unas rejillas, y sobre éstas se dispusieron 2 hamburguesas, para cuantificar el posible exudado generado durante el almacenamiento. En el envasado se utilizó la máquina selladora Euromatic Tray VG 800LCD (Alsero, Pianza, Italia), incorporando una mezcla de gases de 30% CO₂ - 20% O₂ - 50% N₂ (Carburos Metálicos S.A., Valencia, España). La selección de la atmósfera de envasado se basó principalmente en la composición del pescado empleado para la elaboración de las hamburguesas. En pescado se recomiendan concentraciones de CO₂ superiores al 25%, nitrógeno como gas de relleno y cierta proporción de O₂, variable en función de su contenido en lípidos. Debido a que las piezas de atún, empleadas como materia prima, presentaban un contenido graso muy bajo, se consideró adecuada la utilización de un contenido en O₂ del 20%. La incorporación de N₂ en el espacio de cabeza impide las deformaciones y el colapso del envase causados por la disolución del CO₂ en los tejidos del alimento. Las atmósferas ricas en CO₂ evitan el crecimiento microbiano; sin embargo, cantidades elevadas de este gas desencadenan cambios indeseables en el producto envasado como colapso del envase, exudado y modificaciones de la textura.

Las muestras fueron almacenadas en refrigeración (4 °C) durante un periodo de 17 días, llevándose a cabo las determinaciones físico-químicas y microbiológicas a los 0, 3, 7, 10, 14 y 17 días de almacenamiento.

2.2. Determinaciones analíticas

En primer lugar, se realizó una caracterización físico-química inicial del atún empleado como materia prima, así como de las hamburguesas inmediatamente después de su elaboración (día 0 de almacenamiento). Para ello se determinó su composición centesimal (humedad, proteína, grasa y cenizas), así como el contenido en sal, pH, nitrógeno básico volátil total (N-BVT), nitrógeno de trimetilamina (N-TMA) e índice de TBA. Se realizaron también recuentos microbiológicos del atún y de la mezcla de algas por separado, con el objetivo de conocer la calidad higiénico-sanitaria de los dos ingredientes empleados en la formulación.

Durante el estudio de almacenamiento, cada día de muestreo se seleccionaron 3 bolsas del lote envasado a vacío (V) y 3 barquetas del lote envasado en atmósfera modificada (M). A estas muestras se les realizaron análisis físico-químicos (humedad, pH, N-BVT, N-TMA y TBA) y microbiológicos. Asimismo, se midió la atmósfera de envasado en las muestras M. Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado.

2.2.1. COMPOSICIÓN CENTESIMAL

La determinación de humedad se realizó según el método de la AOAC 950.46 (1997) mediante secado en estufa a 103 ± 2 °C. La determinación de grasa se realizó por extracción con éter de petróleo según el método 991.36 de la AOAC (1997) empleando un sistema de extracción Soxtec Avanti 2055 (Foss Analytical A.B., Höganäs, Suecia). La determinación de proteínas se realizó según el método Kjeldahl, tal y como se describe en el método 928.08 de la AOAC (1997). La determinación del contenido de cenizas del pescado se realizó según el método 920.153 de AOAC (1997).

2.2.2. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Se analizó la composición del espacio de cabeza de los envases empleando un analizador de O₂ y CO₂ (Checkmate 9900, PBI Dansensor, Dinamarca). La toma de muestra se realizó en las barquetas previamente aatemperadas a temperatura ambiente (20 °C), por medio de una aguja conectada al equipo, perforando directamente el film de envasado.

El contenido en cloruro sódico se determinó según el procedimiento descrito por Fuentes et al. (2010) empleando un analizador automático de cloruros Sherwood mod. 926 (Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, Reino Unido).

El pH de las muestras se midió directamente sobre éstas empleando un pH-metro Crison microPH 2001 (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España) con electrodo de punción acoplado. De cada una de las muestras se tomaron 5 lecturas en puntos diferentes de la misma y a partir de las lecturas se calculó el valor de pH promedio. El contenido en nitrógeno básico volátil total (N-BVT) y en nitrógeno de trimetilamina (N-TMA) se determinaron mediante destilación por arrastre de vapor y valoración con ácido sulfúrico, según el método descrito por Malle & Tao (1987).

Con el objeto de evaluar la oxidación lipídica se realizó la determinación del índice de TBA, según el procedimiento descrito por Vyncke (1970). Este análisis se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con los compuestos secundarios procedentes de la oxidación de la grasa (aldehídos y cetonas) y la posterior medida de la absorbancia del cromógeno formado.

Para el estudio de las propiedades mecánicas de la hamburguesa de pescado con algas, se realizó un ensayo de doble compresión o TPA (Texture Profile Analysis), empleando una prensa universal TA-XT2[®] (Stable Micro Systems, Surrey, UK) con una célula de carga de 250 N. Con el objeto de que las muestras fueran lo más homogéneas posible durante todo el estudio, se tomaron cuatro porciones de dimensiones 2 x 2 cm partiendo del centro de cada hamburguesa. En este ensayo se utilizó un émbolo (P/75, ANEME) plano circular de 7,5 cm de diámetro, que comprimió dos veces consecutivas la muestra hasta un 50% de su altura, a una velocidad de 0,8 mm/s, para simular el movimiento de la mandíbula durante la masticación. El análisis de las curvas fuerza-desplazamiento dadas por este equipo, permitió obtener los parámetros texturales de dureza, elasticidad, cohesividad, adhesividad, masticabilidad y gomosidad.

La determinación del color se realizó directamente sobre la superficie de las hamburguesas. Para esta determinación se empleó un fotocolorímetro Minolta Chroma Meter CM-3600d (Minolta, Osaka, Japan), observador 10^o e iluminante D65. En el momento de la medición, la muestra fue cubierta con un vidrio óptico de baja reflectancia CR-A5/1829-752M para evitar el deterioro de la esfera integradora. A partir de las coordenadas colorimétricas del sistema CIEL*a*b* (1976), L* (luminosidad), a* (desviación hacia el rojo y el verde) y b* (desviación hacia el amarillo y el azul), se calcularon las

magnitudes psicofísicas de tono (h^*_{ab}) y croma (C^*_{ab}). A su vez, se calcularon los valores correspondientes a las diferencias de color global (ΔE), producidas a lo largo del periodo de almacenamiento.

2.2.3. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

Para llevar a cabo los análisis microbiológicos, se tomaron muestras del producto, a partir de las cuales se prepararon diluciones decimales, tal y como se describe en la Norma UNE EN-ISO 6887-3 (AENOR, 2004). El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se realizó según la Norma UNE-EN ISO 4833 (AENOR, 2003), mediante siembra en profundidad en Agar Plate Count (PCA) después de 72 h de incubación a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. El recuento de enterobacterias se llevó a cabo mediante siembra en doble capa en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Scharlau), y las placas fueron incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (Pascual & Calderón, 2000).

2.3. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Statgraphics Plus v.5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA). Con el objetivo de comprobar el efecto del tipo de envasado y del tiempo almacenamiento sobre cada uno de los parámetros evaluados, se llevó a cabo un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA multifactorial). El procedimiento LSD (least significant difference) se utilizó para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de la materia prima y de las hamburguesas de pescado y algas.

Los valores obtenidos en la caracterización del pescado empleado como materia prima, así como de las hamburguesas de pescado y algas recién elaboradas se muestran en la tabla 1. La composición de las piezas de lomo de atún son similares a muestras de atún fresco y congelado analizado en otros estudios (Ben-gigirey et al., 1999), e indican que se trata de un pescado con alto contenido proteico y bajo en lípidos. Las hamburguesas presentaron un valor nutricional similar al del pescado empleado como materia prima (Tabla 1), tal y como cabría esperar debido a que las hamburguesas elaboradas en el presente trabajo contenían

aproximadamente un 95% de pescado. El lomo de atún presentó un contenido lipídico muy bajo (0,54%), por lo que las hamburguesas de atún y algas se caracterizaron por un contenido en grasa muy bajo, inferior al 1%. La incorporación de algas en la formulación provocó una ligera reducción del contenido en humedad y proteínas, así como un aumento del contenido en cenizas y sal del producto.

Si se comparan estos valores con la composición de las hamburguesas de pescado que se encuentran actualmente en el mercado, podría asegurarse que las hamburguesas elaboradas en este trabajo poseen un valor nutricional mayor, ya que presentan un contenido proteico mayor y contenido en grasas y NaCl más bajo que las hamburguesas comerciales (Penalba, 2014). En este sentido, hay que señalar que la mayoría de las hamburguesas de pescado que se comercializan actualmente contienen alrededor de un 50-60% de pescado e incorporan en sus formulaciones aceites y/o grasas, así como otros aditivos, principalmente gomas, albúminas o almidón, para dar al producto la consistencia adecuada. Estos ingredientes provocan que las hamburguesas de pescado comerciales tengan un contenido en grasas e hidratos de carbono significativamente superior al del pescado empleado como materia prima.

Tabla 1. Composición centesimal del atún empleado como materia prima y de las hamburguesas de atún-algas.

	Atún	Hamburguesas
Información nutricional		
<i>Humedad (g/100 g)</i>	75,72 ± 0,49	73,91 ± 0,33
<i>Proteínas (g/100 g)</i>	22,59 ± 0,23	19,59 ± 0,17
<i>Grasas (g/100 g)</i>	0,54 ± 0,01	0,72 ± 0,08
<i>Cenizas (g/100 g)</i>	1,64 ± 0,02	2,21 ± 0,08
<i>Sal (g NaCl/100 g)</i>	0,65 ± 0,03	1,15 ± 0,05
Caracterización físico-químicas		
<i>Ph</i>	5,98 ± 0,03	6,00 ± 0,01
<i>N-BVT (mg N/100 g)</i>	10,76 ± 3,76	12,54 ± 4,89
<i>N-TMA (mg N/100 g)</i>	7,83 ± 0,48	6,39 ± 0,60
<i>TBA (mg malonaldehído/Kg)</i>	0,05 ± 0,07	0,07 ± 0,01

Respecto a los parámetros físico-químicos analizados, no se encontraron diferencias significativas entre el atún empleado como materia prima y las hamburguesas el día de su elaboración. Los valores obtenidos son similares a los obtenidos por otros autores para este pescado (Ben-girirey et al., 1999).

En el caso del pH de la materia prima, los valores son similares a los obtenidos en otros estudios, donde se establecen valores que oscilan desde 5,5 a 6,1 para el atún (López-Gálvez et al., 1995; Muela et al., 2014; Ruiz-Capillas & Moral, 2005).

Respecto al N-BVT, este parámetro expresa cuantitativamente el contenido de bases volátiles de baja masa molecular y aminas procedentes de la descarboxilación microbiana de los aminoácidos, siendo considerado representativo del grado de alteración del pescado y de los productos pesqueros. La CEE establece límites legales de N-BVT para algunas especies de pescado con valores que oscilan desde 25 a 35 mg N/100 g (CEE, 2005). La trimetilamina se produce por descomposición del óxido de trimetilamina (OTMA) debido a la actividad enzimática y microbiana. En pescado fresco, la concentración de N-TMA es muy baja, y este valor va aumentando progresivamente en los estadios avanzados de deterioro. En el caso del pescado congelado se consideran como valores límites aceptables los comprendidos entre 10-15 mg N-TMA/100 g de pescado (Šimat et al., 2009). Los valores de N-BVT y N-TMA obtenidos en el presente estudio para el pescado empleado como materia prima están por debajo de los límites de aceptación citados anteriormente (Tabla 1), lo que demuestra que el atún era apto para su uso o consumo.

La oxidación lipídica es un aspecto importante a tener en cuenta durante el almacenamiento del pescado. El índice de TBA proporciona una medida del grado de oxidación de grasas. Cabe destacar que el atún presenta en general un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados; sin embargo, el contenido lipídico en los lomos de atún es especialmente bajo, lo que podría explicar los valores tan bajos obtenidos para el TBA, tanto en la materia prima como en las hamburguesas recién elaboradas. Estos valores coinciden con los obtenidos por Muela et al. (2014) para atún fresco.

Los recuentos microbiológicos de los ingredientes empleados en la elaboración de las hamburguesas (atún y mezcla de algas), así como de las hamburguesas recién preparadas se muestran en la Tabla 2. Cabe destacar que los valores obtenidos indican una calidad adecuada de las materias primas empleadas y de la hamburguesa obtenida. Para mesófilos la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986) establece un límite de 7 log UFC/g para especies marinas y de agua dulce. En el caso de las enterobacterias, se consideran como valores normales en pescado fresco, recuentos de 1-2 log UFC/g, asociándose recuentos mayores a que el pescado procede de aguas contaminadas, un retraso en la congelación del pescado después de la

captura o a una contaminación cruzada durante su procesado (Bahmani et al., 2011). Por otra parte, en algunos estudios se ha establecido para estos microorganismos un límite de 3 log UFC/g para pescado fresco; sin embargo, cabe destacar que en algunos trabajos llevados a cabo en atún fresco se han encontrado recuentos de enterobacterias superiores a 3-4 ciclos logarítmicos cuando el pescado aún era apto para su consumo (Kamalakanth et al., 2011; Muela et al., 2014).

Tabla 2. Recuentos microbiológicos (log UFC/g) del atún y de la mezcla de algas empleado como materia prima y de las hamburguesas de pescado y algas. Valores promedio \pm SD (n=3).

	Atún	Algas	Hamburguesa
Mesófilos	3,90 \pm 0,02	3,50 \pm 0,07	3,96 \pm 0,07
Enterobacterias	1,90 \pm 0,15	1,20 \pm 0,2	2,14 \pm 0,06

3.2. Cambios en los parámetros físico-químicos y microbiológicos durante el almacenamiento

La concentración de CO₂ y O₂ de los envases se determinó a lo largo de todo el periodo de almacenamiento (Figura 1). Los niveles de O₂ en el interior de los envases permanecieron estables durante todo el almacenamiento, con valores cercanos a la concentración en la mezcla de gases inyectada (20% O₂) durante el envasado. El hecho de que la concentración de O₂ permanezca estable ha sido observado en otros estudios (Ruiz-Capilla & Moral, 2001); sin embargo, estos mismos autores encontraron que no es posible mantener esta estabilidad cuando se emplean atmósferas con un alto contenido en O₂ (60%). El nivel de CO₂ fue ligeramente inferior a la concentración en la mezcla inicial. Este descenso se debe a que parte del CO₂ que se introduce en el envase es absorbido y disuelto en la fase líquida del producto (Lannelongue et al., 1982; Ruiz-Capilla & Moral, 2001). Durante el resto del periodo de almacenamiento, no se observaron diferencias significativas en la composición de la atmósfera de envasado (p>0.05).

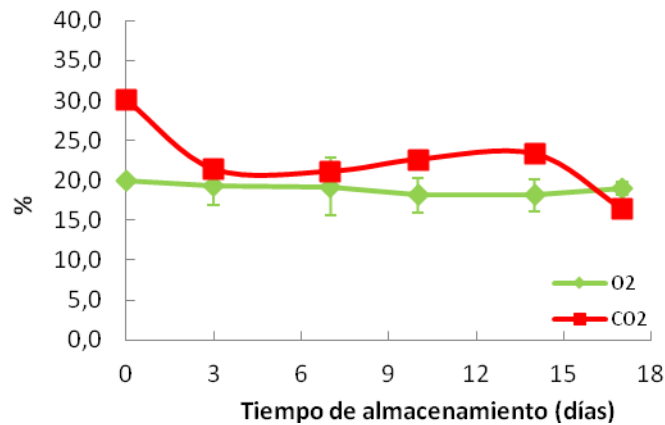


Figura 1. Concentración de CO₂ y O₂ en las hamburguesas envasadas en atmósfera modificada (M) durante el almacenamiento en refrigeración. Las barras de error representan los valores de desviación estándar, n=3.

En este caso no se observó la formación de exudado en ninguna de las muestras analizadas, lo que podría estar relacionado, tal y como se ha comentado anteriormente, con el efecto positivo que ejercen las algas sobre la capacidad de retención de agua en el producto.

Respecto a los valores de humedad, hay que señalar que únicamente se observó un ligero descenso al inicio del estudio; mientras que durante el resto del estudio no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en función del tiempo ni del tipo de envasado (Figura 2a). El pH de las hamburguesas disminuyó significativamente durante el almacenamiento ($p < 0,05$), no encontrándose diferencias significativas entre los diferentes tipos de envasado (Figura 2b). En algunos estudios se ha determinado que el descenso en los valores de pH podría estar relacionado con la proliferación de bacterias acidolácticas durante el almacenamiento. El crecimiento de estos microorganismos provoca la disminución del pH del producto, creando unas condiciones desfavorables para otros microorganismos como las *Enterobacteriaceae*. Las bacterias acidolácticas puede crecer en ambientes anaerobios y toleran la presencia de sal (López-López et al., 2009), por lo que su presencia es común en este tipo de productos.

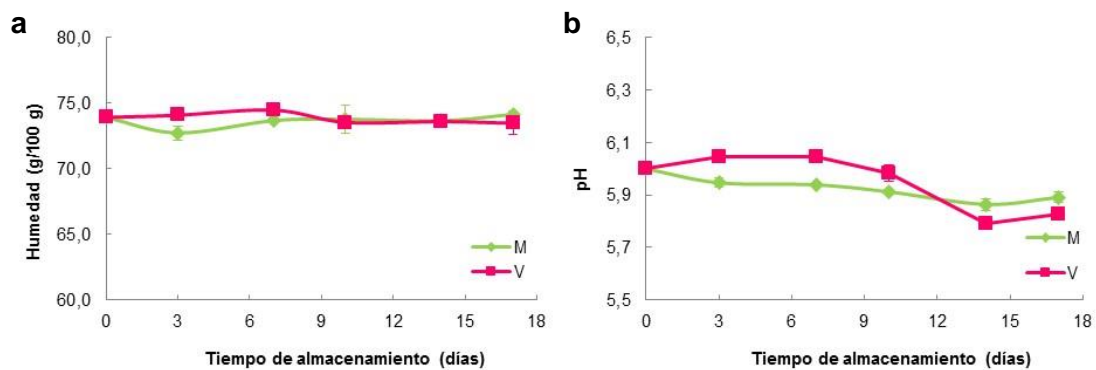


Figura 2. Valores de humedad (a) y pH (b) en las hamburguesas envasadas a vacío (V) y en atmósfera modificada (M) durante el almacenamiento en refrigeración. Las barras de error representan los valores de desviación estándar, n=3.

Respecto a la evolución del contenido en bases volátiles, se observó un aumento progresivo durante el periodo de almacenamiento en el contenido en N-BVT y N-TMA (Figura 3). En varios estudios se ha relacionado el incremento del N-BVT con el deterioro microbiano (Fernández-Segovia et al., 2007; Kykkidou et al., 2009). Sin embargo, hay una gran variabilidad en los límites de aceptabilidad de este parámetro en pescado fresco. Se han establecido límites de 25, 30 y 35 mg/100 g (Dalgaard, 2000). En este trabajo, el valor más alto fue el alcanzado por la muestra V al final del almacenamiento, siendo de 21,7 mg NBVT/100 g, por lo que en ningún momento se superaron los límites establecidos. Sin embargo, los recuentos de aerobios mesófilos que más adelante se comentan, mostraron que las muestras V eran microbiológicamente inaceptables sobre el día 10 de almacenamiento. Estos resultados indicarían que no hubo una buena correlación entre este parámetro y el deterioro microbiano, al igual que se ha visto en otros estudios de pescado (Méndez, 2011).

No se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de envasado para el N-BVT; sin embargo, la atmósfera de envasado a vacío afectó significativamente el contenido en N-TMA de las muestras, de forma que las hamburguesas envasadas a vacío presentaron valores mayores especialmente al final del periodo de almacenamiento. Durante el periodo de estudio no se excedieron los valores considerados como referencia, mencionados anteriormente.

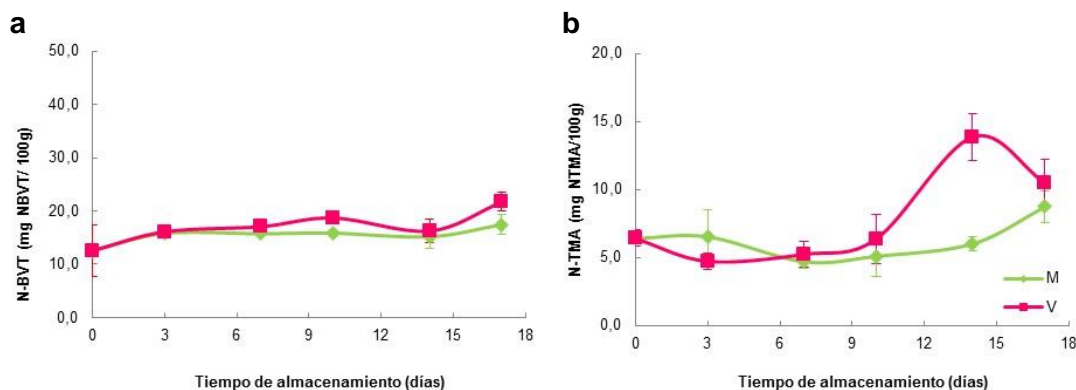


Figura 3. Contenido en N-BVT (a) y N-TMA (b) (mg N/100g muestra) en las hamburguesas envasadas a vacío (V) y en atmósfera modificada (M) durante el almacenamiento en refrigeración. Las barras de error representan los valores de desviación estándar, n=3.

Los valores de TBA fueron bajos durante todo el periodo de almacenamiento (Figura 4). Se observó un aumento progresivo de este parámetro a lo largo del estudio, siendo este incremento más acentuado en las muestras envasadas en atmósfera modificada, ya que, tal y como cabría esperar, la presencia de O₂ favoreció el enranciamiento de los lípidos del pescado. En este sentido, el análisis estadístico mostró que el factor “tipo de envasado” tuvo un mayor efecto (F-ratio=50,64) sobre este parámetro que el factor “tiempo” (F-ratio=0,006). Los bajos valores de este parámetro podrían estar condicionados por el bajo contenido lipídico en el pescado y en las algas utilizadas como materia prima. Además, estos niveles de oxidación podrían estar también correlacionados con el potencial antioxidante de las algas empleadas en la formulación. Los extractos de algas han sido utilizados en diferentes estudios por su conocido potencial antioxidante (Grupta & Abu-Ghannam, 2011). Los extractos de algunas algas, como las pertenecientes al género *Enteromorpha* (entre las que se encuentra entre otras la lechuga de mar), Espagueti de mar (*Himantalia elongata*), Wakame (*Undaria pinnatifida*) y Nori (*Prophyra umbilicalis*) se han incorporado a salchichas tipo “Frankfurter” (López-López et al., 2009) con el objetivo de mejorar la estabilidad frente a la oxidación de las muestras. El uso de estos extractos también se han estudiado en carne fresca, patés y otros derivados cárnicos, donde han mostrado un efecto positivo frente a la oxidación lipídica (Moroney et al., 2012; Monorey et al., 2013; Lorenzo et al., 2014). Sin embargo, en el presente estudio no se pueden atribuir los niveles bajos de enranciamiento al efecto de las algas, ya que no se pueden comparar los resultados obtenidos con muestras control “sin algas”. En este sentido, para

comprobar el efecto protector de las algas frente a la oxidación lipídica del pescado sería interesante plantear nuevas experiencias.

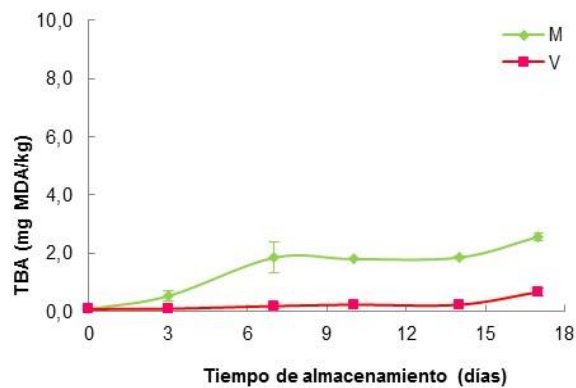


Figura 4. Contenido en TBA (mg MDA/kg muestra) en las hamburguesas envasadas a vacío (V) y en atmósfera modificada (M) durante el almacenamiento en refrigeración. Las barras de error representan los valores de desviación estándar, n=3.

La evolución de los parámetros texturales de las hamburguesas durante el periodo de estudio se muestran en la figura 5. Durante el almacenamiento en refrigeración se observó un importante aumento en la dureza, gomosidad y masticabilidad independientemente del tipo de envasado utilizado (Figura 5). Las muestras envasadas a vacío presentaron valores significativamente mayores de estos tres parámetros que las muestras envasadas en atmósfera modificada. Respecto al valor de adhesividad, hay que señalar que este parámetro se redujo únicamente al inicio del estudio (entre las muestras antes de su envasado y el primer día de análisis), no observándose diferencias durante el resto de almacenamiento ni entre tipos de envasado. El efecto del uso de algas en la textura de otros derivados cárnicos ha sido observado por otros autores (López-López et al., 2009). Algunas investigaciones asocian el endurecimiento de este tipo de producto a la pérdida de humedad y formación de exudado de los productos durante el almacenamiento (Andrés et al., 2006; Candogan & Kolsarici, 2003); sin embargo, esta relación no puede establecerse en el presente estudio, ya que en ninguno de los tipos de envasado se observó la formación de exudado ni variaciones en el contenido de humedad de las muestras.

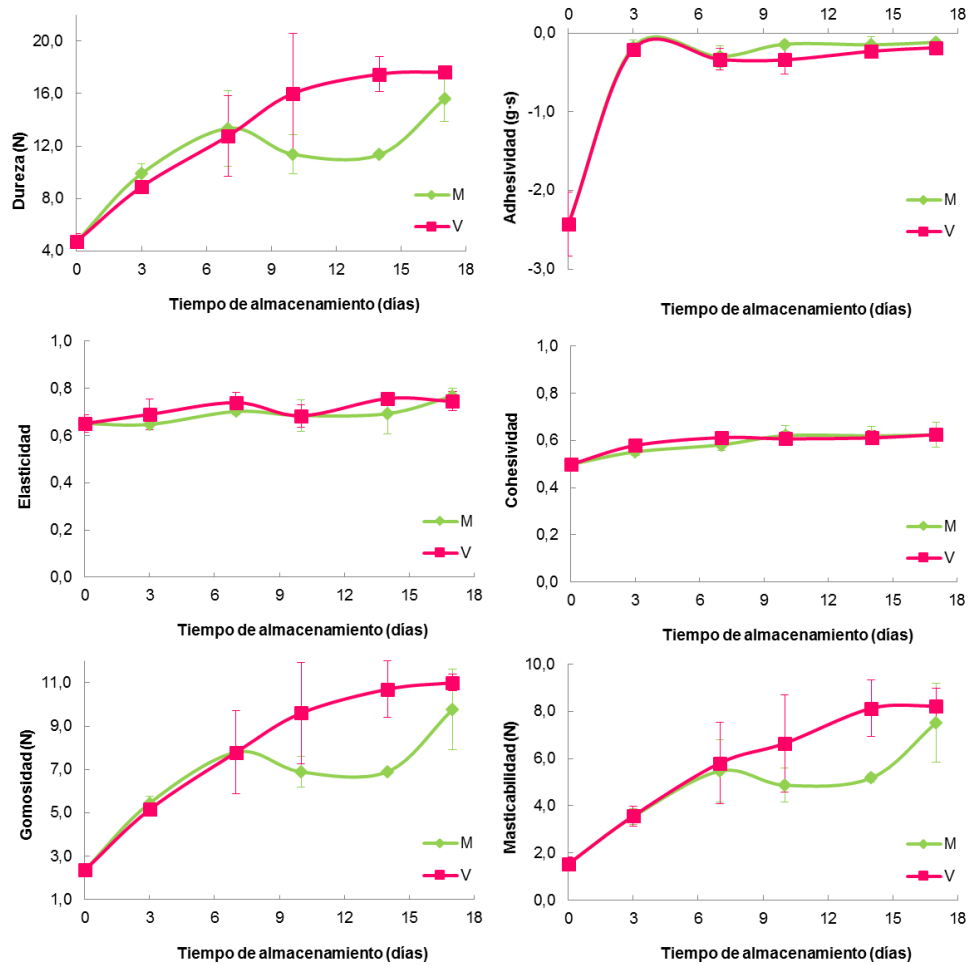


Figura 5. Parámetros mecánicos de dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad en las hamburguesas envasadas a vacío (V) y en atmósfera modificada (M) durante el almacenamiento en refrigeración. Las barras de error representan los valores de desviación estándar, n=3.

La evolución de los parámetros de color de las hamburguesas durante el almacenamiento se muestra en la figura 6. En general, se observaron diferencias en las coordenadas de color entre las hamburguesas antes de su envasado y el primer día de análisis, permaneciendo prácticamente constante durante el resto del almacenamiento. Los cambios más importantes se observaron en la evolución del parámetro a^* , que aumentó considerablemente durante el almacenamiento, independientemente del sistema de envasado. Los valores negativos del parámetro a^* denotan colores verdes, por lo que este incremento indicaría el pardeamiento del producto. Es interesante destacar que determinados productos de la pesca experimentan variaciones de color y sabor cuando se exponen a altas concentraciones de CO_2 ya que este gas interfiere en ciertos pigmentos

provocando la decoloración del alimento (Caselles, 1998), por lo que la decoloración del producto podría estar correlacionado con la presencia de este gas en la atmósfera de envasado. Por otro lado, es interesante destacar que el O_2 es habitualmente utilizado en el envasado del atún ya que mantiene el color rojizo del músculo del pescado y retrasa su pardeamiento (Caselles, 1998). En este caso, el color rojo característico del atún se vio modificado por el color verde intenso de algunas de las algas empleadas en la formulación, dando lugar a un producto verde apagado, tal y como indican los valores obtenidos para las coordenadas CIELab (a^* , b^* , C^* y h^*). Sin embargo, el uso de O_2 en la atmósfera de envasado podría ser en nuestro estudio el responsable también de la oxidación de los pigmentos presentes en las algas (clorofilas, fucoxantina,...) (Gómez, 2013).

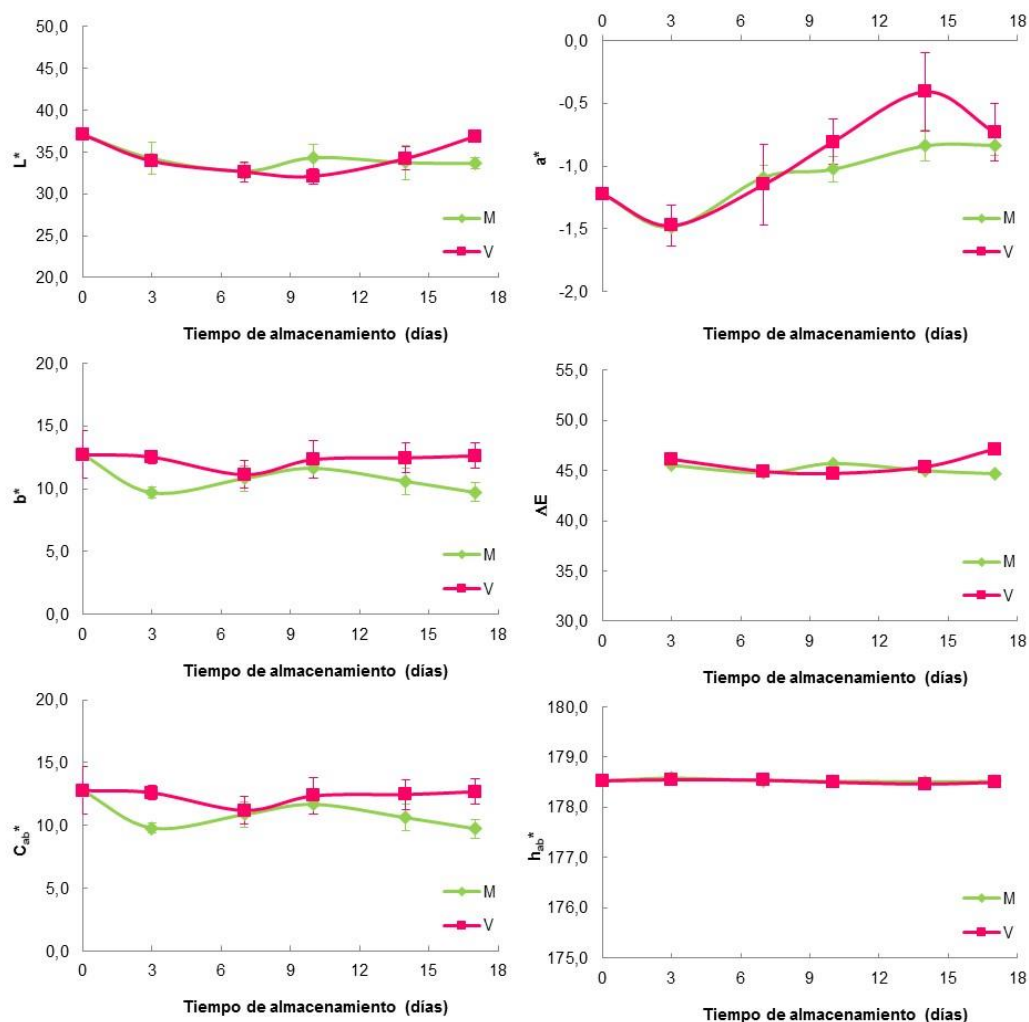


Figura 6. Coordenadas CIELab (luminosidad (L^*), a^* , b^* , diferencia de color (ΔE), tono (h_{ab}^*) y croma (C_{ab}^*)) en las hamburguesas envasadas a vacío (V) y en atmósfera modificada (M) durante el almacenamiento en refrigeración. Las barras de error representan los valores de desviación estándar, $n=3$.

La evolución de los recuentos microbianos (aerobios mesófilos y enterobacterias) en las hamburguesas de pescado durante su almacenamiento se muestra en la figura 7, donde se puede observar que ambos tipos de microorganismos siguieron una tendencia similar. Se observa un aumento progresivo de los recuentos microbianos en ambos sistemas de envasado, aunque los recuentos fueron ligeramente inferiores en las muestras envasadas en atmósfera modificada durante todo el periodo de estudio. El mayor efecto inhibitor del crecimiento microbiano presentado por el envasado en atmósfera modificada frente al vacío ha sido puesto de manifiesto en numerosos estudios de conservación de pescado (Fernández-Segovia et al., 2007; Pantazi et al., 2008). Específicamente el efecto del CO₂ sobre el crecimiento de enterobacterias ha sido observado en otros estudios, donde se ha evidenciado la efectividad del CO₂ para reducir los recuentos de aerobios gram negativos (Giménez et al., 2002; Macini & Hunt, 2005).

En relación a los microorganismos aerobios mesófilos, las muestras envasadas a vacío alcanzaron el límite de aceptación mencionado anteriormente (7 log UFC/g) el día 10 de almacenamiento. Las muestras envasadas en atmósfera modificada no superaron este valor hasta el día 14 de estudio.

Respecto al recuento de enterobacterias, las muestras V alcanzaron rápidamente (a los 3 días) niveles superiores a los 3 ciclos logarítmicos establecidos en algunos estudios como límite de aceptación para pescado, mientras que las muestras M lo alcanzaron a día 7 de almacenamiento. Sin embargo, tal y como se ha comentado anteriormente, el atún fresco empleado en algunos estudios presentaba recuentos de enterobacterias superiores a 3 e incluso a 4 ciclos logarítmicos, cuando era considerado apto para el consumo (Kamalakanth et al., 2011; Muela et al., 2014). Por tanto, en este trabajo se ha considerado únicamente el límite de mesófilos para establecer la vida útil del producto.

Teniendo en cuenta estos resultados, las hamburguesas de atún y algas envasadas a vacío tendrían una vida útil inferior a 10 días, mientras que en las envasadas en atmósfera modificada este periodo se extendería a 14 días. Hay que destacar que, tal y como han descrito otros autores, los procesos de congelación y descongelación hacen que el pescado sea más susceptible al crecimiento microbiológico y por tanto a su alteración (López-López et al., 1995; Muela et al., 2014). En este sentido, la opción de utilizar pescado fresco como materia prima podría ser una alternativa para prolongar la vida útil del producto.

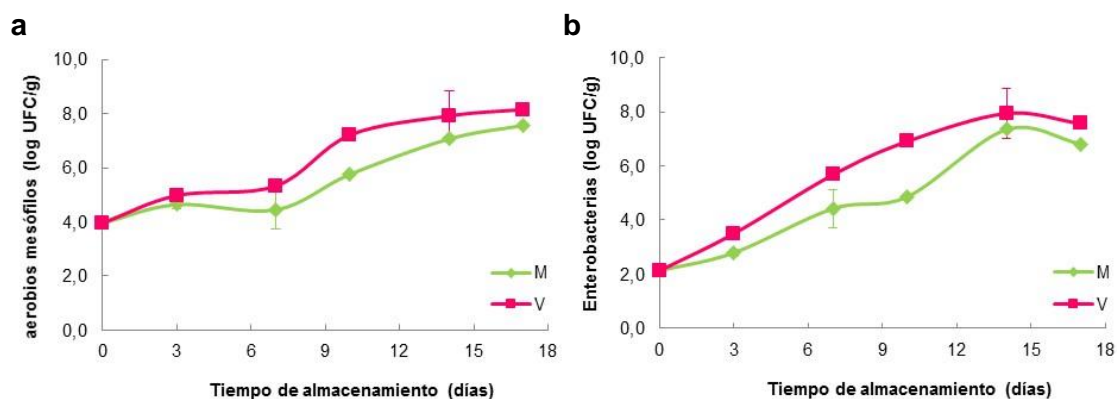


Figura 7. Recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos (a) y enterobacterias (b) en las hamburguesas envasadas a vacío (V) y en atmósfera modificada (M) durante el almacenamiento en refrigeración. Las barras de error representan los valores de desviación estándar, n=3.

4. CONCLUSIONES

Las hamburguesas de atún y algas se caracterizaron por un alto contenido proteico y bajo contenido en grasas. La oxidación de lípidos fue muy baja debido al reducido contenido en grasa de las hamburguesas y al posible efecto antioxidante de las algas. En este caso, el envasado en atmósfera modificada presentó una mayor oxidación en comparación con el vacío, debido a la presencia de O₂. En general, el envasado en atmósfera modificada proporcionó mayor estabilidad físico-química y microbiológica a las muestras durante el almacenamiento. Esto se evidenció por los menores niveles de N-BVT y N-TMA, la menor evolución de los parámetros texturales y de color, así como los menores recuentos microbianos en las hamburguesas envasadas en atmósfera modificada. Según los recuentos de aerobios mesófilos se estableció una vida útil inferior a 10 días para las hamburguesas envasadas a vacío y a 14 días para las envasadas en atmósfera modificada.

Teniendo en cuenta que algunas de las hamburguesas de pescado presentes en el mercado tienen un tiempo de comercialización de 10 días en refrigeración, la hamburguesa de atún y algas elaborada en este estudio, envasada en atmósfera modificada podría comercializarse con la misma fecha de caducidad.

5. REFERENCIAS

- AENOR (2003). Norma UNE EN-ISO 4833. Microbiología de alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C (ISO 4833:2003). Ed. AENOR, Madrid, España.
- AENOR (2004). Norma UNE EN-ISO 6887-3. Microbiología de alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para el examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca. Ed. AENOR, Madrid, España.
- Andrés, S. C.; García, M. E.; Zaritzky, N. E.; Califano, A. 2006. Storage stability of low-fat chicken sausages. *Journal of Food Engineering*, 72(4): 311–319.
- A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemists (1997). Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- Bahmania, Z.A.; Rezaia, M.; Hosseinib, S.V.; Regensteinc, J.M.; Böhmed, K.; Alishahie, A.; Yadollahif, F. 2011. Chilled storage of golden gray mullet (*Liza aurata*). *Food Science and Technology*, 44(9):1894–1900.
- Ben-gigirey, B.; Sousa, J. M.; Villa, T. G.; Barros-velazquez, J. 1999. Chemical changes and visual appearance of albacore tuna as related to frozen storage. *Journal of food Science*, 64(1), 20-24.
- Candogan, K.; Kolsarici, N. 2003. The effects of carrageenan and pectin on some quality characteristics of low-fat beef frankfurters. *Meat Science*, 64(2):199-206.
- Caselles, J.B. 1998. Envasado de productos del mar en atmósfera modificada. *Alimentos, equipos y tecnología*, 5:119-122.
- CEE (2005). Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs Official Journal of European Union, L338, pp. 1–26.
- Dalgaard, P. (2000). Freshness, quality and safety in seafoods. *Flair-Flow Europe Technical Manual*. F-FE 380A/00.
- Fernández-Segovia, I.; Escriche, I.; Fuentes, A.; Serra, J.A. 2007. Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined method. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1): 67-72.
- Fuentes A. 2007. Desarrollo de productos ahumados a partir de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Tesis doctoral. Universidad politécnica de Valencia. 377pp.
- Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.; Barat, J.M.; Serra, J.A. 2010. Influence of sodium replacement and packaging on quality and shelf life of smoked sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 43: 1426-1433.
- Giménez, B.; Roncalés, P.; Beltrán, J.A. 2002. Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 1154–1159.

- Gómez, E. 2013. Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios *in vitro* e *in vivo*. Tesis doctoral Universidad. Complutense de Madrid.
- Grupta, S.; Abu-Ghannam N. 2011. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12:600-609.
- Holdt, S. L.; Kraan, S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.
- Hur, S.J.; Jin, S.K.; Park, J.H.; Jung, S.W.; Lyu, H.J. 2013. Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on quality characteristics of low grade beef during cold storage. *Asian Australas Journal of Animal Sciences*, 26(12):1781-1789.
- ICMCF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986). International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Sampling plans for fish and shellfish Microorganisms in Foods 2, Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications (2nd edition), University of Toronto Press, Toronto, Canada (1986), pp. 181–196
- Kamalakanth, C.K.; Ginson, J.; Bindu, J.; Venkateswarlu, R.; Das, S.; Chauhan, O.P.; Gopal, T.K.S. 2011. Effect of high pressure on K-value, microbial and sensory characteristics of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) chunks in EVOH films during chill storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12:451–455.
- Kykkidou, S.; Giatrakou, V.; Papavergou, A.; Kontominas, M.G.; Savvaidis, I.N. 2009. Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, 115:169-175.
- Lannelongue, M.; Hanna, M.O.; Finne, G.; Nickelson, R.; Vanderzant, G. 1982. Microbiological and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO₂-enriched atmosphere. *Journal of Food Protection*, 45:1197-1203.
- López-Gálvez, D.; De la Hoz, L.; Ordoñez, J.A. 1995. Effect of Carbon Dioxide and Oxygen Enriched Atmospheres on Microbiological and Chemical Changes in Refrigerated Tuna (*Thunnus alalunga*) Steaks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2):483-490.
- López-López, I.; Cofrades, S.; Jiménez-Colmenero, F. 2009. Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science*, 83:148-154.
- Lorenzo, J.M.; Sineiro, J.; Amado, I.R.; Franco, D. 2014. Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat Science*, 96: 526–534.
- Macini, R.A.; Hunt, M. C. 2005. Current research in meat color. *Meat Science*, 71:100–121.
- Malle, P.; Tao, S.H. 1987. Rapid quantitative Determination of Trimethylamine using Steam Distillation. *Journal of Food Protection*, 50(9):756-760.
- Méndez, E.L. 2011. Aplicación de la espectroscopía de impedancia en la evaluación de la calidad de dorada. Tesis de máster. Universidad Politécnica de Valencia.

- Moroney, N. C.; O'Grady, M. N.; O'Doherty, J. V.; Kerry, J. P. 2012. Addition of seaweed (*Laminaria digitata*) extracts containing laminarin and fucoidan to porcine diets: Influence on the quality and shelf-life of fresh pork. *Meat Science*, 92:423–429
- Moroney, N.C. ; O'Grady, M.N.; O'Doherty, J.V. ; Kerry, J.P. 2013. Effect of a brown seaweed (*Laminaria digitata*) extract containing laminarin and fucoidan on the quality and shelf-life of fresh and cooked minced pork patties. *Meat Science*, 94:304–311
- Muela, E.; Alonso, V.; Morago, P.; Calanche, J.B.; Roncalés, P.; Beltrán, J.A. 2014. Effect of gas packaging conditions on thawed *Thunnus obesus* preservation. *Food Control*, 46:217–224.
- Murata, M.; Nakazoe, J.I.; 2001. Production and use of marine algae in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 35(4):281-290.
- Ospina, S.M.; Cartagena, J.R. 2008. La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. *Lasallista de investigación*, 5(2):112-123.
- Özogul, F.; Polat, A.; Özogul, Y. 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food chemistry*, 85:49-57.
- Penalba, V. (2014). Estudio de nuevas formulaciones para la obtención de productos de la pesca empleando algas. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pantazi, D.; Papavergou, A.; Pournis, N.; Kontominas, M.G.; Savvaidis, I.N. 2008. Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes. *Food Microbiology*, 25:136–143.
- Pascual, M.R.; Calderón V. 2000. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos, Madrid, España.
- Ruiz-Capillas, C.; Moral, A. 2001. Chilled bulk storage hake (*Merluccius merluccius* L.) in CO₂ and O₂ enriched controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 212: 413-420.
- Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. 2001. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *European Food Research and Technology*, 212(3):349-354.
- Šimat, V.; Maršić-Lučić, J.; Tudor, M.; Mladineo, I. 2009. Long-term storage influence on volatile amines (TVB-N and TMA-N) in sardines and herring utilized as food for tuna fattening. *Journal of Applied Ichthyology*, 25(6): 766-770.
- Vyncke, W. 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extract of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 72:1084-1087.