

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA EL
DISEÑO Y DESARROLLO DE PRODUCTOS DE
DORADA (*Sparus aurata*) PROCEDENTE DE
ACUICULTURA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

María Desamparados Andrés Bello

Dirigida por:

Dr. Javier Martínez Monzó

Dra. Purificación García Segovia

Valencia 2012



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**

D. JAVIER MARTÍNEZ MONZÓ, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD Y D^a. PURIFICACIÓN GARCÍA SEGOVIA, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD, AMBOS DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

CONSIDERAN: Que la memoria titulada **APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA EL DISEÑO Y DESARROLLO DE PRODUCTOS DE DORADA (Sparus aurata) PROCEDENTES DE ACUICULTURA** que presenta D^a. M^a DESAMPARADOS ANDRÉS BELLO para aspirar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, y que ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia, reúne las condiciones adecuadas para constituir su tesis doctoral, por lo que **AUTORIZAN** al interesado para su presentación.

Valencia, Febrero de 2012

Fdo.: Javier Martínez Monzó
Director de Tesis

Fdo.: Purificación García Segovia
Directora de Tesis

A TODOS VOSOTROS, que
formáis parte de "mi pequeño mundo"
sencillamente.....
GRACIAS por quererme tanto...

*He aquí mi secreto, que no
puede ser más simple: sólo con el corazón
se puede ver bien; lo esencial es invisible
para los ojos.....*

*¡Ninguna persona mayor
comprenderá jamás que esto sea
verdaderamente importante!*

*El Principito
Antoine de Saint-Exupéry*

RESUMEN

La acuicultura en su conjunto produce hoy en día más de la mitad del pescado consumido en el mundo. El objetivo de la presente tesis doctoral es estudiar la aplicación de diferentes tecnologías para incrementar y diversificar productos procedentes de acuicultura. Concretamente se han analizado las tecnologías de cocción y fritura a vacío, biopreservación y elaboración de texturizados a partir de dorada (*Sparus aurata*). Para ello en tres capítulos se aborda el estudio de estas tecnologías para el desarrollo de productos alternativos elaborados a base de dorada que permitan la diversificación del sector. El primer capítulo se centra en el estudio del proceso de fritura y cocción a vacío de filetes de dorada para evaluar aspectos relacionados con su calidad como ganancia de aceite, pérdida de agua, cambios de color, etc. con vistas a definir los tiempos óptimos de procesado del producto. En el segundo capítulo se estudia el desarrollo de texturizados, para ello se pretende analizar el efecto de diferentes formulaciones con o sin la adición de fibras sobre las características, fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas de los productos obtenidos con o sin cocción de los mismos. Por último, en el tercer capítulo se analiza la aplicación de técnicas de biopreservación con las que se pretende determinar las condiciones de preparación de los agentes biopreservantes, su forma de aplicación y el efecto sobre la vida útil de los filetes de dorada. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento de fritura a vacío a 110 °C y 25 kPa con un tiempo comprendido entre tres y cinco minutos aporta un menor contenido graso con unas pérdidas de humedad, peso y encogimiento razonables, por lo que éstas podrían ser unas condiciones adecuadas para la aplicación de dicho tratamiento. Los

tratamientos estudiados de cocción a vacío mostraron que no afectan al contenido total en proteínas y grasas del pescado, pero sí que pueden resultar interesantes para la conservación de los ácidos grasos monoinsaturados ya que además mantienen valores más elevados de humedad y presentan un menor encogimiento. La cocción a vacío a 70 °C con tiempos superiores a seis minutos podría ser apropiada para conseguir productos más jugosos y con un adecuado perfil lipídico. En lo que hace referencia al desarrollo de texturizados se ha estudiado y analizado el papel de la transglutaminasa microbiana (MTGasa) y los niveles de sal (NaCl) en las características de un producto reestructurado a base de dorada (*Sparus aurata*) y se ha analizado el efecto de la adición de diferentes hidrocoloides (konjac glucomanano (KGM), carboximetilcelulosa sódica (CMC) y goma xantana) sobre la matriz proteica del gel de pescado. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que es posible el desarrollo de un reestructurado precocinado fuente de fibra a base de dorada con unas adecuadas características sensoriales, físico-químicas y microbiológicas. En cuanto a la utilización de bioprotectores, se utilizó *Lactococcus lactis* y nisina, incorporados mediante la técnica de impregnación a vacío con el fin de prolongar la vida útil de filetes de dorada envasados y almacenados en refrigeración. La impregnación a vacío de los filetes con nisina y *L. lactis* se mostró como una posible técnica de bioconservación para prolongar la vida útil de filetes de dorada almacenados en refrigeración.

RESUM

L'aqüicultura en el seu conjunt produeix avui dia més de la meitat del peix consumit en el món. L'objectiu de la present tesi doctoral és estudiar l'aplicació de diferents tecnologies per a incrementar i diversificar productes procedents d'aqüicultura. Concretament s'han analitzat les tecnologies de cocció i fritura a buit, biopreservació i elaboració de texturitzats a partir d'orada (*Sparus aurata*). Per aconseguir-ho en tres capítols s'aborda l'estudi d'aquestes tecnologies per al desenvolupament de productes alternatius elaborats amb daurada que permeten la diversificació del sector. El primer capítol es centra en l'estudi del procés de fritura i cocció a buit de filets de daurada per a avaluar aspectes relacionats amb la seua qualitat com a guany d'oli, pèrdua d'aigua, canvis de color, etc. amb l'objecte de definir els temps òptims de processament del producte. Al segon capítol s'estudia el desenvolupament de texturitzats. Per tal fi es pretén analitzar l'efecte de diferents formulacions amb o sense l'addició de fibres sobre les característiques, fisicoquímiques, sensorials i microbiològiques dels productes obtinguts amb o sense cocció. Finalment, al tercer capítol s'analitza l'aplicació de tècniques de biopreservació amb les quals es pretén determinar les condicions de preparació dels agents biopreservants, la seua forma d'aplicació i l'efecte sobre la vida útil dels filets de daurada. Els resultats obtinguts mostren que el tractament de fritura a buit a 110 °C i 25 kPa amb un temps comprès entre tres i cinc minuts aporta un menor contingut d'oli amb unes pèrdues d'humitat, pes i encongiment raonables, per la qual cosa aquestes podrien ser unes condicions adequades per a l'aplicació d'aquest tractament. Els tractaments estudiats de cocció a buit van mostrar que no afecten al contingut total en proteïnes i greixos del peix, però sí que poden

resultar interessants per a la conservació dels àcids grassos monoinsaturats ja que a més mantenen valors més elevats d'humitat i presenten un menor encongiment. La cocció a buit a 70 °C amb temps superiors a sis minuts podria ser apropiada per a aconseguir productes més sucosos i amb un adequat perfil lipídic. Pel que fa referència al desenvolupament de texturitzats s'ha estudiat i analitzat el paper de la transglutaminasa microbiana (MTGasa) i els nivells de sal (NaCl) en les característiques d'un producte reestructurat amb daurada (*Sparus aurata*) i s'ha analitzat l'efecte de l'addició de diferents hidrocol.loids (konjac glucomanà (KGM), carboximetilcel·lulosa sòdica (CMC) i goma xantana) sobre la matriu proteïca del gel de peix. Els resultats obtinguts posen de manifest que és possible el desenvolupament d'un reestructurat precuinat font de fibra amb daurada amb unes adequades característiques sensorials, físico-químiques i microbiològiques. Quant a la utilització de bioprotectors, es va utilitzar *Lactococcus lactis* i nisina, incorporats mitjançant la tècnica d'impregnació a buit amb la finalitat de perllongar la vida útil dels filets de daurada envasats i emmagatzemats en refrigeració. La impregnació a buit dels filets amb nisina i *L. lactis* es va mostrar com una possible tècnica de bioconservació per a perllongar la vida útil de filets de daurada emmagatzemats en refrigeració.

ABSTRACT

Aquaculture produces today more than half of the fish consumed in the world. The objective of the present doctoral thesis is to study the application of different technologies to increase and to diversify products coming from aquaculture. Specifically, technologies of vacuum frying and cooking, restructured products and biopreservation have been analyzed from sea bream (*Sparus aurata*). Three chapters approach the study of these technologies to obtain alternative products from sea bream that allows the diversification of this sector. The first chapter is focused in the study of the process of vacuum frying and cooking of sea bream fillets to evaluate aspects related to its quality like oil uptake, water loss, colour changes, etc. with a goal to establish the optimal times of product processing. In the second chapter the development of restructured products is studied. The effect of different formulations (with or without fiber addition) on the, physico-chemical, sensorial and microbiological characteristics of products obtained (with or without cooking) is analyzed. Finally, in the third chapter the application of biopreservation techniques is analyzed to determine the conditions of biopreservant agent preparation, the process of application and the effect on sea bream fillets shelf life. The obtained results show that the treatment of vacuum frying at 110 °C and 25 kPa with a time between three and five minutes contributes to reduce the oil content with appropriate losses of moisture, weight and shrinkage. These conditions could be adequate for the application of this treatment. The vacuum cooking treatments studied showed that they do not affect the total fish content of proteins and fats, but this technique can be interesting for the preservation of monounsaturated fatty acids since they maintain higher values of moisture and present a smaller

shrinkage. The vacuum cooking at 70 °C with cooking times higher than six minutes, could be appropriate to obtain juicy products and with a suitable lipidic profile. Related to the development of restructured products, the function of microbial transglutaminase (MTGasa) has been studied and analyzed and salt level (NaCl) in the characteristics of a product formulated with sea bream (*Sparus aurata*). The effect of the addition of different hydrocolloids: konjac glucomannan (KGM), sodium carboxymethylcellulose (CMC) and xanthan gum, on the fish protein matrix gel has been analyzed. The obtained result shows that it is possible to develop precooked restructured products as fiber source from sea bream with suitable sensorial, physico-chemical and microbiological characteristics. As far as the use of biopreservants, *Lactococcus lactis* and nisin were selected and incorporated by means vacuum impregnation technique, with the purpose to increase the shelf life of sea bream fillets packaged and stored in refrigeration. The vacuum impregnation of fillets with nisin and *L. lactis* showed to be a suitable technique of biopreservation to increase the sea bream fillet shelf life preserved under refrigeration conditions.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL
JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL ESTUDIO 3

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA DORADA.....	11
1.1. Características de la especie.....	11
1.2. Valor nutricional de la Dorada.....	13
I.2. EL CONSUMO DE DORADA EN ESPAÑA.....	14
I.3.TENDENCIAS DEL MERCADO DE PESCADO. NUEVOS PRODUCTOS. PRODUCTOS REESTRUCTURADOS.....	15
I.4. APLICACIÓN DE LA COCCIÓN/FRITURA A VACÍO.....	21
4.1. Cocción/fritura tradicional.....	22
4.2. La cocción/fritura en condiciones de vacío continuo (Cook-vide).....	23
I.5. NUEVAS HERRAMIENTAS PARA LA CONSERVACIÓN DE PESCADO. BIOCONSERVACIÓN.....	25
5.1. Aplicación de cultivos bioprotectores.....	25
5.2. Aplicación de bacteriocinas.....	26

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general.....	31
II.2. Objetivos específicos.....	31

III. ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE FRITURA Y COCCIÓN A VACÍO DE FILETES DE DORADA (*Sparus aurata*)

III.1. INTRODUCCIÓN.....	35
1.1. Cocción.....	35
1.1.1. Concepto de cocción.....	35

1.1.2. Tipos de cocciones.....	36
1.1.3. Efecto del cocinado sobre los tejidos animales.....	37
1.1.4. Efecto del cocinado sobre la microflora.....	41
1.2. Cocción a vacío.....	42
1.3. Fritura.....	43
1.3.1. Concepto de fritura.....	43
1.3.2. Tipos de fritura.....	44
1.3.3. Caracterización del proceso de fritura.....	46
1.3.3.1. Transferencia de calor y de materia.....	47
1.3.3.2. Variables del proceso de fritura.....	51
1.3.4. Cambios en la estructura y color de los productos fritos.....	53
1.3.4.1. Cambios en el tamaño y forma.....	53
1.3.4.2. Cambios en la textura.....	55
1.3.4.3. Cambios en el color.....	55
1.3.5. Características y degradación del aceite.....	58
1.3.5.1. Efecto del agua.....	58
1.3.5.2. Efecto del oxígeno.....	59
1.3.5.3. Efecto de la temperatura.....	61
1.3.5.4. Medida de la degradación del aceite.....	61
1.3.6. La fritura a vacío.....	62
1.3.6.1. Generalidades.....	62
1.3.6.2. El proceso de fritura a vacío.....	63
1.3.6.2.1. Transferencia de agua en la fritura a vacío.....	63
1.3.6.2.2. Transferencia de aceite en la fritura a vacío.....	65
1.3.6.2.3. Transferencia de calor.....	66
III.2. OBJETIVO.....	67

2.1. Objetivo general.....	67
2.2. Objetivos específicos.....	67
2.2.1. Estudio de la fritura en condiciones de vacío continuo.....	67
2.2.2. Estudio de la cocción en condiciones de vacío continuo.....	68
III.3. PLAN DE TRABAJO.....	68
III.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
4.1. Materia prima y preparación de la muestra.....	69
4.2. Aceite.....	70
4.3. Determinaciones analíticas.....	70
4.3.1. Variación de peso.....	70
4.3.2. Determinación de la evolución de la temperatura.....	71
4.3.3. Humedad.....	71
4.3.4. Contenido en grasa.....	72
4.3.5. Contenido proteico.....	73
4.3.6. Determinación de la calidad del aceite.....	74
4.3.7. Propiedades ópticas.....	74
4.3.8. Determinación del perfil lipídico.....	75
4.3.9. Grado de encogimiento.....	76
4.4. Equipos.....	76
4.4.1. Equipo de fritura/cocción a vacío.....	76
4.4.2. Equipo de fritura a presión atmosférica.....	78
4.5. Modelos empíricos.....	79
4.6. Análisis estadístico.....	80
III.5. RESULTADOS.....	81
5.1. Fritura.....	81
5.1.1. Caracterización y estudio cinético de los parámetros físico-químicos en el proceso de fritura.	83

5.1.1.1. Perfil de temperaturas durante el proceso de fritura.....	84
5.1.1.2. Variación de peso.....	86
5.1.1.3. Evolución de la pérdida de agua y ganancia de grasa de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) debido al tratamiento de fritura.....	89
5.1.1.3.1. Evolución de la pérdida de agua.....	89
5.1.1.3.2. Evolución de la ganancia de grasa.....	95
5.1.1.4. Cambios en la forma de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) debido al tratamiento de fritura.....	106
5.1.2. Análisis factorial de las muestras tratadas a vacío.....	110
5.1.3. Calidad del aceite de fritura.....	112
5.1.4. Evolución del color en los filetes.....	114
5.2. Cocción.....	118
5.2.1. Caracterización y estudio cinético de los parámetros físico-químicos en el proceso de cocción.....	118
5.2.1.1. Perfil de temperaturas durante el proceso de cocción.....	119
5.2.1.2. Variación de peso.....	120
5.2.1.3. Evolución de la pérdida de agua de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) debido al tratamiento de cocción.....	121
5.2.1.4. Evolución del contenido proteico y graso de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>)	

debido al tratamiento de cocción.....	124
5.2.1.5. Cambios en la forma de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) debido al tratamiento de cocción.....	130
5.2.1.6. Evolución del color en los filetes.....	132
III.6. CONCLUSIONES.....	135

IV. OBTENCIÓN DE PRODUCTOS REESTRUCTURADOS A BASE DE DORADA (*Sparus aurata*)

IV.1. INTRODUCCIÓN.....	143
IV.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	150
2.1. Objetivo general.....	150
2.2. Objetivos específicos.....	150
IV.3. PLAN DE TRABAJO.....	151
IV.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	155
4.1. Materia prima y preparación de la muestra.....	155
4.1.2. Otros ingredientes.....	156
4.2. Determinaciones analíticas.....	157
4.2.1. Humedad.....	157
4.2.2. Actividad de agua (a_w).....	157
4.2.3. pH.....	157
4.2.4. Capacidad de Retención de Agua (CRA).....	158
4.2.5. Propiedades ópticas.....	159
4.2.6. Ensayos mecánicos.....	159
4.3. Análisis sensorial.....	160
4.4. Análisis microbiológico.....	163
4.4.1. Preparación de la muestra.....	164
4.4.2. Aerobios mesófilos.....	165
4.4.3. Enterobacterias.....	165
4.4.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	165

4.4.5. <i>Salmonella shigella</i>	166
4.5. Almacenamiento en refrigeración.....	167
4.6. Análisis de microestructura. Cryo-SEM.....	167
4.7. Análisis estadístico.....	168
IV.5. RESULTADOS.....	169
5.1. Obtención de una formulación base mediante la adición de transglutaminasa microbiana (MTGasa) combinada con NaCl a diferentes niveles.....	169
5.1.1. Humedad, actividad de agua (a_w) y pH.....	171
5.1.2. Capacidad de Retención de Agua (CRA).....	175
5.1.3. Propiedades ópticas.....	178
5.1.4. Propiedades mecánicas.....	180
5.1.5. Análisis factorial de las muestras formuladas con NaCl y MTGasa.....	184
5.1.5.1. Análisis factorial de las muestras con NaCl y MTGasa sin tratamiento térmico.....	184
5.1.5.2. Análisis factorial de las muestras con NaCl y MTGasa con tratamiento térmico.....	186
5.1.6. Análisis sensorial.....	188
5.1.6.1. Análisis sensorial para la determinación del nivel de MTGasa.....	188
5.1.6.2. Análisis sensorial para la determinación del nivel de NaCl.....	193
5.1.7. Análisis estructural.....	198
5.2. Estudio de la evolución durante el almacenamiento con y sin tratamiento térmico de la formulación base seleccionada.....	201
5.2.1. Evolución durante el almacenamiento de la humedad, actividad de agua (a_w) y pH.....	201
5.2.2. Evolución durante el almacenamiento de la	

capacidad de retención de agua (CRA).....	203
5.2.3. Evolución durante el almacenamiento de las propiedades ópticas.....	204
5.2.4. Evolución durante el almacenamiento de las propiedades mecánicas.....	206
5.2.5. Estudio microbiológico.....	209
5.2.5.1. Evolución de la calidad microbiológica de la fórmula base (F103) sin tratamiento térmico durante el almacenamiento en refrigeración.....	209
5.2.5.2. Evolución de la calidad microbiológica de la fórmula base (F103) con tratamiento térmico durante el almacenamiento en refrigeración.....	211
5.3. Obtención de reestructurados de dorada (<i>Sparus aurata</i>) con adición de fibra (konjac glucomanano, carboximetilcelulosa y goma xantana).....	213
5.3.1. Adición de Konjac Glucomanano (KGM) y Carboximetilcelulosa (CMC).....	214
5.3.1.1. Humedad, actividad de agua (a_w) y pH.	215
5.3.1.2. Capacidad de Retención de Agua (CRA)	218
5.3.1.3. Propiedades ópticas.....	221
5.3.1.4. Propiedades mecánicas.....	222
5.3.1.5. Análisis factorial de las muestras formuladas con adición de fibra.....	227
5.3.1.5.1. Análisis factorial de las muestras con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa con KGM y CMC sin tratamiento térmico.....	227
5.3.1.5.2. Análisis factorial de las	

muestras con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa con KGM y CMC con tratamiento térmico.....	229
5.3.1.6. Análisis estructural.....	231
5.3.1.6.1. Análisis estructural de muestras sin tratamiento térmico.....	231
5.3.1.6.2. Análisis estructural de muestras con tratamiento térmico.....	233
5.3.2. Adición de Konjac glucomanano y goma Xantana.....	236
5.3.2.1. Humedad, actividad de agua (a_w) y pH.	238
5.3.2.2. Capacidad de Retención de Agua (CRA)	239
5.3.2.3. Propiedades ópticas.....	241
5.3.2.4. Propiedades mecánicas.....	242
5.3.2.5. Análisis factorial de las muestras con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa con KGM y KGM+goma xantana sin tratamiento térmico.....	244
5.3.2.6. Análisis sensorial.....	247
5.3.2.7. Análisis estructural.....	254
5.3.2.7.1. Análisis estructural de muestras sin tratamiento térmico.....	254
5.3.2.7.2. Análisis estructural de muestras con tratamiento térmico.....	258
5.4. Estudio de la evolución durante el almacenamiento con y sin tratamiento térmico de la formulación fuente de fibra.....	261
5.4.1. Evolución durante el almacenamiento de la humedad, actividad de agua (a_w) y pH.....	262
5.4.2. Evolución durante el almacenamiento de la capacidad de retención de agua (CRA).....	263

5.4.3. Evolución durante el almacenamiento de las propiedades ópticas.....	264
5.4.4. Evolución durante el almacenamiento de las propiedades mecánicas.....	267
5.4.5. Estudio microbiológico.....	269
5.4.5.1. Evolución de la calidad microbiológica de la fórmula fuente de fibra (F2) sin tratamiento térmico durante el almacenamiento en refrigeración.....	269
5.4.5.2. Evolución de la calidad microbiológica de la fórmula fuente de fibra (F2) con tratamiento térmico durante el almacenamiento en refrigeración.....	271
IV.6. CONCLUSIONES.....	273

V. APLICACIÓN DE BIOCONSERVANTES PARA PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DEL FILETE DE DORADA (*Sparus aurata*)

V.1. INTRODUCCIÓN.....	283
1.1. Microbiología del pescado.....	283
1.1.1. Microbiología del tratamiento primario.....	283
1.1.2. Microbiología del pescado fresco.....	284
1.2. Conservación de alimentos.....	286
1.2.1. Fundamentos de conservación de alimentos.	286
1.2.2. Curva de crecimiento microbiano.....	286
1.2.3. Factores que influyen en la actividad microbiana.....	289
1.2.4. Procedimientos utilizados en la conservación de alimentos.....	293
1.2.5. Principales técnicas de conservación de	

alimentos.....	294
1.2.6. Necesidad de nuevas técnicas de conservación.....	295
1.3. Bioconservación.....	299
1.3.1. Cultivos iniciadores o starters.....	305
1.3.2. Cultivos protectores.....	300
1.3.3. Cultivos probióticos.....	302
1.3.4. Bacteriocinas.....	304
1.3.4.1. Importancia y clasificación de las bacteriocinas.....	307
1.3.4.2. Bacteriocinas más empleadas.....	309
1.3.4.2.1. Nisina.....	309
1.3.4.2.2. Otras bacteriocinas de interés....	311
1.3.4.3. Descripción de la técnica.....	311
1.3.4.4. Mecanismo de acción de la técnica considerada.....	312
1.3.4.5. Efectos sobre las propiedades nutricionales de los alimentos.....	314
1.3.4.6. Métodos de purificación.....	314
1.3.4.7. Aplicaciones industriales.....	315
1.3.4.8. Aspectos legislativos y regulación.....	316
1.4. Impregnación a vacío.....	318
V.2. OBJETIVOS.....	319
2.1. Objetivo general.....	319
2.2. Objetivos específicos.....	319
V.3. PLAN DE TRABAJO.....	320
V.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	324
4.1. Materia prima y preparación de la muestra.....	324
4.1.1. Filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>).....	324
4.1.2. Microorganismos.....	324

4.1.3. Patrón de nisina.....	324
4.1.4. Medios de cultivo.....	325
4.2. Metodología.....	327
4.2.1. Análisis microbiológico de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>).....	327
4.2.1.1. Preparación y toma de muestra.....	327
4.2.1.2. Análisis microbiológicos.....	327
4.2.1.3. Análisis físico-químicos de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>).....	328
4.2.1.3.1. Determinación del contenido en humedad.....	328
4.2.1.3.2. Determinación de la actividad de agua (a_w).....	329
4.2.1.3.3. Determinación del pH.....	329
4.2.1.3.4. Determinación del nitrógeno básico volátil total (TVBN).....	329
4.2.1.3.5. Determinación de las propiedades ópticas.....	330
4.2.2. Inóculos concentrados.....	331
4.2.3. Obtención de la curva de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i>	332
4.2.3.1. Preparación del inóculo.....	332
4.2.3.2. Curvas de crecimiento.....	332
4.2.3.3. Modelización de las curvas de crecimiento.....	333
4.2.3.4. Determinación de los parámetros de crecimiento.....	336
4.2.4. Medida de la actividad antimicrobiana.....	337
4.2.4.1. Preparación de los inóculos.....	338
4.2.4.2. Obtención del sustrato parcialmente	

purificado.....	338
4.2.5. Determinación de la actividad antimicrobiana del sustrato parcialmente purificado.....	340
4.2.6. Obtención de las curvas patrón de nisina frente a la cepa diana.....	341
4.2.7. Evaluación de la actividad bactericida de <i>Lactococcus lactis</i> "in vivo".....	342
4.2.7.1. Impregnación a vacío.....	343
4.2.7.2. Medios de impregnación.....	343
4.2.7.3. Análisis microbiológicos.....	344
4.2.7.4. Evaluación de los parámetros físico-químicos de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) impregnados con cultivos bioprotectores durante el almacenamiento en refrigeración.....	344
4.2.7.4.1. Determinación del contenido en humedad.....	344
4.2.7.4.2. Determinación de la actividad de agua (a_w).....	344
4.2.7.4.3. Determinación del pH.....	344
4.2.7.4.4. Determinación del nitrógeno básico volátil total (TVBN).....	345
4.2.7.4.5. Determinación de las propiedades ópticas.....	345
4.3. Análisis estadístico.....	345
V.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	346
5.1. Evolución de la microbiota del pescado fresco (<i>Sparus aurata</i>) durante el almacenamiento en refrigeración.....	347
5.2. Evolución de los parámetros físico-químicos	

durante el almacenamiento en refrigeración de filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) en fresco.....	350
5.2.1. Humedad, actividad de agua, TVBN y pH.....	350
5.2.2. Propiedades ópticas.....	353
5.3. Caracterización del desarrollo de <i>L. lactis</i> en diferentes medios de cultivo.....	354
5.4. Actividad antimicrobiana de <i>Lactococcus lactis</i> . Estudio <i>in vitro</i>	358
5.4.1. Patrón dosis-respuesta de nisina.....	360
5.4.2. Actividad antimicrobiana de <i>Lactococcus lactis</i> frente a las cepas diana: <i>Listeria innocua</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Bacillus cereus</i>	364
5.4.2.1. Espectro de la actividad antimicrobiana de <i>Lactococcus lactis</i> frente a las cepas diana: <i>Listeria innocua</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Bacillus cereus</i>	365
5.4.2.2. Cuantificación de la actividad antimicrobiana de <i>Lactococcus lactis</i> frente a las cepas diana (<i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Bacillus cereus</i>).....	367
5.4.2.3. Actividad antimicrobiana del cultivo celular y sustrato parcialmente purificado de <i>Lactococcus lactis</i> frente a los tres microorganismos diana (<i>Listeria innocua</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Bacillus cereus</i>) expresada como equivalentes de nisina (Log mg/L).....	370
5.5. Actividad antimicrobiana de la nisina y <i>Lactococcus lactis</i> in vivo. Estudio microbiológico y físico-químicos de las muestras tratadas.....	371
5.5.1. Evolución de la microbiota de los filetes de	

dorada (<i>Sparus aurata</i>), impregnados a vacío con nisina, durante el almacenamiento en refrigeración.	374
5.5.2. Evolución de la microbiota de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>), impregnados a vacío con <i>Lactococcus lactis</i> , durante el almacenamiento en refrigeración.....	377
5.5.3. Evolución de los parámetros físico-químicos durante el almacenamiento en refrigeración de filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) impregnados a vacío con nisina y con <i>Lactococcus lactis</i>	380
5.5.3.1. Humedad, actividad de agua, TVBN y pH.....	380
5.5.3.2. Propiedades ópticas.....	383
V.6. CONCLUSIONES.....	393
VI. CONCLUSIONES	<hr/> 395
VII. BIBLIOGRAFÍA	<hr/> 403
VIII. ANEXOS	<hr/> 469

ÍNDICE DE FIGURAS
Capítulo I

Figura I.1. DORADA (<i>Sparus aurata</i>)	12
Figura I.2. Esqueleto del pez.....	12

Capítulo III

Figura III.1. Equipo de fritura a vacío (Gastrovac®).....	77
Figura III.2. Perfil de temperaturas en filetes de dorada tratados a vacío (90 °C, 100 °C y 110 °C) y a presión atmosférica (165 °C).....	84
Figura III.3. Variación de peso de los filetes de dorada en función del tiempo para las diferentes temperaturas de trabajo empleadas.....	88
Figura III.4. Variación de la humedad experimentada por los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) en función del tratamiento empleado.....	91
Figura III.5. Ajustes obtenidos para predecir la pérdida de agua con el modelo empírico de la raíz cuadrada del tiempo (izquierda) y el modelo exponencial (derecha) para la fritura a presión atmosférica (165 °C) y en condiciones de vacío continuo (90, 100 y 110 °C)	93
Figura III.6. Variación del contenido graso experimentado por los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) en función del tratamiento empleado.....	96
Figura III.7. Ajustes obtenidos para predecir la ganancia de grasa con el modelo empírico de la raíz cuadrada del tiempo	

(izquierda) y el modelo exponencial (derecha) para la fritura a presión atmosférica (165 °C) y en condiciones de vacío continuo (90, 100 y 110 °C)	100
Figura III.8. Evolución de la humedad y del contenido de aceite de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>): a) 90 °C y 15 kPa; b) 100 °C y 20 kPa; c) 110 °C y 25 kPa.....	104
Figura III.9. Evolución de la humedad y del contenido de aceite de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) a 165 °C y presión atmosférica.....	105
Figura III.10. Grado de encogimiento de los filetes de dorada para cada tiempo y temperatura de tratamiento de fritura aplicado.....	106
Figura III.11. Aspecto de los filetes de dorada antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento de fritura durante 10 minutos. (a) 90 °C vacío, (b) 100 °C vacío, (c) 110 °C vacío y (d) 165 °C presión atmosférica.....	108
Figura III.12. Ajustes obtenidos para predecir el grado de encogimiento experimentado por los filetes de dorada con el modelo empírico de la raíz cuadrada del tiempo para la fritura a presión atmosférica (165 °C) y en condiciones de vacío continuo (90, 100 y 110 °C).....	109
Figura III.13. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas. El código de las muestras es V (vacío), los siguientes dos o tres dígitos la temperatura de fritura (90, 100 ó 110 °C) y los últimos dígitos el tiempo de fritura (de 0 a 10 minutos).....	111

Figura III.14. Evolución de L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^* con el tiempo de tratamiento para cada temperatura empleada.....	117
Figura III.15. Perfil de temperaturas en filetes de dorada tratados a vacío (70 °C, 80 °C y 90 °C) y a presión atmosférica (100 °C).....	119
Figura III.16. Variación de peso de los filetes de dorada en función del tiempo para las diferentes temperaturas de trabajo empleadas.....	120
Figura III.17. Variación de la humedad experimentada por los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) en función del tratamiento empleado.....	122
Figura III.18. Ajustes obtenidos para predecir la pérdida de agua con el modelo empírico de la raíz cuadrada del tiempo (izquierda) y el modelo exponencial (derecha) para la cocción a presión atmosférica (100 °C) y en condiciones de vacío continuo (70, 80 y 90 °C).....	123
Figura III.19. Contenido de las series C16, C18, y de los ácidos grasos EPA y DHA para filetes de dorada tras veinte minutos de cocción tratados a vacío (70, 80 y 90 °C) y a presión atmosférica.....	129
Figura III.20. Grado de encogimiento de los filetes de dorada para cada tiempo y temperatura de tratamiento de cocción aplicado.....	130
Figura III.21. Aspecto de los filetes de dorada antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento de cocción durante 20 minutos. (a) 70 °C vacío, (b) 80 °C vacío, (c) 90 °C vacío y (d) 100 °C presión atmosférica.....	132

Figura III.22. Evolución de L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^* con el tiempo para cada temperatura empleada.....	133
---	-----

Capítulo IV

Figura IV.1. Molécula de la fibra de konjac glucomanano.....	147
Figura IV.2. Formación de carboximetilcelulosa sódica (CMC) a partir de la reacción de celulosa, sosa cáustica y ácido monocloroacético en condiciones óptimas.....	148
Figura IV.3. Estructura de la xantana.....	149
Figura IV.4. Valores de capacidad de retención de agua (CRA) obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de sal y de transglutaminasa empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).....	176
Figura IV.5. Valores de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con el ensayo de TPA para las diferentes formulaciones en función del nivel de sal y de transglutaminasa (MTGasa) empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).....	182
Figura IV.6. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas sin tratamiento térmico.....	186
Figura IV.7. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas con tratamiento térmico.....	188
Figura IV.8. Análisis de correspondencias. Representación en	

el plano factorial, de los atributos elegidos (círculos) y las muestras evaluadas (triángulos).....	197
Figura IV.9. Micrografías de Cryo-SEM (x 2000) de: sección transversal del filete de dorada (<i>Sparus aurata</i>) (a), pasta de pescado fresca triturada sin nada (b), pasta de pescado fresca triturada con adición de 1% de NaCl (c), pasta de pescado fresca triturada con 0,3% de MTGasa (d), pasta de pescado fresca triturada con 1% de NaCl y embutida durante 24 h en refrigeración (e) y finalmente pasta de pescado con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa embutida y tras 24 h de refrigeración (f).....	200
Figura IV.10. Evolución durante el almacenamiento de la capacidad de retención de agua de la fórmula base (F103) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmico (b).....	203
Figura IV.11. Evolución de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con el ensayo de TPA durante el almacenamiento de la fórmula base (F103) sin tratamiento térmico (a) y muestras tratadas térmicamente (b).....	208
Figura IV.12. Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos y enterobacterias durante el almacenamiento de la fórmula base (F103) sin tratamiento térmico. Las líneas punteadas hacen referencia al valor marcado por la legislación española para cada microorganismo.....	210
Figura IV.13. Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos durante el almacenamiento de la fórmula base (F103) con tratamiento térmico. La línea punteada hace referencia al valor marcado por la legislación española para	

aerobios mesófilos.....	212
Figura IV.14. Valores de capacidad de retención de agua (CRA) obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y carboximetilcelulosa empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).....	220
Figura IV.15. Valores de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con el ensayo de TPA para las diferentes formulaciones en función del nivel konjac glucomanano (KGM) y de carboximetilcelulosa (CMC) empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).....	224
Figura IV.16. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas sin tratamiento térmico.....	228
Figura IV.17. Análisis Factorial. Representación, en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas con tratamiento térmico.....	230
Figura IV.18. Micrografías de Cryo-SEM (x 2000 a, b y c y x 7500 d, e y f) para muestras sin tratamiento térmico de: fórmula base (a y d), fórmula base con adición de konjac glucomanano (b y e) y fórmula base con adición de carboximetilcelulosa sódica (c y f).....	232
Figura IV.19. Micrografías de Cryo-SEM (x 2000 a, b y c y x 7500 d, e y f) para muestras con tratamiento térmico de: fórmula base (a y d), fórmula base con adición de konjac glucomanano (b y e) y fórmula base con adición de	

carboximetilcelulosa sódica (c y f).....	234
Figura IV.20. Valores de capacidad de retención de agua (CRA) obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).....	241
Figura IV.21. Valores de los parámetros mecánicos dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad obtenidos con el ensayo de TPA para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).....	243
Figura IV.22. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas sin tratamiento térmico.....	246
Figura IV.23. Análisis de correspondencias. Representación en el plano factorial, de los atributos elegidos (círculos) y las muestras evaluadas (cuadrados).....	253
Figura IV.24. Micrográficas de Cryo-SEM (x 2000 a, b y c; x 7500 d, e y f) para muestras sin tratamiento térmico de: fórmula base (a y d), fórmula base con adición de konjac glucomanano (b y e) y fórmula base con adición de konjac glucomanano y goma xantana (c y f).....	257
Figura IV.25. Micrográficas de Cryo-SEM (x 2000 a, b y c; x 7500 d, e y f) para muestras con tratamiento térmico de: fórmula base (a y d), fórmula base con adición de konjac glucomanano (b y e) y fórmula base con adición de konjac glucomanano y goma xantana (c y f).....	259

Figura IV.26. Evolución durante el almacenamiento de la capacidad de retención de agua de la fórmula enriquecida con fibra (F2) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmico (b).....	264
Figura IV.27. Evolución de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con el ensayo de TPA durante el almacenamiento de la fórmula enriquecida con fibra (F2) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmicamente (b).....	268
Figura IV.28. Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos y enterobacterias durante el almacenamiento de la fórmula enriquecida con fibra (F2) sin tratamiento térmico. Las líneas punteadas hacen referencia al valor marcado por la legislación española para cada microorganismo.....	270

Capítulo V

Figura V.1. Esquema de la curva de crecimiento microbiano..	287
Figura V.2. Clasificación de bacteriocinas.....	308
Figura V.3. Características de la utilización de bacteriocinas en industria alimentaria.....	312
Figura V.4. Formación de poros en la membrana fosfolipídica por interacción entre la bacteriocina nisina y el lípido II.....	313
Figura V.5. Diagrama del plan de trabajo realizado para la consecución de los objetivos propuestos en el presente capítulo.....	323
Figura V.6. Recuentos de aerobios mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en filetes de	

dorada (<i>Sparus aurata</i>), durante el almacenamiento en refrigeración. Las líneas punteadas hacen referencia al valor marcado por la legislación española para cada microorganismo.....	349
Figura V.7. Evolución de los parámetros de humedad, a_w , pH y TVBN durante el almacenamiento de los filetes de dorada (<i>Spaurs aurata</i>) en fresco.....	351
Figura V.8. Evolución de las coordenadas colorimétricas (L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^*) durante el almacenamiento de los filetes de dorada (<i>Spaurs aurata</i>) en fresco.....	354
Figura V.9. Modelización de las curvas de crecimiento de <i>L. lactis</i> en los cuatro medios en estudio: a) MRS, b) YGLPB, c) óptimo 1 y d) óptimo 2.....	356
Figura V.10. Actividad antimicrobiana de la nisina frente a <i>Listeria innocua</i> : a) halo de inhibición generado para las distintas concentraciones de nisina analizadas y b) ajuste lineal y ecuación que relaciona la concentración de nisina y el halo de inhibición.....	361
Figura V.11. Actividad antimicrobiana de la nisina frente a <i>Lactobacillus sakei</i> : a) halo de inhibición generado para las distintas concentraciones de nisina analizadas y b) ajuste lineal y ecuación que relaciona la concentración de nisina y el halo de inhibición.....	362
Figura V.12. Actividad antimicrobiana de la nisina frente a <i>Bacillus cereus</i> : a) halo de inhibición generado para las distintas concentraciones de nisina analizadas y b) ajuste lineal y ecuación que relaciona la concentración de nisina y el halo de inhibición.....	362

Figura V.13. Diámetros de los halos de inhibición (media y desviación estándar) obtenidos para los sustratos (CC:cultivo celular, SPP:sustrato parcialmente purificado), procedentes de <i>L. lactis</i> , obtenidos tras 4 y 6 horas de incubación en los cuatro medios de cultivo ensayados (MRS, YGLPB, óptimo 1 y óptimo 2), frente a <i>B. cereus</i> y <i>L. sakei</i>	368
Figura V.14. Micrografía Cryo-SEM de filete de dorada. (a) x350, (b) x 2000.....	373
Figura V.15. Recuentos de aerobios mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>), impregnados a vacío con nisina, durante el almacenamiento en refrigeración. Las líneas punteadas hacen referencia al valor marcado por la legislación española para cada microorganismo.....	376
Figura V.16. Recuentos de aerobios mesófilos y bacterias ácido lácticas, en filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) impregnados a vacío con <i>Lactococcus lactis</i> , durante el almacenamiento en refrigeración. La línea punteada hace referencia al valor marcado por la legislación española para los microorganismos aerobios mesófilos.....	379
Figura V.17. Evolución de los parámetros de humedad, a_w , pH y TVBN durante el almacenamiento de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) impregnados con nisina y con <i>Lactococcus lactis</i>	383
Figura V.18. Evolución de las coordenadas de color (L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^*) durante el almacenamiento en refrigeración de filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>) sin impregnar, impregnados a vacío con nisina y con <i>Lactococcus lactis</i>	386

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I

Tabla I.1. Composición (por 100 g de porción comestible).....	14
---	----

Capítulo III

Tabla III.1. Principales ventajas y desventajas de la fritura frente a otros tipos de cocción.....	45
Tabla III.2. Caracterización de las muestras frescas.....	83
Tabla III.3. Coeficientes de regresión (R^2) y parámetros de ajuste para los dos modelos empíricos empleados para la pérdida de agua.....	93
Tabla III.4. Parámetros de ajuste para modelos cinéticos empleados para la pérdida de agua en el proceso de fritura...	95
Tabla III.5. Coeficientes de regresión (R^2) y parámetros de ajuste para los dos modelos empíricos empleados para la ganancia de grasa.....	101
Tabla III.6. Parámetros de ajuste para modelos cinéticos empleados para la ganancia de aceite en el proceso de fritura.....	103
Tabla III.7. Coeficientes de regresión (R^2) y parámetros de ajuste para los dos modelos empíricos empleados para el encogimiento de los filetes de dorada.....	110
Tabla III.8. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.....	110
Tabla III.9. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.....	111

Tabla III.10. Porcentaje de compuestos polares presentes en el aceite después de la fritura en función de la temperatura. Valores promedio (SD).....	113
Tabla III.11. Coeficientes de regresión (R ²) y parámetros de ajuste para los dos modelos empíricos empleados para la pérdida de agua.....	124
Tabla III.12. Efecto de las condiciones de cocción (temperatura, tiempo y método de cocción) sobre el contenido proteico de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>)....	125
Tabla III.13. Efecto de las condiciones de cocción (temperatura, tiempo y método de cocción) sobre el contenido graso de los filetes de dorada (<i>Sparus aurata</i>).....	126
Tabla III.14. Perfil lipídico para filetes de dorada tras veinte minutos de cocción tratados a vacío (70, 80 y 90 °C) y a presión atmosférica.....	127
Tabla III.15. Porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados con series n-3 y n-6 para filetes de dorada tras veinte minutos de cocción tratados a vacío (70, 80 y 90 °C) y a presión atmosférica.....	128

Capítulo IV

Tabla IV.1. Límites legislativos vigentes de los diferentes microorganismos en los texturizados frescos y cocidos.....	164
Tabla IV.2. Formulaciones estudiadas para la obtención de la fórmula base.....	171

Tabla IV.3. Valores de humedad, aw y pH obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de NaCl y transglutaminasa microbiana (MTGasa) presente en la misma así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).....	172
Tabla IV.4. Coordenadas de color CIEL*a*b*, tono (hab*) y croma (Cab*) de las diferentes formulaciones estudiadas en función del nivel de NaCl y MTGasa, así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).....	179
Tabla IV.5. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.....	184
Tabla IV.6. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.....	185
Tabla IV.7. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.....	187
Tabla IV.8. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.....	187
Tabla IV.9. Frecuencia de las respuestas de los catadores en la comparación pareada múltiple de las formulaciones con diferentes niveles de transglutaminasa.....	189
Tabla IV.10. Valores T de Friedman para los distintos atributos analizados.....	190
Tabla IV.11. Diferencia entre la suma de rangos para las formulaciones estudiadas.....	191
Tabla IV.12. Frecuencia de las respuestas de los catadores en la comparación pareada múltiple de las formulaciones con diferentes niveles de NaCl.....	193

Tabla IV.13. Valores T de Friedman para los distintos atributos analizados.....	194
Tabla IV.14. Diferencia entre la suma de rangos para las formulaciones estudiadas.....	195
Tabla IV.15. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis de correspondencias.....	196
Tabla IV.16. Contribución de los factores a la inercia de las formulaciones.....	196
Tabla IV.17. Contribución de los factores a la inercia de cada atributo.....	196
Tabla IV.18. Evolución de los parámetros de humedad, a_w y pH durante el almacenamiento de la fórmula base (F103). Valores promedio (SD).....	202
Tabla IV.19. Evolución de las coordenadas colorimétricas CIEL*a*b*, el tono (hab*) y el croma (Cab*), durante el almacenamiento de la fórmula base (F103). Valores promedio (SD).....	205
Tabla IV.20. Formulaciones estudiadas con konjac glucomanano y carboximetilcelulosa.....	215
Tabla IV.21. Valores de humedad, a_w y pH obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y carboximetilcelulosa así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).....	217
Tabla IV.22. Coordenadas de color CIEL*a*b*, tono (hab*) y croma (Cab*) de las diferentes formulaciones estudiadas en función del nivel de konjac glucomanano y	

carboximetilcelulosa, así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).....	221
Tabla IV.23. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.....	227
Tabla IV.24. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.....	228
Tabla IV.25. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.....	229
Tabla IV.26. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.....	230
Tabla IV.27. Formulaciones estudiadas con konjac glucomanano y goma xantana.....	236
Tabla IV.28. Valores de humedad, aw y pH obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).....	239
Tabla IV.29. Coordenadas de color CIEL*a*b*, tono (hab*) y croma (Cab*) de las diferentes formulaciones estudiadas en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana, así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).....	242
Tabla IV.30. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.....	245
Tabla IV.31. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.....	245
Tabla IV.32. Frecuencia de las respuestas de los catadores en la comparación pareada múltiple de las formulaciones	

estudiadas.....	248
Tabla IV.33. Valores T de Friedman para los distintos atributos analizados.....	249
Tabla IV.34. Diferencia entre la suma de rangos para las formulaciones estudiadas.....	250
Tabla IV.35. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis de correspondencias.....	251
Tabla IV.36. Contribución de los factores a la inercia de las formulaciones.....	252
Tabla IV.37. Contribución de los factores a la inercia de cada atributo.....	252
Tabla IV.38. Evolución de los parámetros de humedad, aw y pH durante el almacenamiento de la fórmula enriquecida con fibra (F2). Valores promedio (SD).....	263
Tabla IV.39. Evolución de las coordenadas colorimétricas CIEL*a*b*, el tono (hab*) y el croma (Cab*), durante el almacenamiento de la fórmula enriquecida con fibra (F2). Valores promedio (SD).....	266

Capítulo V

Tabla V.1. Principales métodos de conservación de los alimentos.....	295
Tabla V.2. Tipos de cultivos y sus funciones.....	299
Tabla V.3. Composición del medio óptimo 1 en g/L.....	326
Tabla V.4. Composición del medio óptimo 2 en g/L.....	326

Tabla V.5. Concentraciones de los inóculos.....	332
Tabla V.6. Distribución de los inóculos en los pocillos para la determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.....	341
Tabla V.7. Límites legislativos vigentes de los diferentes microorganismos para productos de la pesca frescos.....	348
Tabla V.8. Parámetros de crecimiento de <i>L. lactis</i> en los cuatro medios de cultivos analizados.....	356
Tabla V.9. Ecuaciones correspondientes a los ajustes lineales obtenidos a partir de las rectas correspondientes a las representaciones del log de la concentración de nisina versus diámetro de halo de inhibición frente a las tres cepas indicadoras (<i>L. innocua</i> , <i>L. sakei</i> y <i>B. cereus</i>).....	364
Tabla V.10. Resumen del espectro de actividad antimicrobiana del cultivo celular y sustrato parcialmente purificado de <i>Lactococcus lactis</i> frente a los tres microorganismos diana (<i>Listeria innocua</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Bacillus cereus</i>).....	366
Tabla V.11. Actividad antimicrobiana del cultivo celular y el sustrato parcialmente purificado de <i>Lactococcus lactis</i> frente a los tres microorganismos diana (<i>Listeria innocua</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Bacillus cereus</i>) expresada como equivalentes de nisina (Log mg/L).....	371
Tabla V.12. Peso inicial, incremento de peso y porcentaje de impregnación de los filetes de dorada sometidos a los distintos tratamientos de conservación. Valores promedio (SD).....	373

_____ JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL ESTUDIO

JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL ESTUDIO

La acuicultura en su conjunto produce hoy en día más de la mitad del pescado consumido en el mundo. Este hito en la alimentación de la humanidad se alcanza después de cuatro décadas de continuo crecimiento de esta actividad, y revela no solo la vitalidad de la acuicultura, sino también el desarrollo económico global y los continuos avances en la conservación, comercialización y procesado de los productos acuáticos. La producción global de acuicultura ha crecido de manera espectacular desde menos de 0,6 millones de t en 1950 (y un valor de menos de 400.000 euros) hasta 68,4 millones de t en 2008, año más reciente del que se disponen datos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de Naciones Unidas (FAO) (con un valor global aproximado de 84.791 millones de euros). Hasta 2007 las producciones de la pesca y de la acuicultura avanzaban sobre las tendencias marcadas en el último cuarto del siglo XX: la pesca contribuía de forma invariable con entre 90 y 95 millones de toneladas al año y la producción acuícola crecía rápidamente. Sin embargo, en los primeros años del siglo XXI es perceptible una ligera desaceleración en el ritmo de crecimiento de la acuicultura a nivel mundial y un marcado estancamiento de éste en regiones como la Unión Europea (APROMAR, 2010).

El consumo per cápita mundial de productos acuáticos, según el informe publicado por APROMAR en 2010, superó los 20 kg/hab. Este dato supuso un fuerte incremento desde 1970 en el que este consumo era de tan solo 11 kg/hab. La acuicultura y la pesca son dos actividades complementarias que deben hacer frente al reto de la creciente demanda de productos acuáticos sanos y seguros. Los productos acuáticos son actualmente una de las más importante fuentes de proteína animal del mundo, representando el 28% del

total de la proteína ingerida en los países en vías de desarrollo y el 14% en Europa y Norteamérica. España es el Estado Miembro de la UE con una mayor producción en acuicultura en toneladas, con 249.070 en 2008 (19,5% del total de la UE), seguido por Francia con 237.870 t (18,6%) e Italia con 181.470 t (14,2%).

El valor de la producción total de acuicultura española en 2008 fue de 414 millones de euros (10,9% del valor total, y 5ª posición). La producción acuícola total de dorada (*Sparus aurata*) en Europa y el resto del mundo en 2009 fue de 167.000 t. Esta cifra fue un 1,6% inferior a la del año previo. Existe producción de dorada de acuicultura en 19 países diferentes. Los principales productores son Grecia con aproximadamente 85.000 t (que representan el 50,1% del total), Turquía con 35.000 toneladas (20,9%) y España con 23.690 (14,2%). La producción de dorada de acuicultura en España en 2009 fue de 23.690 t, un -1,0% sobre la cifra de 2008. Esta circunstancia de descenso continuado de la producción no había ocurrido nunca en la historia de la acuicultura de dorada en España. En 2009 la Comunidad Valenciana (con el 39% del total) encabezó la producción de dorada de acuicultura en España, seguida por Murcia (27%), Canarias (15%), Andalucía (14%) y Cataluña (5%). El precio medio en España de primera venta de dorada de acuicultura en 2009 fue de 3,75 €/kg. Este precio fue un 2,4% superior al de 2008, mientras que este había caído un 14,9% respecto del de 2007. El ejercicio 2009 fue el segundo año consecutivo con resultados negativos para los productores de dorada, tanto en España como en el resto del Mediterráneo, aunque se comenzaron a percibir tenues signos de recuperación. Debe tenerse en cuenta que un precio medio de venta de 3,75 €/kg es inferior al coste medio de producción, que se sitúa en una franja entre 3,70 y 4,20 €/kg, según la eficiencia de las empresas. Las

causas de esta crisis de precios deben buscarse en los incrementos de la producción de esta especie a nivel Mediterráneo en los últimos años, en el excesivo número de operadores comercializadoras extranjeras y españolas que fraccionan en exceso la oferta y en el desequilibrio existente entre la capacidad de negociación de la demanda frente a la de la oferta. Por otra parte, dos años de precios de venta bajos arrastraron a las empresas productoras de dorada a severos problemas de tesorería obligándoles a ventas en condiciones no deseadas.

La comercialización de la dorada de acuicultura se realiza principalmente a través de las pescaderías de supermercados y grandes superficies. Las pescaderías tradicionales son la tercera vía de venta. Existe también una vía de comercialización menor a través del canal Horeca (Hostelería, Restauración y Catering), pero la mayor parte del consumo se produce en los hogares (85-90%).

La acuicultura en la Unión Europea, después de muchos años de crecimiento, sufre desde el año 2000 un evidente estancamiento productivo. Las causas de esta situación venían siendo avisadas mucho antes del cambio de siglo, pero la realidad plasmada en los datos estadísticos es hoy en día irrefutable: la acuicultura en la UE ni crece ni crea empleo, mientras que en el resto de Europa y del mundo sigue progresando a buen ritmo. La causa de esta situación es una continuada pérdida de competitividad de las empresas de acuicultura radicadas en la Unión Europea cuyos motivos son diversos pero pueden resumirse en cuatro cuestiones: la desigualdad en las condiciones de participación en el Mercado Único de los productores europeos frente a los localizados en países terceros, la dificultad en la obtención de licencias para producir en nuevos emplazamientos, la escasa variedad de productos ligada a unas escasas políticas de I+D+i en este sector y la insuficiente

información que reciben los consumidores y la sociedad en general sobre la acuicultura. La Comisión Europea publicó en 2009 un documento denominado "Construir un futuro sostenible para la acuicultura: Nuevo impulso a la estrategia para el desarrollo sostenible de la acuicultura europea", en el cual concluyen que para fomentar la competitividad del sector acuícola es imprescindible apostar por la investigación y la innovación.

Esta breve descripción del sector acuícola, en concreto el de la dorada (*Sparus aurata*), pone de manifiesto la necesidad de un cambio en dicho sector en materia de I+D+i. La presente tesis doctoral se enmarca en este ámbito con el objetivo de desarrollar y analizar posibles vías de presentación y de comercialización así como de preservación de un pescado con una alta producción en España como es la dorada (*Sparus aurata*). Para ello se abordan tres capítulos diferentes en los cuales el objetivo principal será el estudio de diferentes tecnologías para el desarrollo de productos alternativos elaborados a base de dorada que permitan la diversificación del sector.

La industria transformadora de productos de la pesca genera una importante cantidad de subproductos que suponen un grave problema medioambiental. Este hecho sumado a la necesidad de innovar en el sector acuícola expuesto anteriormente justifica el desarrollo de productos transformados a partir de los desechos provenientes de la industria transformadora. En esta línea, se pretende desarrollar un producto reestructurado de dorada (*Sparus aurata*) con alto valor añadido como posible solución al problema planteado. El aprovechamiento de los desechos constituye una oportunidad de desarrollo industrial importante, y a la vez, una solución inteligente para el problema ambiental que los mismos generan. Así mismo, otro de los principales problemas de los

productos de la pesca es la escasa vida útil que presentan cuando se comercializan en fresco. En este sentido, la presente tesis propone la utilización de cultivos bioprotectores como técnica de conservación con el fin de prolongar la vida útil de la dorada en fresco. Finalmente, también se propone la utilización de la técnica de vacío como mejora de los tratamientos térmicos (cocción y fritura) tradicionales con el objetivo de evaluar su posible aplicación al desarrollo de platos precocinados mediante la utilización de dicha técnica ofreciendo así otro producto alternativo al consumo de dorada (*Sparus aurata*) en fresco.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA DORADA

1.1. Características de la especie

La dorada (*Sparus aurata*) es una especie litoral que pertenece a la familia de los Espáridos, orden Perciformes. La dorada habita en aguas poco profundas (a unos 150 m de profundidad) tanto de fondos arenosos como de roca del Mediterráneo y del Atlántico, entre las islas Canarias e Inglaterra. Es sociable y forman pequeños grupos. Se alimenta fundamentalmente de moluscos, crustáceos y peces, y en ocasiones, de algas y plantas verdes marinas. Se pesca con artes de arrastre, palangre de fondo, redes de enmalle y trasmallos (Carbajo-Vasco et al., 2005). Presenta un fenómeno de inversión sexual en los primeros años de su vida, pues todos son machos y con la edad se convierten en hembras. Puede vivir más de 10 años y llegar a alcanzar hasta 70 cm de longitud (Coll-Morales, 1991).

Su cuerpo, como en otros miembros de su familia, es ovalado, alto y comprimido. Cabeza grande con el rostro y frente convexo. Boca con labios muy gruesos, la mandíbula superior un poco más larga que la inferior. Los dientes anteriores de ambas mandíbulas son cónicos y fuertes. El dorso es gris y el vientre blanco. Aleta dorsal con una parte anterior espinosa y una posterior con radios blandos. Las aletas pectorales son largas, alcanzando su extremo el origen de la aleta anal.

Entre los ojos tiene una mancha dorada (más patente en individuos adultos) que es la que le da su nombre, una mancha negra en el origen de la línea lateral y una banda escarlata en el borde de la mitad inferior del opérculo (Figura I.1.).

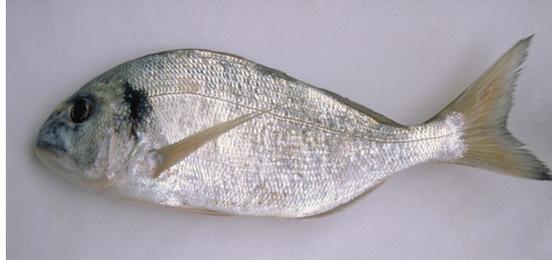


Figura I.1. Dorada (*Sparus aurata*) (FONDOPES, 2008).

El cultivo de dorada se realiza en jaulas flotantes en el mar, tanques de hormigón o estanques de tierra. La alimentación es a base de piensos fabricados a partir de harinas y aceite de pescado (Carbajo-Vasco et al., 2005). Cada dorada tarda entre 18 y 24 meses en alcanzar 400 g desde que eclosiona el huevo. La talla comercial abarca desde los 250 g hasta más de 1,5 kg.

El pez tiene columna vertebral y cráneo cubriendo la masa cerebral. La columna vertebral se extiende desde la cabeza hasta la aleta caudal y está compuesta por vértebras. Estas vértebras se prolongan dorsalmente para formar las espinas neurales y en la región del tronco tienen apófisis laterales que dan origen a las costillas. Estas costillas son estructuras cartilaginosas u óseas, en el tejido conectivo (miocomata) y ubicadas entre los segmentos musculares (miotomas) (Figura I.2.).

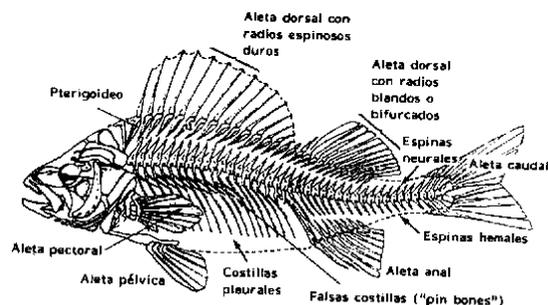


Figura I.2. Esqueleto del pez (Eriksson y Johnson, 1979).

La masa muscular a cada lado del pez forma el filete. La parte superior del filete se denomina músculo dorsal y la parte inferior músculo ventral. Los miocomatas forman un patrón de surcos perpendiculares al eje longitudinal del pez permitiendo la flexibilidad del músculo para propulsar el pez a través del agua. La proporción entre músculo oscuro y músculo blanco varía con la actividad del pez, debido a las diferentes funciones que poseen. El músculo oscuro funciona en movimientos lentos y continuos, mientras que el blanco es empleado en movimientos rápidos y súbitos. La composición química de los dos tipos de músculo se diferencia fundamentalmente en el alto contenido de lípidos, hemoglobina, glucógeno y mayor número de vitaminas presentes en el músculo oscuro. El alto contenido de lípidos del músculo oscuro resulta importante debido a los problemas asociados con la rancidez (Huss, 1988).

1.2. Valor nutricional de la Dorada

Por su contenido moderado de grasa se trata de un pescado semigraso y, por tanto, de bajo aporte energético, por lo que si se cocina de manera sencilla y con poca grasa, su consumo es adecuado en dietas de control de peso. En su composición (Tabla I.1.) destaca su contenido modesto en proteínas de alto valor biológico. Su carne supone un aporte interesante de potasio y fósforo; moderado de sodio y magnesio -comparado con el resto de pescados frescos- y menos relevante de hierro, en cantidad inferior comparado con las carnes (SENBA, 2008).

Tabla I.1. Composición (por 100 g de porción comestible).

<i>Composición centesimal</i>	
Agua (g)	71,08
Energía (Kcal)	141
Proteínas (g)	22
Lípidos (g)	5,40
AGS (g)	1,70
AGM (g)	2,10
AGP (g)	1,60
Cenizas (g)	1,02
Carbohidratos (g)	0,00
<i>Minerales (mg)</i>	
Fe	1,70
Mg	24
K	239
P	236
Ca	184
Na	123

Fuente: SENBA Sociedad Española de Nutrición
Básica y Aplicada (SENBA, 2008)

Dentro de la fracción lipídica de la dorada, los ácidos grasos más abundantes son los monoinsaturados aunque también presenta un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados DHA (ácido docohexanoico) y EPA (ácido eicosapentanoico).

I.2. EL CONSUMO DE DORADA EN ESPAÑA

La dorada cuenta con una importante demanda en el mercado español. En los últimos años se han probado y desarrollado acciones innovadoras en el ámbito de la comercialización de la dorada, con el objeto de ganar la confianza de los consumidores y mejorar su valoración en el mercado. Sellos y marcas de origen y calidad, como "Dorada de Crianza del Sur", aunque en ámbitos locales, son hoy una realidad que parece tener efectos positivos tanto en la intención de compra como en el precio aceptado por los

consumidores (Fernández-Polanco et al., 2006). Otras alternativas comerciales, como presentación y transformado, aunque prometedoras, precisan todavía de mayores niveles de integración con otras industrias e intermediarios. La dorada es la especie más identificada con la acuicultura, habiendo relegado a la trucha a la segunda posición en identificación con el cultivo.

El consumo de esta especie se encuentra muy generalizado en España, siendo de aproximadamente la mitad de la población, un 53,96% de los consumidores de pescado (49,5% de la muestra). Según el Panel de Consumo del MARM, el consumo per cápita de dorada en España en 2010 se situó en 0,68 kg por habitante. Dicho consumo de dorada se ve favorecido por el conocimiento de la acuicultura y la realización de la compra, especialmente en hipermercados y en las pescaderías tradicionales de barrio y mercados. El perfil del consumidor es una persona de mediana edad, casada y laboralmente activa, con nivel de renta y formación media-alta. El consumo de dorada se incrementa cuando el consumidor conoce y consume productos de acuicultura, realiza personalmente la compra en los canales tradicionales e hipermercados y consume también la especie en restaurantes (APROMAR, 2007).

I.3. TENDENCIAS DEL MERCADO DE PESCADO. NUEVOS PRODUCTOS. PRODUCTOS REESTRUCTURADOS

El pescado se presenta como un producto agroalimentario muy saludable, bajo en grasas saturadas y con una excelente fuente de proteínas esenciales para nuestra salud. Sin embargo, el pescado no suele ajustarse siempre a las preferencias del consumidor actual, dada su naturaleza muy perecedera, sus altos costes de preparación, o por sus características físicas y organolépticas

(espinas, sabor, olor). Diversos estudios que han tratado de identificar los motivos subyacentes del consumo de pescado (Leek, 2000; Myrland et al., 2000) consideran que el principal factor responsable de rechazo del producto lo representa la dimensión sensorial o hedónica. Se trata de las propiedades organolépticas del producto, principalmente la apariencia (color, forma, homogeneidad, defectos), el olor, el sabor, la textura o la consistencia. Estas propiedades organolépticas, entre las cuales destaca siempre el sabor (Steenkamp, 1993; Acebrón y Dopico, 2000; Roininen et al., 1999) identifican el producto e influyen en su aceptación. Existen estudios cualitativos con consumidores que revelan que los no compradores piensan que el pescado ofrece menor variedad en términos de sabores, es menos consistente que la carne, tiene una apariencia física menos agradable en el momento de compra y su olor no es muy apetecible en el momento de consumo (Leek et al., 2000). En este contexto, se busca desarrollar nuevos productos de pesca que intentan superar algunas de esas barreras al consumo. Se trata de productos de pescado de conveniencia, dirigidos a la población en general y principalmente al público joven (Calvo-Dopico et al., 2010). La conveniencia en el caso de un producto de pescado, se refiere a los beneficios que el consumidor desea obtener o los costes físicos o psicológicos que quiere reducir en la compra, manejo, preparación, conservación, consumo y post-consumo del producto.

España se ha venido centrando en los productos tradicionales (fundamentalmente conservas) frente a otros países como Francia y Reino Unido que son más innovadores, tanto en procesos productivos como en productos. La evolución de los últimos años refleja, sin embargo, un fuerte aumento en la elaboración de preparados congelados y, sobre todo, de platos totalmente

elaborados siguiendo la tendencia europea. Los consumidores demandan cada vez más comida de rápida preparación, sin renunciar por ello al sabor y a la calidad. El tamaño y la tipología de los hogares modernos, día a día más constituidos por personas solas y de un nivel adquisitivo medio-alto, ha impulsado la proliferación de los formatos individuales de la comida lista para su consumo. Siguiendo la tendencia europea, en España se observa una creciente comercialización de los productos transformados pesqueros, a través de los canales de la gran distribución (sobre todo en el caso de las conservas), dada la creciente importancia que se le da a la dieta saludable, y la mayor demanda de diversificación de la gama de productos, tales como platos preparados o precocinados, nuevas conservas, etc. debida a nuevos patrones sociales: comidas menos estructuradas, trabajo de la mujer fuera del hogar, etc. Las industrias europeas están tendiendo progresivamente a la fabricación de productos con alto valor añadido, calidad superior y que responden mejor a las preferencias de los consumidores, así como a la fabricación de productos de gran consumo mediante la diversificación de las especies trabajadas, utilizando otras menos caras como por ejemplo la caballa.

La gran competencia existente entre las empresas del sector para poder satisfacer las demandas del consumidor, está provocando que la industria agroalimentaria busque la diferenciación de los competidores a través del lanzamiento de nuevos productos. Esto no es una excepción en la industria de transformados de la pesca. La sustitución de la comercialización y consumo de pescado entero por producto troceado, el desarrollo de nuevos productos y la proliferación de productos funcionales procedentes del mar, son las tres grandes tendencias referidas al

consumidor en la industria de transformación de la pesca (OPTI, 2005).

El sector de los productos de la pesca tiene ante sí una oportunidad de crecimiento. Los cambios en los hábitos de los consumidores han ido acompañados de mejoras en las tecnologías que están permitiendo que el sector pueda hacer frente a una demanda cada vez mayor de productos preparados por parte de los consumidores. La presentación de nuevos productos con un mínimo procesamiento, permite llegar a una demanda que exige productos fáciles de preparar. Los consumidores quieren productos que sean prácticos y sanos.

La creciente demanda de pescado y productos de la pesca por parte de los consumidores está afectando a los recursos pesqueros de todo el mundo, reduciendo las poblaciones de muchas especies como el lenguado, la merluza, el bacalao y otras especies. Al mismo tiempo, hay muchas especies que no se utilizan debido a su pequeño tamaño, sabor, olor, color o textura. Además, algunos subproductos, resultado del fileteado de algunas especies, podrían ser transformados en productos de alto valor utilizando la tecnología del surimi o el reestructurado. Reestructurar un producto implica el picado del músculo de pescado, la solubilización de las proteínas de pescado con sal, formación de la pasta de pescado y la inducción del fenómeno de gelificación, generalmente por calor. La técnica de reestructurar permite la comercialización de especies de bajo valor comercial así como la utilización de restos del fileteado de especies comerciales (Noriega-Rodríguez et al., 2009; Pacheco-Aguilar et al., 2010). Las proteínas miofibrilares (concretamente la miosina) son las responsables de la agregación inducida por calor incluyendo los mecanismos de gelificación y unión proteica (Boyer et al., 1996). El nivel de sal utilizado es

importante y determina la cantidad de exudado proteico que posteriormente actuará como agente ligante permitiendo la agregación proteica. Diferentes autores han estudiado la influencia de la adición de sal en la formación del gel. La fuerza iónica generada en la matriz proteica influye en la forma en la que se ligan las proteínas (miosina). Así pues, se ha observado que a baja fuerza iónica las agregaciones que se producen son inducidas por uniones laterales entre las cadenas de miosina, mientras que a alta fuerza iónica se producen uniones entre las cabezas de las cadenas de miosina, lo que implicará un sistema mucho más estructurado (Boyer et al., 1996; Ramírez et al., 2000).

La industria de alimentos debe hacer un esfuerzo para reducir el contenido de sal en los alimentos con el fin de prevenir y controlar enfermedades cardiovasculares. En este sentido, para reestructurar productos de pescado, se han venido utilizando diferentes agentes proteicos como agentes ligantes con el fin de mejorar las propiedades mecánicas y funcionales del producto reestructurado como por ejemplo: proteína de huevo (Yetim y Ockerman, 1995), caseína, concentrado de proteína de trigo (WPC) y transglutaminasa microbiana (MTGasa) (Uresti et al., 2004).

Los productos reestructurados surgen como una alternativa real y viable al consumo de pescado en fresco o congelado. Cualquier especie con valor comercial adecuado puede ser reestructurada ofreciendo al consumidor una nueva forma de consumir pescado y al mercado una nueva alternativa para su comercialización y para aquellas especies que tradicionalmente han sido poco o nada comercializadas la opción de reestructurar se presenta como una salida adecuada desde un punto de vista económico. Un producto se denomina reestructurado cuando se le trocea o pica y después conjuntamente con ingredientes o sin ellos se crea una estructura

diferente que va a dar lugar a una nueva textura y apariencia (Sánchez-Alonso et al., 2007). Una de las mayores ventajas que nos ofrece reestructurar músculo de pescado es la posibilidad de modificar la composición del producto inicial añadiendo nuevos ingredientes o aditivos que nos van a dar como resultado un producto final con unas características y propiedades diferentes al producto de partida. En este sentido la adición de fibra se presenta como una alternativa muy interesante no solo desde el punto de vista tecnológico y nutricional sino como una herramienta apropiada desde el punto de vista del marketing. El pescado posee un elevado valor nutricional debido a su composición y además ofrece unas propiedades funcionales adecuadas para ser reestructurado. Es un producto que no contiene fibra y el hecho de añadir fibra a productos pesqueros podría parecer poco adecuado cuando se mantiene una dieta equilibrada que contenga además de pescado, frutas, verduras y legumbres. Sin embargo, la realidad nos indica que el consumo en niños y adolescentes en Europa Occidental se basa en proteínas y grasas pero apenas ingieren alimentos que les aporten la fibra en la cantidad necesaria para cubrir las recomendaciones diarias en este nutriente (la Asociación Americana de Dietética recomienda una ingesta de fibra en adultos de 25 a 30 g/día o de 10 a 13 g/1000 kcal y en Europa el consumo recomendado es de 20 g/persona/día) (Borderías et al., 2005). La fibra alimentaria es un elemento esencial en una dieta equilibrada y Trowell et al. en 1976, la definió como "un conjunto de macromoléculas de origen vegetal no digeribles por las enzimas digestivas del hombre" y hoy también se incluyen aquellos elementos animales como el quitosano que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos. Desde un punto de vista tecnológico la fibra alimentaria mejora la capacidad de retención de

agua, mejora el poder de gelificación, reduce la pérdida de rendimiento y mantiene la forma del producto después del cocinado (Ang y Crosby, 2005).

La aplicación de hidrocoloides a los productos de la pesca ofrece nuevas oportunidades para desarrollar nuevos productos basados en la tecnología del surimi o de los productos reestructurados.

I.4. APLICACIÓN DE LA COCCIÓN/FRITURA A VACÍO

La aplicación de tratamientos térmicos es la forma más extendida de conservación de los alimentos. El tratamiento de esterilización ha permitido la aparición de platos preparados en conserva, cocinados a partir de recetas tradicionales y con una amplia vida comercial sin necesidad de refrigeración. Este tratamiento resulta muy agresivo con las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos, causando rechazo en parte de los consumidores. Por su parte, la pasteurización se emplea en la producción de platos precocinados o cocinados con una fecha de caducidad reducida y con la necesidad de aplicar temperaturas de refrigeración o congelación para su conservación.

El tratamiento por calor puede ser considerado, sin duda alguna, como uno de los modos más antiguos de procesar las materias primas alimenticias. En el ámbito de la tecnología culinaria, cualquier tipo de tratamiento térmico que se aplique para la elaboración de un plato cocinado recibe el nombre genérico de cocción. Cocer un alimento significa exponerlo a un foco de calor. Como consecuencia de ese calentamiento, el alimento experimenta cambios que pueden ser físicos, químicos, e incluso biológicos, que implican modificaciones relacionadas con su calidad, tanto organoléptica como nutricional. Tales modificaciones pueden resultar favorables, o desfavorables, según el tipo de cocción y las

condiciones bajo las que se realice. Por ello, la cocción puede ser considerada como aquella operación capaz de transformar de modo físico y/o químico el aspecto, la textura, la composición y el valor nutritivo de un alimento mediante la acción del calor, con el fin de satisfacer los sentidos de la vista, del gusto y del olfato. En esencia, la cocción es la aplicación de calor que se hace a un alimento con el fin de convertirlo en más digerible, apetecible y sanitariamente seguro. Una vez que el calor incrementa la temperatura del alimento se origina en consecuencia una serie de procesos que se pueden considerar como la base del cocinado de un alimento: reblandecimiento de fibras, coagulación de las proteínas, disolución de compuestos químicos, liberación de jugos, cambios en los factores de apariencia, etc. La intensidad del tratamiento térmico aplicado y las condiciones en las que se realiza, son factores determinantes de posibles modificaciones, que pueden ser agrupadas en dos tipos de cambios:

a) Cambios de naturaleza física, externos y visibles, que atañen a la apariencia, textura y flavor del producto, con una clara repercusión visual, olfativa y gustativa.

b) Cambios de naturaleza química, sin manifestaciones externas, aunque no menos importantes, que afectan a la composición molecular del alimento y se relacionan tanto con su valor nutritivo, como con su seguridad microbiológica y con las características organolépticas del mismo.

El binomio tiempo-temperatura va a ser crucial en estos cambios (Bello, 1998).

4.1. Cocción/fritura tradicional

- Cocción: cocer, desde el punto de vista tradicional, es un proceso que implica la inmersión del alimento en un fluido acuoso

caliente como medio de transferencia de calor. En el presente trabajo se hará referencia a este tratamiento trabajando siempre en condiciones de presión atmosférica. En las cocciones realizadas en un medio líquido acuoso, el calor es transmitido al alimento por el líquido que lo rodea.

- Fritura: la fritura es una operación que implica la inmersión y cocción de los alimentos en aceite caliente. El proceso de fritura implica transferencia de calor y masa, y su objetivo es combinar los tiempos de cocción cortos con características únicas tales como el color, el sabor, la corteza y la textura. En esencia, la fritura es un proceso de deshidratación en el que la temperatura del aceite (por ejemplo, de 160 a 180 °C) permite la rápida transferencia de calor y un período de cocción. Sin embargo, la temperatura interior del producto frito no se eleva por encima de 100 °C y, como consecuencia, la lixiviación de los componentes solubles en agua de los alimentos es mínima (Saguy et al., 1998; Saguy y Pinthus, 1995). En el proceso de fritura, las características del producto y la calidad del aceite son factores clave que afectan a la absorción de aceite.

4.2. La cocción/fritura en condiciones de vacío continuo (Cook-*vide*)

En la presente tesis, se plantea el estudio de otro tipo de tratamiento térmico que se ha denominado cocción/fritura en condiciones de vacío continuo (cook-*vide*). Este sistema consiste en cocinar el producto en condiciones de presión subatmosférica (vacío) y después envasar y refrigerar el alimento. El plantear este capítulo surge tras analizar las perspectivas de este sistema de cocción. En primer lugar, al trabajar a menor presión se consigue reducir el punto de ebullición del líquido de cocción y del agua de

constitución del producto, lo que permite deshidrataciones y cocciones a menor temperatura con los beneficios que ello representa para las características texturales y nutricionales del producto, pero quizás el fenómeno más interesante que se puede analizar es el de la impregnación del producto con el medio de cocción, en el caso que resulte de interés. Durante el proceso de cocción a vacío, se produce una expansión y liberación del gas retenido en la estructura porosa del alimento, posteriormente tras la ruptura de vacío, se produce una impregnación del alimento con el medio de cocción debido al efecto de compresión del gas residual. Este fenómeno puede presentar algunas ventajas con respecto al de cocción tradicional desde el punto de vista de calidad nutricional y sensorial así como de la vida útil del producto.

En lo referente a los factores de calidad nutricional, se trabaja con bajas temperaturas por lo que el efecto de las mismas sobre la menor alteración de las vitaminas se mantiene, pero presenta como novedad que al estar el producto en contacto con la solución de cocción éste puede enriquecerse (al ser impregnado) con los constituyentes del líquido de cocción (vitaminas, minerales, componentes funcionales, bioconservantes, etc.) que pueden contribuir, mediante la formulación de los líquidos de cocción, a incrementar o reconstituir el valor nutricional de los productos. También desde el punto de vista sensorial el producto puede verse modificado para potenciar o adquirir nuevos sabores y si se desea se pueden introducir algunos elementos que contribuyan a reforzar algunos aspectos como la textura. También contribuye a reducir las oxidaciones al trabajar en condiciones de baja presión de oxígeno o al poder introducir agentes antioxidantes en el producto (tocoferoles, vitamina C). Otra de las aplicaciones que se pretende estudiar es su uso para la introducción de cultivos protectores

(protective cultures, PC), bacteriocinas u otros agentes conservantes para aumentar la vida útil de los productos de la pesca ya que, como se vio anteriormente, este aspecto resulta ser la mayor debilidad de estas tecnologías (Rodgers, 2004).

I.5. NUEVAS HERRAMIENTAS PARA LA CONSERVACIÓN DE PESCADO. BIOCONSERVACIÓN

El empleo de bioconservantes en alimentos implica el uso de agentes naturales con el objetivo de ampliar la vida comercial y minimizar los riesgos microbiológicos de los alimentos. Las bacteriocinas y los cultivos protectores son los bioconservantes más estudiados.

5.1. Aplicación de cultivos bioprotectores

La adición de cultivos productores de bacteriocinas está más extendida en productos fermentados, aunque también pueden ser empleados en alimentos no fermentados, actuando como cultivos protectores. Estos podrían crecer durante el almacenamiento refrigerado y producir bacteriocinas y/o durante condiciones de temperaturas abusivas. En el primer caso, el crecimiento de los cultivos protectores no tendría un impacto negativo sobre las características físicoquímicas y organolépticas del producto, mientras que en el segundo caso, se convertirían en la principal microflora alterante dando lugar a alimentos no aptos para el consumo (Holzapfel et al., 1995).

Los cultivos protectores empleados en la conservación de alimentos son capaces de producir sustancias con carácter antibacteriano cuando se producen temperaturas elevadas durante el almacenamiento. Por ejemplo, *Lactobacillus bavaricus* y *Enterococcus faecium* inhiben *Listeria monocytogenes* en ternera

sous-vide (Winkowski et al., 1993) y *Clostridium botulinum* en pescado sous-vide (Embarek et al., 1994). El mecanismo de acción de los diferentes cultivos protectores puede ser muy diferente. Por ejemplo, *Lactococcus lactis* inhibe *Clostridium botulinum* por producción de bacteriocinas, mientras que *Lactobacillus delbrueckii* de la subespecie *bulgaricus* mediante la generación de peróxido de hidrógeno (estudiado en carne de pollo) (Saleh y Ordal, 1955), por otra parte, el poder antibacteriano de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 es debido a la reducción de pH (estudiado en sopa de guisantes refrigerada) (Skinner et al., 1999). La composición y estructura del alimento puede afectar a la producción de sustancias inhibitoras y su actividad biológica. La mayoría de cultivos protectores son bacterias ácido lácticas procedentes de productos fermentados. El principal problema del empleo de cultivos protectores es la variabilidad del poder inhibitor y la sensibilidad de los microorganismos protectores a los tratamientos térmicos, además de su elevado coste.

5.2. Aplicación de bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados ribosómicamente o proteínas con actividad antimicrobiana producidas por diferentes grupos de bacterias (Jack et al., 1995). Las bacteriocinas pueden adicionarse mediante preparados concentrados o inoculando variedades productoras en condiciones favorables (Schillinger et al., 1996; Stiles, 1996). La nisina es la única bacteriocina de adición exógena reconocida por la legislación española como conservante alimenticio (E-234). La eficacia de las bacteriocinas depende de factores como pH, temperatura, composición, estructura y microflora del alimento (Gálvez et al., 2007). Scott y Taylor (1981), mostraron la sensibilidad a la nisina de diferentes

variedades de *Clostridium botulinum* (56A < 69A < 113B + 213B < Beluga E < Minnesota E), efecto del pH (a pH 6 fue más efectivo que a pH 7 y 8) y la carga de esporas (mayor efecto inhibitor a 10² que a 10³ o 10⁴ ufc/mL). Otras bacteriocinas, como Periocina ACh, son capaces de inhibir *Clostridium botulinum* tipo E pero no tipo A y B, y también *Listeria monocytogenes* en carne de pollo cruda y cocinada (Goff et al., 1996). Farkas et al. (2002), estudiaron el efecto combinado de nisina con tratamiento térmico (90 °C, 10 min) e irradiación gamma (5 KGy) en alimentos sous-vide inoculados con esporas de *Bacillus cereus* observando una reducción notable en el número de supervivientes en 42 días de almacenamiento a temperatura elevada (10 °C).

Como conclusión, la posibilidad de realizar un doble tratamiento térmico, irradiación, adición de lactato, sal y agentes acidificantes afectan a la calidad sensorial, estructural o nutricional de los alimentos o son considerados no naturales por los consumidores. Por otra parte, el envasado en atmósfera modificada y el empleo de altas presiones hidrostáticas no resultan efectivos contra microorganismos formadores de esporas. También, el efecto antimicrobiano de determinadas sustancias naturales depende específicamente del tipo de alimento y su empleo resulta muy limitado. En este sentido, bacteriocinas y cultivos protectores no tienen los inconvenientes mencionados anteriormente, sin embargo, la pérdida del efecto inhibitor y la carencia de aplicaciones prácticas implica la necesidad de nuevas investigaciones que permitan desarrollar estrategias con el fin de mejorar la seguridad de los alimentos.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

El objetivo de la presente tesis doctoral es estudiar la aplicación de diferentes tecnologías para incrementar y diversificar productos procedentes de acuicultura. Concretamente se van a emplear las tecnologías de cocción y fritura a vacío, elaboración de productos reestructurados y biopreservación de dorada (*Sparus aurata*) procedente de acuicultura.

II.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos hacen referencia a cada una de las tecnologías estudiadas y se desarrollan en tres capítulos cuya finalidad es:

1. Estudiar el proceso de fritura y cocción a vacío de filetes de dorada para evaluar aspectos relacionados con su calidad como ganancia de aceite, pérdida de agua, cambios de color, etc., con vistas a definir las condiciones óptimas de procesado del producto.
2. Obtener un producto reestructurado a base de dorada (*Sparus aurata*) mediante la adición de sal (NaCl) y transglutaminasa microbiana (MTGasa) así como analizar el efecto de la adición de diferentes hidrocoloides (konjac glucomanano (KGM), carboximetilcelulosa sódica (CMC) y goma xantana) sobre la matriz proteica del gel con el fin de obtener un producto reestructurado de pescado como "fuente de fibra".

3. Determinar las condiciones de preparación del agente bioconservante (*Lactococcus lactis*), su forma de aplicación y el efecto sobre la vida útil de filetes de dorada.

CAPÍTULO III.
ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE FRITURA Y
COCCIÓN A VACÍO DE FILETES DE DORADA
(Sparus aurata)

III. ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE FRITURA Y COCCIÓN A VACÍO DE FILETES DE DORADA (*Sparus aurata*)

III.1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cocción

1.1.1. Concepto de cocción

El tratamiento por el calor puede ser considerado, sin duda alguna, como uno de los modos más antiguos de procesar las materias primas alimenticias. En el ámbito de la tecnología culinaria, cualquier tipo de tratamiento térmico que se aplique para la elaboración de un plato cocinado recibe el nombre genérico de cocción.

Cocer un alimento significa exponerlo a la acción de un foco de calor, o de unas radiaciones, con el propósito de elevar su temperatura. Como consecuencia de ese calentamiento, el alimento experimenta cambios que pueden ser físicos, químicos, e incluso biológicos, que implican modificaciones relacionadas con su calidad, tanto organoléptica como nutricional. Tales modificaciones pueden resultar favorables, o desfavorables, según el tipo de cocción y las condiciones bajo las que se realice. Por ello, la cocción puede ser considerada como aquella operación capaz de transformar de modo físico y/o químico el aspecto, la textura, la composición y el valor nutritivo de un alimento mediante la acción del calor, con el fin de satisfacer los sentidos de la vista, del gusto y del olfato. En esencia, la cocción es la aplicación de calor que se hace a un alimento con el fin de convertirlo en algo más digerible, apetecible y sanitariamente seguro (Bello, 1998). La etapa de cocinado tiene lugar después de la preparación y el procesado del alimento y el tiempo transcurrido entre una fase y otra debe ser mínimo para

prevenir, tanto el deterioro microbiológico, como el crecimiento de microorganismos patógenos.

La cocción es un proceso por el que se pretende alcanzar, dentro del alimento una temperatura determinada, que sabemos necesaria para conseguir unos determinados efectos culinarios. Para ello, se pueden aplicar diversos sistemas de tratamientos térmicos, cuyas consecuencias deberán ser bien estudiadas, para sopesar, en cada caso, las incidencias sobre diversos tipos de factores, unas veces nutricionales, otras económicos: tiempo de trabajo, calidad del producto final, valor nutritivo del mismo, rendimientos de trabajo, energía del sistema, costo de las instalaciones etc.

1.1.2. Tipos de cocciones

Existen diversos tipos de cocciones que pueden ser clasificadas atendiendo a diversos factores. A continuación se expone una clasificación que toma como criterio el medio utilizado para conseguir la transferencia de calor durante la cocción. Los diferentes tipos de cocción se pueden reunir en cinco grupos:

- **La cocción en medio no líquido:** bajo esta denominación se reúnen diversos tipos de cocción que también pueden ser calificadas como cocciones con calor seco. El alimento se calienta a través de su parte superficial, puesta en contacto con una atmósfera de aire caliente. Sus objetivos son mejorar la palatabilidad del alimento, haciéndolo más tierno, digerible y con unas propiedades sensoriales específicas.
- **La cocción en medio graso:** Estas técnicas de cocción emplean como medio de transferencia de calor para el tratamiento térmico del alimento cuerpos grasos que sean líquidos a la temperatura de

trabajo. Con este método se consigue obtener preparaciones culinarias doradas y crujientes.

- **Cocciones en medio acuoso:** en este caso se emplea un fluido acuoso como medio de transferencia de calor para el tratamiento térmico del alimento. Para ello, el alimento toma contacto con agua, caldo corto, jarabe o, incluso vapor de agua normal o sobrecalentado.

- **Cocciones mixtas:** existen tecnologías de cocción que podrían ser catalogadas como cocciones mixtas, porque en ellas el calor se transmite al alimento a través de un medio, que puede contener tanto agua como grasa, que pueden proceder de un líquido añadido, o bien aportadas por el propio alimento o de la guarnición que le acompañe.

- **Cocciones especiales:** todos los métodos de cocción anteriormente mencionados son procesos que se conocen y aplican desde la más remota antigüedad en la culinaria popular primero y en la empresarial después. Todo lo más que se les puede señalar como novedad se reduce a las mejoras de maquinarias e instalaciones para ser llevados a cabo con garantías y eficacia. En el transcurso de estos últimos años, las presiones ejercidas por el consumidor, que espera encontrar en los platos cocinados las propiedades sensoriales específicas de las materias primas, ha desembocado en una clara evolución de las tecnologías de cocción. De todos ellos, se pueden destacar dos: la cocción con microondas y la cocción a vacío (Bello, 1998).

1.1.3. Efecto del cocinado sobre los tejidos animales

El cocinado de alimentos implica una serie de cambios vitales, entre ellos la simplificación molecular. Este fenómeno consiste en la ruptura, por el efecto del calor, de los complejos orgánicos de

mayor tamaño que componen los alimentos, haciéndolos aptos para el consumo humano.

Cuando se emplean temperaturas altas de cocinado, próximas a 200 °C, se produce la explosión de las membranas de los adipocitos, liberando al exterior la grasa que contienen. Aunque, la carne y el pescado sufren una considerable pérdida de peso durante el cocinado, principalmente en forma de agua tisular, el tejido adiposo no experimenta prácticamente pérdida alguna.

La transformación más importante que el calentamiento provoca en la carne muscular es debido a la coagulación de las proteínas, afectando a la textura y al color. Durante el cocinado, las proteínas son desnaturalizadas por la acción de la temperatura (Rowe, 1989) y posteriormente se producen interacciones proteína-proteína que retienen el agua en su interior. Este fenómeno da lugar a la formación de un gel de proteínas sarcoplásmicas y la contracción y solubilización del tejido conectivo, causante de la terneza y jugosidad característica de la carne cocinada.

Como consecuencia de esto, la carne pierde transparencia y adquiere un aspecto claro donde predominan los tonos grisáceos. El aumento de temperatura durante el cocinado afecta a la estructura de las proteínas de diferente forma dependiendo de la temperatura alcanzada. En primer lugar, entre 54-58 °C se producen cambios en la estructura de la miosina (Martens y Vold, 1976; Wright et al., 1977), entre 65-67 °C se ve afectada la estructura del colágeno (Martens y Vold, 1976; Stabursvik y Martens, 1980) y las proteínas sarcoplásmicas (Wright et al., 1977; Wright y Wilding, 1984) y por último, temperaturas de 80-83 °C modifican la estructura de la actina (Wright et al., 1977).

Las proteínas sarcoplásmicas tienen un papel muy importante durante el cocinado y afectan directamente a la textura de la carne

cocinada (Davey y Gilbert, 1974; Hamm, 1977; Tornberg, 2005). La agregación de este tipo de proteínas se produce en el intervalo de temperaturas comprendido entre 40 y 60 °C (Hamm, 1997), aunque en ocasiones se puede extender hasta los 90 °C (Davey y Gilbert, 1974).

Otro aspecto a tener en cuenta, es el efecto que tienen muchas enzimas sobre la textura de la carne, consiguiendo un ablandamiento de la misma cuando se emplean temperaturas bajas y tiempos largos (velocidades de 0,1 °C/min). Por ejemplo, las colagenasas pueden permanecer activas hasta temperaturas de cocción de 60 °C, sin embargo, pueden ser inactivadas cuando el calentamiento es rápido y se emplean temperaturas de 70-80 °C (Laakkonen et al., 1972). Como resultado de la desnaturalización de las proteínas miofibrilares se produce la formación de un gel, causado principalmente por la desnaturalización de la miosina (Hermansson y Langton, 1988). La molécula de miosina está formada por dos cadenas enrolladas entre sí (cola) de una masa molecular aproximada de 500 kDa, formando una fibrilla de 1,5 µm de longitud. Uno de sus extremos está constituido por una parte más voluminosa (cabeza) por donde interacciona con la molécula de actina. La formación del gel se produce en dos etapas dependiendo de la temperatura. La primera ocurre entre 30 y 50 °C e implica la agregación de las cabezas globulares de la miosina. La segunda, a temperaturas superiores a 50-60 °C, implica cambios en la estructura helicoidal de la cola de miosina, dando lugar a la formación de una red por interacciones entre los grupos hidrofóbicos. El colágeno en estado natural es opaco e insoluble en agua, sin embargo, durante el cocción de la carne y el pescado, parte se solubiliza y da lugar a gelatina, de aspecto más transparente. El calentamiento del colágeno produce una

desnaturalización (53-63 °C) (Martens et al., 1982), cuya primera consecuencia es un acortamiento de las fibras. En la primera fase del cocinado, cuando la temperatura no es excesivamente alta (40-60 °C según Hostetler y Landman, 1968; Bendall y Restall, 1983; Offer et al., 1984) se produce un primer acortamiento debido a la disociación de las fibrillas y la dislocación de las hélices, obteniéndose las cadenas de proteínas individuales, aunque conservan su estructura helicoidal. Si el calentamiento continúa y la temperatura asciende a 60-70 °C (Mohr y Bendall, 1969) se produce la pérdida de la estructura helicoidal y se obtiene una estructura orientada al azar en la que todas las cadenas interactúan dando lugar a lo que se denomina gelatina. La temperatura de desnaturalización del colágeno depende del contenido en prolina e hidroxiprolina. Cuanto mayor es el contenido, mayor es la temperatura que se requiere para su gelatinización. En este sentido, existe una gran diferencia en el contenido de prolina y la temperatura de desnaturalización del colágeno procedente de animales de sangre caliente y peces, siendo bastante baja en estos últimos, llegando incluso a menos de 20 °C en algunos peces de agua fría. Además de las citadas transformaciones se pueden producir otras específicas que dependen del sistema de calentamiento utilizado y de las temperaturas aplicadas. Cuando se realiza un calentamiento seco a temperaturas superiores a 150 °C se producen unas sustancias denominadas melanoidinas, que presentan un color marrón oscuro y contienen componentes característicos del sabor. La formación de estas sustancias está relacionada con la reacción de Maillard y consiste en reacciones de los aminoácidos y péptidos con determinados hidratos de carbono para dar lugar a nuevos compuestos.

1.1.4. Efecto del cocinado sobre la microflora

Al mismo tiempo que el cocinado debe conseguir que la carne y el pescado tengan una textura tierna y jugosa, no hay que olvidar el principal objetivo que es proporcionar alimentos seguros y con una extensa vida comercial. Las temperaturas necesarias para conseguir una textura adecuada pueden no ser capaces de asegurar la conservación de los platos cocinados durante largos periodos de almacenamiento. Por ello, resulta indispensable establecer una relación temperatura/tiempo óptima con el fin de alcanzar un equilibrio entre la seguridad y la calidad sensorial y nutricional de los platos cocinados. La temperatura empleada debe superar los 65 °C con el fin de inactivar células vegetativas y destruir la microflora inicialmente presente en el alimento (*Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus spp.* y otras bacterias potencialmente patógenas no formadoras de esporas).

Al mismo tiempo, debe asegurar 6 reducciones decimales en los recuentos de esporas de la variedad no proteolítica de *Clostridium botulinum* y de los patógenos vegetativos *Listeria*, *Salmonella* y *Escherichia coli* (Schellenkens, 1996). El tratamiento mínimo recomendado para asegurar este hecho es de 90 °C/10 min (Anon, 1992), sin embargo, estos tratamiento a temperaturas superiores a 70 °C pueden destruir vitaminas termolábiles y producir pérdida de jugosidad, afectando a la calidad nutricional y sensorial de los platos cocinados. Por esta razón, resulta muy importante establecer tratamientos equivalentes en relación a la efectividad antimicrobiana, que permitan trabajar a temperaturas cercanas a 70 °C durante periodos más largos.

1.2. Cocción a vacío

La cocción a vacío es un método de cocción que viene siendo utilizado desde hace décadas. Tradicionalmente la cocina a vacío era conocida como cocina "*sous-vide*".

La cocción a vacío o "*sous-vide*" es una técnica de cocción desarrollada en Francia hacia finales de los años setenta y surgida a raíz de los ensayos de un chef de cocina, George Pralus, que intentaba resolver el problema de las pérdidas de peso y de jugo, cuando elaboraba el foie-gras. Tuvo la iniciativa de aplicar el principio culinario del papillote (método clásico de cocinado de alimentos envueltos en papel aceitado para retener mejor aromas y humedad) y, tras varios intentos, consiguió reducir las pérdidas desde el 40% hasta solo un 5% (Bello, 1998). La técnica *sous-vide* consiste en envasar el producto en una bolsa de material plástico con una baja permeabilidad al oxígeno y resistente a altas temperaturas. Uno de los aspectos que caracteriza el uso de esta técnica es el empleo de temperaturas sensiblemente inferiores a las empleadas tradicionalmente. Así, las temperaturas recomendadas para carnes suelen oscilar entre los 58 y los 65 °C, mientras que para algunos pescados el óptimo se encuentra entre los 40 y 50 °C. De hecho, son estas temperaturas tan alejadas de las empleadas en los métodos tradicionales, y no tanto el vacío, los responsables de la textura obtenida en estos productos (Ruíz, 2010).

Por otra parte, la cocción en condiciones de vacío continuo o "*cook-vide*" consiste en cocinar el producto en condiciones de presión subatmosférica (vacío) y después envasar y refrigerar el alimento. A diferencia de la cocción "*sous-vide*" el alimento está en contacto con el medio de cocción y por ende tanto el producto como el medio de cocción se encuentran a una presión inferior a la atmosférica lo que hace que la temperatura de ebullición del agua

de constitución del alimento y la del medio de cocción disminuya. Las propiedades del producto final dependerán por tanto del método de cocción empleado. En la presente tesis doctoral se hablará en todo momento de cocción en condiciones de vacío continuo "cook-vide".

1.3. Fritura

1.3.1. Concepto de fritura

La fritura es un proceso que consiste en la cocción del alimento por inmersión en un aceite o grasa a una temperatura superior a la de ebullición del agua, normalmente entre 150 y 200 °C (Farkas et al., 1996a; Tangduangdee et al., 2003; Kochhar y Gertz, 2004). Es una de las preparaciones culinarias más antiguas y al parecer su uso se remonta al antiguo Egipto, alrededor del 2500 a.C. (Tannahill, 1995). La fritura es un proceso muy extendido tanto en el ámbito culinario como en el industrial. A lo largo de la historia las diferentes conquistas, migraciones e intercambios culturales hicieron que esta técnica culinaria se extendiese por todo el mundo. Los productos obtenidos, muy valorados por sus características únicas de sabor, textura y color (Moreira, 2001; Saguy y Dana, 2003) fueron adaptados por cada cultura a sus usos y costumbres tomando diferentes formas y aplicaciones en cada lugar, excepto en el caso de las "patatas fritas" o "French fries" que es un producto consumido de igual modo en todo el mundo.

En la actualidad, los alimentos fritos gozan de una popularidad cada vez mayor en el mundo y son aceptados por personas de todas las edades. La preparación de estos productos es fácil y rápida y su aspecto y sabor se corresponden con los deseados por el consumidor. Esta situación ha conllevado que la fritura se haya generalizado en los establecimientos de comida rápida ("fast

food”), en la restauración, en la propia industria alimentaria, por ejemplo los llamados “snacks” y también en los hogares, etc. Precisamente, la fritura es el uso principal de los aceites y las grasas en la cocina. En esta forma de procesar los alimentos a altas temperaturas, el medio de transferencia de calor es el aceite el que imparte sabor, apariencia y textura al producto. Para freír un alimento pueden utilizarse aceites, grasas o los denominados shortenings (generalmente aceites vegetales hidrogenados, semisólidos, plásticos). Tradicionalmente los términos aceite y grasa están determinados por el punto de fusión del producto lipídico, aceite cuando el mismo es líquido a la temperatura ambiente y grasa cuando tiene determinado grado de solidez a dicha temperatura.

1.3.2. Tipos de fritura

Cocinar mediante fritura es más eficiente que por medio del calor seco de un horno y más rápido que con el uso de agua hirviendo. Las altas temperaturas que se alcanzan al freír, logran una penetración más rápida y uniforme del calor hacia el interior del alimento que se está cocinando. Existen distintos tipos de fritura que se pueden clasificar en dos grandes grupos atendiendo a la proporción de aceite empleada:

- **Fritura por inmersión** o simplemente fritura (en inglés “deep-fat frying” o “immersion frying”): en ella el alimento está sumergido completamente (o en su mayor parte siempre que su flotabilidad lo permita) en el medio de fritura. Es la forma predominante de fritura a escala industrial (Farkas et al., 1996a). Las principales ventajas y desventajas de un proceso típico de fritura se muestran en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Principales ventajas y desventajas de la fritura frente a otros tipos de cocción (Adaptado de Mehta y Swinburn, 2001).

Ventajas	Desventajas
Rápida velocidad de cocinado	Alto contenido en grasa de los productos
Eficiencia energética y económica del proceso	Generación de residuos
Consistencia de los productos cocinados	Generación de componentes peligrosos para la salud (P.ej. Acriamida o Hidroximetilfurfural)
Mejora del color	El uso prolongado del aceite lo degrada produciendo:
Mejora del flavor	- Disminución de las cualidades organolépticas
Textura crujiente	Colores demasiado oscuros
Reducción de la pérdida de micronutrientes del producto	Cambios en el flavor
	Cambios en la textura
	- Incrementos en el tiempo de cocinado
	- Cambios físicos en la grasa empleada
	Reducción del punto de humo
	Aumento de la espuma
	Incremento de la viscosidad
	- Cambios químicos en la grasa empleada
	Incremento de los efectos termooxidativos debido a los radicales libres

- **Fritura en sartén** o plancha (en inglés "pan-frying"): en ella el medio de fritura constituye únicamente una capa más o menos uniforme que separa al alimento de la sartén o instrumento de cocción análogo. Su uso se limita prácticamente al ámbito doméstico, aunque la peculiaridad de sus mecanismos de transferencia de calor y materia y los problemas oxidativos derivados de su uso hace que también sea una interesante materia

de estudio (Baik y Mittal, 2006; Soupas et al., 2007). Una ligera modificación en este tipo de fritura, de uso creciente en restauración, es la "fritura agitada" (del inglés "stir frying"), basada en la cocina asiática en la que la sartén o "wok" está en constante agitación para favorecer una cocción rápida (Adler-Nissen, 2007).

En cualquier caso, una buena fritura reúne unas condiciones de tiempo, temperatura, pérdida de agua y ganancia de grasa tal que, el producto final tiene un aroma, sabor y textura característicos a la vez que se destruyen bacterias, toxinas y ciertos enzimas dado su carácter térmico (Varela, 1994; Fellows, 1998; Pokorny, 1999). Además, en comparación con otros métodos de cocción, como el hervido, conlleva menores pérdidas de vitaminas y micronutrientes (Bognar, 1998; Saguy y Dana, 2003; Somsu et al., 2008).

Durante el proceso de fritura tienen lugar multitud de cambios físicos, químicos y nutricionales en el alimento. Estos cambios dependen, entre otros factores, de la humedad y del tipo de alimento, de la calidad de aceite utilizado y de la temperatura del proceso, así como del tiempo de residencia del producto en el aceite caliente (Dobarganes et al., 2000; Moreira, 2001).

1.3.3. Caracterización del proceso de fritura

Durante el proceso de fritura se presentan diversos cambios físicos y bioquímicos, por lo que los estudios realizados sobre esta operación abarcan aspectos biológicos (Gamble y Rice, 1987; Swackhamer, 1995; Paul y Mittal, 1997), químicos (Fritsch, 1981; Sinram y Hartman, 1989; Carr, 1991; Demetriades et al., 1995; Paul y Mittal, 1997), y físicos (Blumenthal, 1991; Saguy y Pinthus, 1995; Ufheil y Escher, 1996).

1.3.3.1. Transferencia de calor y de materia

Desde el punto de vista ingenieril, la transferencia simultánea de calor y de masa representa un reto por sus características particulares, el calor convectivo es transferido desde el aceite que rodea al alimento hacia la superficie formándose la costra que proporciona el color y sabor típico de los productos fritos. Mientras que la transferencia de masa se caracteriza por la penetración del aceite hacia el interior del alimento y por la salida del vapor de agua proveniente del alimento. Paralelamente se desarrollan notables cambios texturales, el alimento puede reducir o aumentar su volumen como consecuencia de la pérdida de agua y/o ganancia de aceite y también existen cambios estructurales de los componentes alimenticios.

En base a las diferencias que se presentan durante el proceso de fritura, se reconocen cuatro etapas: calentamiento inicial, ebullición superficial, periodo de velocidad decreciente y punto final de burbuja (Singh, 1995; Farkas et al., 1996a).

El calentamiento inicial que dura pocos segundos, se caracteriza por el calentamiento del alimento hasta llegar a la temperatura de ebullición del agua, siendo la convección natural el mecanismo de calentamiento dominante y el calor sensible el requerido para elevar la temperatura del alimento. En esta etapa no hay evaporación superficial del agua.

La ebullición superficial es iniciada con la salida de vapor y formación intensa de burbujas, el fenómeno de transferencia de calor por convección natural es substituido en esta etapa por el de convección "forzada" debido a la intensa turbulencia desarrollada en el aceite, el coeficiente convectivo de transferencia de calor se incrementa notablemente. El alimento empieza a mostrar la formación de una costra superficial y en general este periodo es

análogo al proceso de concentración de alimentos por evaporación, ya que es precisamente el cambio de estado del agua a vapor el fenómeno que gobierna esta etapa.

El periodo de velocidad decreciente es el más largo, se caracteriza por los fenómenos físicos de evaporación superficial y de calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición del centro del alimento. Por otro lado, se desarrollan los cambios bioquímicos de gelatinización del almidón, desnaturalización de las proteínas y cocción en el interior del alimento, la costra continúa su formación y al representar una barrera adicional, contribuye a un detrimento de la transferencia de calor. Por las semejanzas que presenta, esta etapa es análoga al proceso de secado en su periodo de eliminación de humedad, y análogo a la congelación por el avance del frente de la costra.

Finalmente, se presenta la etapa del punto final de burbuja para periodos prolongados de fritura, se visualiza por la ausencia de burbujeo y formación definitiva de la costra. Aunque es conceptualizada como la última etapa de esta operación, la verdad es que pocos alimentos llegan hasta ese punto debido a que el producto obtenido desarrolla una textura muy dura hay una sobrecocción y el sabor es muy graso y por tanto poco atractivo para el consumidor.

La fritura, tal y como se ha descrito anteriormente, es un proceso de cocción de alimentos resultante de la inmersión de éstos en aceite o grasa que se encuentra a una temperatura superior al punto de ebullición del agua, entre 150-200 °C. Durante dicho proceso se generan procesos de transferencia de calor y de masa.

La transferencia de materia durante la fritura está caracterizada, principalmente, por el movimiento del agua en forma

de vapor, del alimento al aceite, y por el movimiento del aceite al alimento. Esta transferencia de materia es impulsada por la transferencia de calor del aceite al alimento, por ello es inevitable describir ambos fenómenos de transferencia de forma conjunta.

Como resultado de los fenómenos de transferencia que tienen lugar en la fritura, el producto final presenta dos regiones características: la costra o superficie deshidratada, en la cual se producen los principales cambios, y el interior del alimento donde la temperatura no sobrepasa la temperatura de ebullición del agua a esa presión (Dobarganes et al., 2000; Singh, 1995).

Durante la fritura, la transferencia de calor se realiza por dos mecanismos universalmente conocidos: conducción y convección. La transferencia de calor por conducción, bajo condiciones no estacionarias, tiene lugar en el interior del alimento. La magnitud de esta transferencia está influenciada por las propiedades térmicas del alimento y éstas pueden cambiar durante el proceso. La convección ocurre entre el aceite caliente y la superficie del alimento (Singh, 1995). El fenómeno de conducción inestable ocurre en el alimento sólido y es influenciado fundamentalmente por las propiedades físicas del producto, que a su vez están cambiando sus propiedades a lo largo de todo el proceso. El calentamiento inicial del alimento alcanza temperaturas ligeramente superiores al punto de ebullición del agua, ya que aunque el agua es el componente mayoritario, la presencia de solutos causa un efecto coligativo ocasionando un pequeño incremento de dicha temperatura. Posteriormente al inicio del burbujeo, el alimento incrementa su temperatura alcanzando paulatinamente temperaturas superiores, cercanas a la temperatura del medio.

Por otro lado, el fenómeno convectivo se desarrolla entre el aceite y la superficie del alimento, la presencia de burbujas de vapor afecta a este fenómeno en sentidos opuestos: la constante generación de vapor contribuye a la turbulencia del medio que favorece la transferencia de calor y la propia naturaleza de las burbujas que forman una denominada "espuma de aceite" disminuye significativamente la velocidad de transferencia. Ciertamente, la cantidad de vapor eliminado decrece con el avance del proceso debido a que la cantidad de agua dentro del alimento está disminuyendo.

Según Farkas et al. (1996a y b), la fritura de alimentos se puede visualizar como una forma compleja del problema de Stefan, el cual se caracteriza por la presencia de una interfase (costra) que divide dos regiones cuyas propiedades físicas son diferentes. Y la complejidad del proceso de fritura en comparación con la congelación es mayor porque existe transferencia simultánea de calor y de masa en dos regiones distintas y a una temperatura superior al punto de ebullición del agua.

En lo que se refiere a la transferencia de masa, se puede apreciar también dos mecanismos: una evaporación continua del vapor de agua semejante al proceso de concentración de alimentos líquidos, en el que la velocidad de transferencia de calor es el fenómeno dominante; y otro de evaporación decreciente en el que la difusión de agua del interior del alimento hacia la superficie es el fenómeno físico dominante. Este segundo mecanismo es identificado como tercer periodo del proceso de fritura y presenta similitud con aquel que se desarrolla en la deshidratación de alimentos, es mucho más largo en comparación con el de evaporación.

1.3.3.2. Variables del proceso de fritura

En el proceso de fritura intervienen numerosas variables tales como pretratamientos aplicados al alimento, el tipo de alimento, la calidad, el tipo y composición del aceite empleado, la temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso, la duración del mismo, la humedad y composición del alimento, la forma y porosidad del producto, por mencionar algunas. Debido a la complejidad del proceso de fritura y a la gran cantidad de variables que están involucradas, diversos investigadores han realizado estudios orientados a cubrir el análisis e influencia de diferentes variables.

La cinética de absorción de aceite por parte del producto es más compleja, porque mientras el vapor esté presente en los poros del alimento, impedirá el paso del aceite al interior del mismo, y sólo cuando disminuya la salida del vapor el aceite podrá transferirse al alimento, si bien dependerá de las propiedades de permeabilidad de la costra formada en la superficie del alimento. Así, cuando el alimento es retirado del aceite caliente y empieza el enfriamiento, la presión del vapor disminuye y produce un efecto de succión, ayudando a que el aceite depositado en la superficie del alimento pueda atravesar la costra (Vitrac et al., 2000). Moreira et al. (1995) observaron que mientras transcurre el tiempo de fritura aumenta la cantidad de aceite que se encuentra en la superficie del alimento (en su caso en tortillas de maíz) y que el contenido final de aceite en el alimento se incrementa considerablemente en el periodo de enfriamiento y está regido por fuerzas capilares. Los principales parámetros que influyen en la pérdida de agua y la absorción de aceite son la temperatura y el tiempo de fritura (Dobarganes et al., 2000; Moreira, 2001). Otros parámetros a considerar son la forma del alimento y la relación entre el tamaño del producto y la superficie expuesta al medio circundante. Así,

Baumann y Escher (1995) exponen que al incrementar la temperatura la velocidad de deshidratación aumenta, reduciéndose el tiempo de fritura; en cambio, al aumentar el espesor del producto se incrementa el tiempo. Para Krokida et al. (2000a) el transporte de agua y aceite es más intenso cuanto mayor es la temperatura del aceite y menor el espesor de la muestra. Por ejemplo, si el alimento se procesa en láminas, aquellas más gruesas presentan una menor área específica, reduciéndose el área relativa disponible para perder el agua; también el camino interno que tiene que recorrer el agua es más largo y se requiere más calor para evaporar dicha agua, además la corteza que se forma impide que el agua salga con facilidad (Costa y Oliveira, 1999).

Gamble et al. (1987) observaron que el contenido de aceite no estaba directamente relacionado con la temperatura de fritura, sino con la humedad residual del alimento. Esto lo corroboran Moreira et al. (1995) que demuestran que la mayor retención de aceite en el producto tiene lugar cuando la mayor cantidad de agua ha salido del mismo. Además, la pérdida de agua no es uniforme en el producto, primero ocurre en la superficie y, según transcurre el calentamiento, gradualmente va afectando al interior del mismo. Por ello, la absorción de aceite tiene lugar en mayor grado a nivel superficial (Costa y Oliveira, 1999). Yamsaengsung y Moreira (2002a) indican que cuando la temperatura del aceite es alta, el secado es más rápido, además la temperatura y presión del producto aumentan rápidamente. La absorción de aceite empieza a tener lugar cuando la temperatura del producto se incrementa y empieza a formarse la costra. Si el espesor del producto es más grueso, disminuye el contenido de aceite en el interior del mismo. El contenido de aceite se ve afectado también por la temperatura a la que se enfría el producto, si es a una temperatura cercana a la

del producto no absorberá mucha cantidad de aceite. Finalmente, y en lo referente a la influencia del tipo de aceite sobre la velocidad de absorción del mismo, de acuerdo con Dobarganes et al. (2000) la absorción de aceite depende en mayor grado de la calidad del aceite que del tipo de aceite utilizado en el proceso.

1.3.4. Cambios en la estructura y color de los productos fritos

Todos los cambios físico-químicos repercuten en la calidad final del producto. Es interesante repasar, aunque sea someramente, cuáles son los principales aspectos que se suelen valorar en la caracterización de un alimento frito, aunque muchas veces no tiene la misma importancia un parámetro para el consumidor final que para el fabricante de los productos. Los parámetros de calidad más importantes son los siguientes (Moreira et al., 1999): contenido final en grasa y agua, cambio de tamaño y forma, color, flavor, textura, rendimiento del producto final, características nutricionales y estabilidad en el almacenamiento.

1.3.4.1. Cambios en el tamaño y forma

Una de las primeras modificaciones que se pueden apreciar tras freír un producto es que cambia de dimensiones. La eliminación brusca de agua en forma de vapor altera la estructura porosa del alimento que puede sufrir un hinchado ("puffing" en la literatura inglesa) o una retracción ("shrinkage" en la literatura inglesa) (Yamsaengsung y Moreira, 2002b). Estos cambios afectan a las propiedades físicas intrínsecas del producto como la densidad o la porosidad (Wang y Brennan, 1995). En algunos casos se produce un hinchado del producto como consecuencia de la acumulación de vapor interno que no es evacuado lo suficientemente rápido a

través de la corteza. Esto se puede observar en productos finos con capacidad de acumular vapor en su interior y con la elasticidad suficiente, generalmente "chips" de origen vegetal como las rodajas de patata o en derivados como las tortitas de maíz. Kawas y Moreira (2001) encontraron que en un minuto de fritura a 190 °C, las tortitas de maíz podían incrementar su volumen hasta un 100%. Aunque la formación de vapor es el principal factor que influye en este hinchado, se han encontrado otros factores que pueden ser importantes en casos concretos como, por ejemplo, la incorporación de aire o la reacción de aditivos específicos como levaduras en la fritura de masas fritas tipo "donut" (Vélez-Ruíz y Sosa-Morales, 2003). Sin embargo, lo más habitual es que se produzca una retracción o disminución de volumen, sobre todo en la fritura de productos de origen animal o vegetal cuando son fritos en forma de bastones o láminas gruesas. La rápida eliminación de agua disminuye el tamaño del producto en los primeros instantes de la fritura hasta que se genera una corteza lo suficientemente gruesa y firme para mantener la forma pese a que se siga perdiendo agua (Krokida et al., 2000b; Taiwo y Baik, 2007). La formación de esta estructura está relacionada con la velocidad de pérdida de agua, lo que hace que en la fritura a mayor temperatura el volumen final sea menor al haberse eliminado el agua rápidamente. No obstante, en algunos casos se ha comprobado que las diferencias de volumen final son independientes de la temperatura, e incluso se han llegado a observar ligeros incrementos de volumen en los periodos de tiempos finales como consecuencia de la mayor ganancia de grasa o de la formación de bolsas de vapor, de manera análoga a lo explicado para el hinchamiento (Costa et al., 2001). En el caso de productos en los que no se crea una corteza tan gruesa, la pérdida de volumen es

lineal durante todo el proceso. Esto se puede observar por ejemplo en la fritura de productos altamente proteicos como el tofu (Baik y Mittal, 2003).

1.3.4.2. Cambios en la textura

Los principales cambios que afectan a la textura final del producto frito son la pérdida de agua, las posibles reacciones térmicas de degradación (desnaturalización de proteínas, gelificación del almidón) y sobretodo la formación de una capa dura externa. La velocidad y efecto sobre la textura global que producen estas modificaciones son muy distintos, teniendo en ocasiones consecuencias opuestas. Así por ejemplo, Pedreschi et al. (2001) desarrollaron y aplicaron con éxito un modelo que explicaba la evolución en la textura de patatas fritas (Pedreschi y Moyano, 2005; Moyano et al., 2007). El modelo considera que los cambios en la textura obedecen a dos procesos en serie, por un lado el ablandamiento global del producto y por otro el endurecimiento, consecuencia directa de la formación de una corteza. En los primeros momentos controla el primer proceso por lo que la textura global, medida como fuerza de penetración, tiende a disminuir. Conforme la costra externa se va haciendo más gruesa se invierte la tendencia. La temperatura acelera los dos procesos aunque no influye en la textura final del producto.

1.3.4.3. Cambios en el color

El color es otro de los atributos fundamentales a la hora de valorar la calidad global de un producto frito ya que se puede utilizar como medida del final del proceso y es uno de los parámetros usados habitualmente por el consumidor en sus valoraciones, especialmente el color superficial (Pedreschi et al.,

2005a; Hindra y Baik, 2006). Además, está relacionada más o menos subjetivamente con otros parámetros sensoriales como los sabores y aromas (Clydesdale, 1998). Los principales cambios de color producidos en la fritura de alimentos se deben a la reacción de Maillard y a la caramelización (Baik y Mittal, 2003). La reacción de Maillard puede ocurrir entre azúcares reductores y aminoácidos pero también entre el ácido ascórbico, el ácido dehidroascórbico u otros productos de degradación. Además, estos derivados pueden dar lugar a otros compuestos responsables del color como los polímeros del furfural (Belitz y Grosch, 1997). Adicionalmente, las reacciones entre los productos de oxidación lipídica con aminas y proteínas pueden generar sustancias que contribuyan ligeramente a los cambios de color (Hindra y Baik, 2006). De esta manera, lo que se suele producir es una pérdida del color del producto fresco, que se vuelve más oscuro y, en tratamientos prolongados o a una excesiva temperatura, puede llegar a adquirir tonos marrones o negruzcos (Pedreschi et al., 2007). Estos suelen ser indicativos de que se han empleado tiempos demasiado largos o de que el medio de fritura está muy degradado, por lo que su control es muy importante a nivel industrial. Para la medida instrumental del color se suelen emplear espectrocolorímetros. A partir del espectro de refractancia se obtienen las coordenadas CIELab y las correspondientes diferencias entre dos colores. Como los compuestos producidos en la reacción de Maillard son de tonos oscuros y marrones, la mayoría de trabajos que analizan el color en la fritura registran disminuciones en la coordenada L^* y aumentos en las coordenadas a^* , b^* , así como en la medida del cambio de color absoluto ($\Delta E^*_{a,b}$). Estas tendencias se manifiestan en mayor medida cuando se trabaja a más temperatura aunque la mayoría de productos acaba tendiendo a valores similares. No es rara la

existencia de un periodo inicial de inducción o retraso de duración inversamente proporcional a la temperatura de fritura empleada, en la que los cambios son mínimos, hasta que se empiezan a hacer efectivas las reacciones responsables del cambio de color (Özdemir y Devres, 2000; Hindra y Baik, 2006).

Las reacciones de Maillard son una cadena de complejas reacciones químicas que generan muchos compuestos. Además del impacto positivo que suponen estas sustancias en el color final, en los últimos años se ha llamado la atención sobre la toxicidad de algunas de ellas. Así, desde el año 2002, altas concentraciones de acrilamida (AA) han sido detectadas en numerosos alimentos sometidos a altas temperaturas como las alcanzadas en la fritura, en especial aquellos basados en patata o cereales procesados a temperaturas superiores a 100 °C (Mottram et al., 2002; Tareke et al., 2002). La formación de este compuesto carcinogénico está íntimamente relacionada con la reacción de Maillard dependiendo en gran medida de la temperatura y la cantidad de aminoácidos presente (en especial la aspargina). Recientemente también se ha empezado a prestar atención a la formación del hidroximetilfurfural (HMF) durante la fritura. A este compuesto formado a partir de la degradación de los compuestos de Amadori, productos avanzados de la reacción de Maillard, se le han atribuido efectos genotóxicos y mutagénicos en determinadas condiciones (Delgado-Andrade et al., 2008; Durling et al., 2009).

El color instrumental también es una medida importante en la cuantificación de este tipo de compuestos tóxicos. Recientes estudios han encontrado relaciones lineales directas entre los parámetros que miden el color físico (coordenadas CIELab) y la acrilamida (Pedreschi et al., 2005a; Viklund et al., 2007).

1.3.5. Características y degradación del aceite

Los transportes de calor y materia que se han comentado anteriormente tienen su influencia e implicaciones tanto sobre el producto como sobre el medio de fritura. Estas últimas son limitantes para un buen proceso, al condicionar la posterior vida útil del producto así como su calidad sensorial y nutricional (Nawar, 2000), por lo que se tratan más detalladamente en los siguientes apartados.

Los tres agentes principales que influyen en la degradación del aceite para un proceso de fritura convencional son: el agua eliminada del producto, el oxígeno atmosférico y la temperatura. Los principales compuestos formados en esta degradación son: debido al agua se forman ácidos grasos libres, diacilgliceroles y monoacilgliceroles; debido al oxígeno se forman monómeros oxidados, dímeros y polímeros oxidados, volátiles y óxidos de esteroides; debido a la temperatura se forman dímeros y polímeros no polares, monómeros cíclicos e isómeros trans y de posición (Gebhardt, 1996; Gertz et al., 2000; Gertz y Klostermann, 2000; Nawar, 2000; Dobarganes y Velasco, 2002).

1.3.5.1. Efecto del agua

El agua liberada por los productos durante la fritura está implicada directamente en la desesterificación de los triglicéridos, principales componentes de los aceites, liberando los correspondientes mono y diacilgliceroles, glicerina y ácidos grasos libres. Este proceso se acelera conforme aumenta la temperatura de trabajo (O'Brien, 1998) y aunque los productos no constituyen un porcentaje importante, presentan una velocidad de oxidación y reactividad superior a la de los triacilgliceroles de origen, por lo que su generación contribuye de forma significativa a la degradación

global del aceite. Los ácidos grasos libres son además un factor negativo ya que aumentan la acidez y bajan el punto de humo, confiriendo un sabor desagradable a los alimentos y creando riesgo de incendios (Orthofer y Cooper, 1996; Nawar, 2000).

Los mono y diglicérolas formados son agentes polares que facilitan la formación de espuma; esto hace que las burbujas de vapor desprendidas queden retenidas durante más tiempo lo que acaba "autocatalizando" la hidrólisis del resto de triglicéridos (Dana y Saguy, 2006). Además, debido al carácter tensoactivo de estos mono y diacilglicérolas se favorece la adsorción por adhesión del aceite superficial.

No obstante, un exceso de agua también tiene sus aspectos positivos. Dana et al. (2003) comprobaron que inyecciones periódicas de agua podrían tener un efecto positivo en otros aspectos de calidad del aceite. El exceso de agua puede formar una cortina de vapor en la superficie del aceite al competir con el oxígeno disuelto de manera que se reducen significativamente compuestos oxidados volátiles y radicales libres típicos de una fuerte oxidación como el malonaldehído y los dienos conjugados.

1.3.5.2. Efecto del oxígeno

La oxidación de los lípidos está relacionada con el grado de instauración de los ácidos grasos del aceite, en especial con los poliinsaturados. En presencia del aire atmosférico una parte del oxígeno interactúa con el aceite. Dependiendo de esta concentración la correspondiente oxidación transcurre en mayor o menor medida, por lo que la disponibilidad de oxígeno del aire, en combinación con las altas temperaturas empleadas en la fritura, es un factor esencial para este tipo de procesos. También hay otros factores que pueden influir en la oxidación del aceite como pueden

ser las trazas de metales (sobre todo hierro o cobre) o la adición de compuestos antioxidantes al propio aceite (Mehta y Swinburn, 2001).

Un primer tipo de productos derivados de esta degradación son los hidroperóxidos, los compuestos de oxidación primaria más característicos y abundantes (Min, 1998; Farhoosh y Pazhouhanmehr, 2009). Estos productos suelen formarse a través de reacciones autooxidativas en cadena y se descomponen rápidamente, debido a su baja termoestabilidad, en productos volátiles y no volátiles. Estas diferentes fracciones y sus derivados son el origen de numerosos componentes alterantes (Kamal-Eldin et al., 1997; Warner, 1998; Dobarganes, 2007).

Los compuestos no volátiles provenientes de esta oxidación secundaria son productos de gran interés ya que quedan retenidos en el medio de fritura y por lo tanto acaban pasando a los productos fritos llegando posteriormente al consumidor. Además influyen de manera importante en el cambio de numerosas propiedades físicas del aceite como el color, la viscosidad, la constante dieléctrica o la capacidad de formar espuma, de manera que su control puede dar idea del estado de degradación global del medio (Stevenson et al., 1984). Los compuestos volátiles (principalmente aldehídos de cadena corta), aún cuando se encuentren en pequeñas concentraciones, son los principales responsables del olor rancio típico de una fritura con un aceite muy usado y otros sabores extraños del aceite (Reindl y Stan, 1982; Melton et al., 1994; Belitz y Grosch, 1997). Algunos autores hablan también de una oxidación terciaria que comprendería las reacciones de polimerización de las fracciones anteriores (Nawar, 2000).

1.3.5.3. Efecto de la temperatura

Las principales reacciones que inducen el tratamiento térmico intenso característico de la fritura son la ciclación de moléculas de ácidos grasos, las isomerizaciones y las termopolimerizaciones. Dependiendo de la naturaleza del aceite y de las condiciones del proceso, éstas pueden dar lugar a diferentes tipos de compuestos muy importantes tanto por su toxicidad como por los cambios físico-químicos que le confieren (Le-Queré y Sebedio, 1996).

Los monómeros cíclicos constituyen un amplio número de estructuras penta o hexacíclicas, conteniendo frecuentemente un doble enlace. Aunque están presentes en bajos niveles (entre 100 mg y 6600 mg/100 g de ácidos grasos totales) son considerados los compuestos más tóxicos generados durante la fritura al ser rápidamente absorbidos por la mucosa intestinal (Christie y Dobson, 2000; Romero et al., 2006). Los compuestos formados en reacciones de polimerización también son muy abundantes, habiéndose descrito más de cuatrocientos (Paul y Mittal, 1997). A elevadas temperaturas, cuando hay poco oxígeno disponible debido a la gran cantidad de vapor desprendido por el producto, las reacciones de polimerización ocurren más fácilmente que las de oxidación (Gertz et al., 2000) generando este tipo de compuestos que afectan al sabor, flavor y vida útil del producto (Takeoka et al., 1996).

1.3.5.4. Medida de la degradación del aceite

Existen numerosos métodos de análisis para evaluar la degradación del aceite. Estos se pueden basar en la medida de determinados compuestos en particular o en la determinación de la calidad global del aceite en general. Uno de los parámetros contemplado por la legislación como criterio para desechar los

aceites de fritura es el porcentaje total de compuestos polares. Este valor evalúa de forma global la alteración de los triglicéridos ácidos grasos libres, relacionando los compuestos apolares (básicamente los triglicéridos sin alterar) y los compuestos polares que se forman en el aceite usado (componentes con ciertos grupos químicos polares, que son la mayor parte de componentes de alteración: ácidos grasos libres y la mayoría de compuestos formados en la oxidación).

1.3.6. La fritura a vacío

1.3.6.1. Generalidades

La tendencia de los consumidores en los últimos años hacia alimentos bien con bajo contenido de grasa o bien libres de ésta, ha forzado a la industria de los snacks a elaborar productos con estas cualidades pero que a la vez mantengan su sabor y textura característicos (Garayo y Moreira, 2002). De ahí que las investigaciones encaminadas a reducir los niveles de contenido en grasa en los alimentos fritos hayan cobrado fuerza, ya sea modificando las condiciones de proceso, modificando el medio de fritura o aplicando ciertos pretratamientos al alimento como son el escaldado, la inmersión en soluciones azucaradas o la aplicación de coberturas comestibles (García et al., 2002; Mellema, 2003; Pedreschi et al., 2005b; Pedreschi y Moyano, 2005; Rimac et al., 2004). La fritura al vacío destaca entre los procesos estudiados para conseguir dichos objetivos de mejora de la calidad. En esta operación el alimento se procesa a presión subatmosférica en un sistema cerrado, lo que permite disminuir la temperatura de ebullición del agua y, por tanto, la temperatura de fritura (Garayo y Moreira, 2002). De esta forma, el agua contenida en el alimento se elimina rápidamente cuando el aceite alcanza la temperatura de

ebullición del agua (Shyu et al., 2005). La fritura a vacío muestra una serie de ventajas como: reducción del contenido de grasa en el producto frito, preserva el color natural y el flavor, mantiene la calidad del aceite durante más tiempo (Garayo y Moreira, 2002; Shyu et al., 2005; Liu-Ping et al., 2005a). Granda et al. (2004) concluyeron que la fritura a vacío disminuye el contenido en acrilamidas en chips de patata. La temperatura del aceite en este tipo de proceso se suele situar alrededor de 110 °C y la presión alrededor de 3,1 kPa, siendo 24,7 °C la temperatura de ebullición del agua a esta presión (Garayo y Moreira, 2002). La fritura al vacío es una tecnología que no está ampliamente extendida en el mercado y actualmente se dirige a obtener productos tipo snacks de alimentos cuya calidad puede verse afectada por las altas temperaturas, como son frutas y vegetales. Actualmente se encuentran pocos trabajos relacionados con esta técnica ya que las investigaciones en esta área llevan desarrollándose desde hace pocos años, y los trabajos publicados trabajan con matrices vegetales pero no se encuentran trabajos realizados en este área con matrices de origen animal, como puede ser el pescado.

1.3.6.2. El proceso de fritura a vacío

Como se ha dicho anteriormente, el proceso de fritura al vacío es básicamente el mismo que el de la fritura convencional pero en este caso se efectúa en un sistema cerrado, lo que permite reducir la presión hasta niveles considerablemente inferiores a la presión atmosférica.

1.3.6.2.1. Transferencia de agua en la fritura a vacío

En la fritura al vacío, al igual que se vio en la fritura convencional, las curvas de pérdida de humedad son semejantes a

las curvas del clásico perfil de secado. El proceso de secado de alimentos se caracteriza generalmente por tres periodos. El primero es el de calentamiento inicial durante el cual el material absorbe el calor del medio de calentamiento. El producto se calienta hasta la temperatura a la cual el agua presente en el alimento empieza a evaporarse. En la fritura a vacío este periodo inicial es muy rápido, por lo que resulta difícil su cuantificación. Esto se evidencia, por ejemplo, al realizar la fritura a una presión de 3,1 kPa (el punto de ebullición del agua a esta presión es alrededor de 25 °C), ya que si el alimento está a temperatura ambiente (23-24 °C) se precisa aumentar su temperatura unos pocos grados para que el agua empiece a evaporarse. En el segundo periodo, o de velocidad constante, la velocidad de secado viene limitada por el calor transferido del medio de calentamiento al alimento. Este periodo tiene lugar mientras exista agua en la superficie del alimento. En el caso de la fritura a vacío de chips de vegetales, en general no se observa ningún periodo de velocidad constante por la alta velocidad de evaporación del agua superficial (Garayo y Moreira, 2002; Liu-Ping et al., 2005b). Cuando el contenido de agua en la superficie del alimento es bajo, empieza el periodo de velocidad decreciente del secado o tercer periodo. Durante este periodo la velocidad de secado es controlada por un mecanismo de transferencia de la humedad dentro del alimento, descrito frecuentemente como difusión a partir de la ley de Fick. El agua durante este periodo se mantiene en el material por la adsorción multicapa y condensación capilar (Toledo, 1991). En cuanto a la influencia de las condiciones del proceso sobre la humedad del producto, los resultados de los estudios revisados coinciden (Garayo y Moreira, 2002; Liu-Ping et al., 2005b; Shyu et al., 2005; Shyu y Hwang, 2001) en que a una determinada temperatura cuanto mayor es el grado de vacío, la

velocidad de evaporación aumenta y, por tanto, mayor es la velocidad de secado. Respecto al efecto de la temperatura, a una determinada presión, cuando la temperatura aumenta, aumenta la velocidad de secado y por tanto disminuye el tiempo de fritura.

1.3.6.2.2. Transferencia de aceite en la fritura a vacío

Para describir los mecanismos de transferencia de aceite en la fritura al vacío Garayo y Moreira (2002) dividen el proceso en tres etapas: fritura, presurización y enfriamiento. Al inicio del periodo de la fritura la temperatura de ebullición del agua está muy por debajo de los 100 °C, por ejemplo a una presión de vacío de 8 kPa el agua tiene una temperatura de ebullición de 41,5 °C, por eso el agua se evaporará más fácilmente; la salida del vapor de agua y la baja diferencia de presión entre el interior de los poros del alimento y el aceite no permite que éste penetre en el mismo. Una vez terminada la fritura, el alimento se retira del aceite caliente y empieza a introducirse aire en el equipo (que permanece aún cerrado) para recuperar la presión atmosférica. En esta etapa, conocida como presurización, la presión en los poros se incrementa rápidamente hasta los niveles de presión atmosférica, de forma que el aire y el aceite de la superficie del alimento van llenando los espacios vacíos de los poros hasta que la presión se recupera. Sin embargo, a baja presión el aire se introduce más rápidamente que el aceite dentro del espacio del poro, debido a que la densidad del aire disminuye con la presión más que la del aceite, y obstruye el paso de este último hacia el interior del producto. La tercera etapa empieza cuando el alimento es retirado del equipo de fritura y se conoce como enfriamiento. En esta etapa, parte del aceite que se encuentra en la superficie continúa penetrando en los poros del alimento, del mismo modo que en la fritura a presión atmosférica.

Puesto que con este proceso se adhiere menos aceite a la superficie del producto, existe menos aceite disponible para penetrar durante esta etapa. En cuanto al efecto de la temperatura en la absorción de aceite por el producto, Garayo y Moreira (2002) observaron que durante los 150 s iniciales el contenido de aceite de los chips de patata aumentaba con el tiempo a todas las temperaturas ensayadas, siendo mayor cuanto mayor era la temperatura. No obstante, el contenido final de aceite no se ve afectado significativamente por la temperatura del aceite. Por ello sugieren que el contenido final de aceite, más que de la temperatura depende del tiempo de fritura, ya que cuando disminuye la temperatura del aceite y se pretende conseguir un mismo nivel de humedad final se debe aumentar el tiempo de fritura. Por el contrario, Shyu y Hwang (2001) y Shyu et al. (2005) observaron en chips de manzana y zanahoria respectivamente, que el contenido de aceite aumentaba con la temperatura y tiempo de fritura. Si bien, también señalan que el contenido en aceite parece estar relacionado con el contenido de humedad final.

En cuanto al efecto de la presión, Garayo y Moreira (2002) observaron que cuando aumenta el nivel de vacío aumenta la velocidad de pérdida de agua y también la absorción de aceite, pero al final del proceso, para una misma humedad final, no encontraron diferencias significativas en el contenido de aceite. Esto parece indicar que el contenido de aceite es función del contenido final de humedad en el producto y de la cantidad de aceite que está adherida a la superficie.

1.3.6.2.3. Transferencia de calor

En el proceso de fritura al vacío, por el hecho de estar a presiones menores a la atmosférica, el punto de ebullición del agua

es menor que a presión atmosférica (Garayo y Moreira, 2002), en consecuencia la temperatura del medio para conseguir evaporar el agua es menor, por lo tanto las temperaturas del aceite serán más bajas (Yamsaengsung y Rungsee, 2006). Por consistir básicamente en el mismo proceso que la fritura a presión atmosférica, el mecanismo de transferencia de calor, es similar al descrito en el apartado 1.3.3.1. del presente capítulo.

III.2. OBJETIVO

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este capítulo es el estudio de la fritura y la cocción en condiciones de vacío continuo de filetes de dorada (*Sparus aurata*) como alternativa a la fritura y la cocción tradicional.

Para llevar a cabo dicho objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos para cada uno de los tratamientos estudiados.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estudio de la fritura en condiciones de vacío continuo

1. Analizar los cambios en los parámetros físico-químicos: pérdida de peso, pérdida de agua, ganancia de grasa, variaciones de color y variaciones de tamaño, para la fritura en condiciones de vacío continuo y a presión atmosférica.
2. Determinación de las cinéticas de ganancia de grasa, variación de peso, pérdida de humedad y variación de tamaño. Estudio de la influencia de la temperatura y el tiempo en dichas cinéticas.
3. Analizar las interacciones entre las variables de proceso tiempo-temperatura sobre las características físico-químicas del producto en la fritura a vacío.

4. Establecer posibles recomendaciones sobre la aplicabilidad de dicha tecnología en el desarrollo de platos preparados a partir de pescado.

2.2.2. Estudio de la cocción en condiciones de vacío continuo

1. Analizar los cambios en los parámetros físico-químicos: pérdida de peso, pérdida de agua, cambios en el contenido proteico y graso, perfil lipídico, variaciones de tamaño y variaciones de color, para la cocción en condiciones de vacío continuo y a presión atmosférica.

2. Determinación de las cinéticas de variación de peso y pérdida de humedad. Estudio de la influencia de la temperatura y el tiempo en dichas cinéticas.

3. Establecer posibles recomendaciones sobre la aplicabilidad de dicha tecnología en el desarrollo de platos preparados a partir de pescado.

III.3. PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo dichos objetivos se diseñó el siguiente plan de trabajo con las actividades descritas a continuación:

1. Revisión bibliográfica de los siguientes temas: fritura a vacío, cocción a vacío, efecto de la fritura a vacío sobre las propiedades de los alimentos, modelos para evaluar la pérdida de agua y ganancia de aceite durante la fritura a vacío.

2. Estudio del proceso de fritura a vacío en filetes de dorada (*Sparus aurata*).

2.1. Obtención de filetes de dorada mediante fritura a vacío a 90, 100, 110 °C y a presión atmosférica a 165 °C durante tiempos comprendidos entre uno y diez minutos.

- 2.2. Estudio del efecto de la fritura a vacío sobre la variación de peso, pérdida de agua, ganancia de aceite, encogimiento y cambios de color en filetes de dorada
- 2.3. Evaluación del proceso de fritura a vacío mediante modelos cinéticos para la pérdida de agua, ganancia de aceite y encogimiento.
- 2.4. Identificación de posibles condiciones óptimas para la obtención de filetes de dorada mediante fritura a vacío mediante análisis factorial de los resultados obtenidos.
3. Estudio del proceso de cocción a vacío de filetes de dorada (*Sparus aurata*).
 - 3.1. Obtención de filetes de dorada cocidos a vacío a 70, 80 y 90 °C y a presión atmosférica a 100 °C durante tiempos comprendidos entre tres y 20 minutos.
 - 3.2. Estudio del efecto de la cocción a vacío sobre la variación de peso, pérdida de agua, encogimiento, cambios de color, variación del contenido proteico y graso y perfil lipídico.
 - 3.3. Evaluación del proceso de fritura a vacío mediante modelos cinéticos para la pérdida de agua.
 - 3.4. Identificación de posibles condiciones óptimas para la obtención de filetes de dorada mediante cocción a vacío.

III.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materia prima y preparación de la muestra

En este estudio se emplearon doradas (*Sparus aurata*) procedentes de piscifactoría, de un peso medio de 450 g. La selección de la materia prima se realizó a partir de las jaulas propias del Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas (GIRA) de la Universidad Politécnica de Valencia instaladas en las piscifactorías procedentes de la empresa colaboradora Gramasa

S.A., situada en Gandía, según los criterios de selección: mismo lote y mismo peso (ración de consumo). Una vez en el laboratorio, las doradas fueron evisceradas, limpiadas y fileteadas. Los filetes se mantuvieron en refrigeración (envasados a vacío) para su posterior utilización (máximo 24 h).

4.2. Aceite

Como medio de fritura se utilizó aceite de girasol (Koipe, España). Se conservó envasado en su botella original, en lugar seco y oscuro previamente a su utilización. Tras su uso, todo el aceite se llevó a un gestor municipal de residuos.

4.3. Determinaciones analíticas

4.3.1. Variación de peso

Los diferentes ensayos de variación de peso se realizaron con una balanza Mettler Toledo modelo PB 303-S (Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland) con una sensibilidad de $\pm 0,02$ g. Las muestras fueron pesadas antes (P_0) y después (P_f) de ser sometidas a cada tratamiento térmico para evaluar la variación de peso experimentada por las mismas (ecuación III.1). Se analizaron 3 muestras por ensayo.

$$\% \Delta M = \frac{(P_0 - P_f)}{P_0} \cdot 100 \quad \text{ecuación III.1}$$

donde:

P_0 = peso del filete antes del tratamiento térmico (g)

P_f = peso del filete después del tratamiento térmico (g)

4.3.2. Determinación de la evolución de la temperatura

Para determinar la evolución de la temperatura en el centro de los filetes se empleó una sonda de punción Testo 925 (Testo GmbH y Co., Lenzkirch, Germany). La temperatura se midió antes y después de cada tratamiento térmico para evaluar la variación de temperatura experimentada en el centro de cada filete.

4.3.3. Humedad

La determinación de la humedad se realizó mediante el método de la AOAC 950.46 (1997). Este análisis se efectúa por método gravimétrico a través de la pérdida de masa por desecación en la estufa Vaciotem modelo P-selecta (Selecta S.A., Barcelona, España) a 105 °C hasta masa constante. De cada tratamiento térmico se tomaron seis muestras de humedad. La muestra previamente homogeneizada de 5,0(0,5) g se colocó en los pesasustancias previamente desecados, atemperados y pesados. Tras el pesado se introdujeron los pesasustancias con las muestra en el interior de la estufa a 105 °C hasta peso constante. El porcentaje de humedad expresado en g de agua por 100 g de muestra, se calculó mediante la ecuación III. 2.

$$\% \text{Humedad} = \frac{(m_1 - m_0) - (m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \cdot 100 \quad \text{ecuación III.2}$$

donde:

m_0 = masa del pesasustancias (g)

m_1 = masa del pesasustancias más la muestra antes de la desecación (g)

m_2 = masa del pesasustancias más la muestra después de la desecación (g)

4.3.4. Contenido en grasa

La determinación de la grasa se realizó por extracción en Soxhlet con éter de petróleo según el método 991.36 de la AOAC (1997). El equipo utilizado para la extracción de grasa fue Soxtec System 2055 Tecator (FOSS, Hillerød, Denmark). El extractor de grasa Soxtec posee seis puestos de extracción, sistema automático programable, calefactor eléctrico, alta recuperación de solventes (hasta el 90%), pasos automatizados, circuito cerrado y variedad de solventes de uso. Para la determinación de la cantidad de grasa (x_g) en las muestras, se pesaron 5 g de las mismas, previamente deshidratadas en estufa a vacío hasta peso constante. Las muestras se introdujeron en cartuchos de celulosa y se dispusieron en el equipo de extracción. Se adicionaron 90 mL de éter de petróleo como solvente orgánico. La extracción se realiza en dos etapas y concluye con una tercera de recuperación del solvente. El último paso en la determinación de la cantidad de grasa requiere de la evaporación de los restos de éter en estufa a 60 °C. La ecuación III.3 muestra la expresión matemática empleada en el cálculo de la cantidad de grasa (x_g).

$$X_g = \frac{(P_{bg} - P_{bs})}{P_m} \quad \text{ecuación III.3}$$

siendo:

x_g = cantidad de grasa de la muestra (g grasa/ g muestra seca)

P_{bg} = peso del bote + grasa (g)

P_{bs} = peso del bote antes de extracción (g)

P_m = peso de la muestra (g)

4.3.5. Contenido proteico

La determinación de proteínas se realizó según el método Kjeldahl, tal y como se describe en el método 928.08 de la AOAC (1997). El análisis del contenido en nitrógeno total basado en el método Kjeldahl, consta de tres etapas: digestión, destilación y valoración.

- Digestión: En un tubo Kjeldahl se introdujeron 0,5 g de muestra exactamente pesada y 3 g de catalizador compuesto por K_2SO_4 , $CuSO_4$ y Se (10:1:0,1). A continuación, se adicionaron 10 mL de H_2SO_4 (98% v/v) y 5 mL de H_2O_2 (30% v/v). Los tubos se introdujeron en una unidad de digestión Büchi B-426 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza), donde se calentaron a 450 °C hasta digestión completa. Se consideró la digestión finalizada cuando la disolución contenida en el tubo adquirió una coloración verde esmeralda.

- Destilación: La disolución obtenida tras la digestión se diluyó en frío con 50 mL de agua destilada y se llevó a una unidad de destilación semiautomática Büchi B-316, donde añadió un exceso de hidróxido sódico 10 N y se destiló durante 4 minutos. El amoníaco liberado durante la destilación se recogió sobre 50 mL de una disolución de ácido bórico (4% p/v).

- Valoración: el amoníaco recogido sobre el ácido bórico se valoró con H_2SO_4 0,3 N en presencia del indicador Shiro T-Shiro (disolución de rojo de metilo al 0,2 % y azul de metileno al 0,1 % en alcohol etílico), hasta el viraje de la disolución desde verde verde (medio básico) a violeta (medio ácido).

Paralelamente se realizó un ensayo en blanco.

La cantidad de proteína se calculó mediante la ecuación III.4:

$$\% \text{proteína} = \frac{(V_m - V_b) \cdot N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot f \cdot \text{Peq}_{\text{N}_2} \cdot 6,25}{m} \cdot 100 \quad \text{ecuación III.4}$$

donde:

V_m = volumen de ácido empleado en la valoración (L)

V_b = volumen de ácido empleado en el ensayo en blanco (L)

$N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = normalidad del ácido sulfúrico

f = factor de la normalidad de ácido sulfúrico

$\text{Peq}_{\text{N}_2} = 14$

m = masa de muestra (g)

4.3.6. Determinación de la calidad del aceite

La determinación de la calidad del aceite se llevó a cabo mediante una sonda FOM-310 (Ebro Electronic GmbH y Co. KG, Ingolstadt, Germany), se controló la temperatura y la presencia de compuestos polares. Se realizó una medida por tiempo de fritura, calculándose el valor final de cada temperatura como la media de todos los tiempos.

4.3.7. Propiedades ópticas

El color depende de las condiciones de medición en los alimentos, así como la capacidad de su superficie para reflejar, dispersar, absorber o transmitir la luz visible. La medida de color de las muestras se realizó por reflexión en superficie, con un colorímetro Minolta modelo CM3600d (Minolta Co. Ltd, Tokio, Japan). Gracias al cual, se obtuvieron los espectros de reflectancia y las coordenadas de color CIEL*a*b* a partir del espectro de reflexión de las muestras, utilizando el observador estándar de 10° y el iluminante D65.

A partir de las coordenadas colorimétricas CIEL*a*b* (1976), L* (luminosidad), a* (desviación hacia el rojo y el verde), b* (desviación hacia el amarillo y el azul), se calcularon las coordenadas psicofísicas de tono (h_{ab}^*) y croma (C_{ab}^*), mediante las ecuaciones III.5 y III.6:

$$h_{ab}^* = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad \text{ecuación III.5}$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{ecuación III.6}$$

4.3.8. Determinación del perfil lipídico

El perfil lipídico del músculo de dorada (*Sparus aurata*) fue determinado siguiendo el método de Folch et al. (1957) utilizando cloroformo-metanol (2:1 v/v), conteniendo 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. El solvente orgánico se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y el contenido lipídico se determinó gravimétricamente.

Los lípidos totales se sometieron a una transmetilación catalizada por ácido (Christie, 1982) para obtener metil ésteres de ácidos grasos, los cuales se separaron e identificaron por cromatografía gas-líquido. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 equipado con una columna capilar (SPTH-2560. SUPELCO, 100 mx0,25 mm I.D., 0,2 μ m). La temperatura del horno se mantuvo inicialmente a 140 °C durante 5 minutos y posteriormente se elevó hasta 230 °C a una velocidad de 4 °C por minuto y finalmente hasta 240 °C a una velocidad de 1 °C por minuto donde se mantuvo durante 6 minutos. El inyector y el detector de ionización se mantuvieron a 250 °C. Como gas portante se utilizó helio a una presión de 290 kPa. Los picos se

identificaron por comparación de los tiempos de retención de estándares de referencia (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Las concentraciones de cada uno de los ácidos grasos se obtuvo como un porcentaje del contenido total.

4.3.9. Grado de encogimiento

Para determinar el grado de encogimiento experimentado por las muestras debido al tratamiento térmico, se utilizó el programa informático Image Tool versión 3.00 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, Texas, USA). El porcentaje de encogimiento se determinó por diferencia del área en cm² medida en las muestras frescas y después del tratamiento térmico. Las áreas se calcularon por triplicado para cada muestra, obteniéndose el valor final de la media de éstas. Las imágenes de las muestras se captaron con una cámara digital Sony modelo DSC-P7 (Sony Co., Tokio, Japan).

4.4. Equipos

4.4.1. Equipo de fritura/cocción a vacío

El equipo de fritura/cocción a vacío utilizado para realizar los diferentes tratamientos (Figura III.1.) incorpora una base calefactora y todos los elementos necesarios para permitir la fritura de alimentos al vacío en un medio graso. Dada su gran versatilidad es apto igualmente para freír alimentos a presión atmosférica o al vacío (Martínez-Monzó et al., 2004).

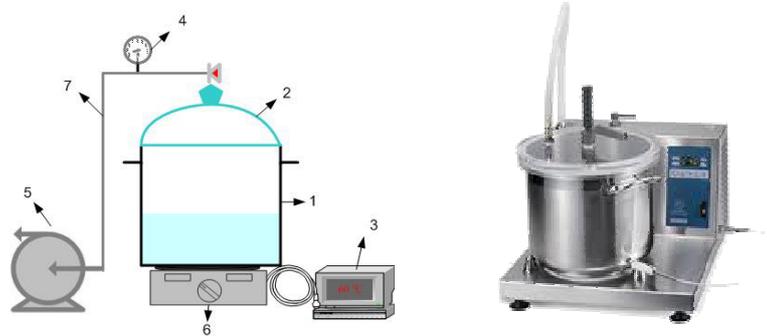


Figura III.1. Equipo de fritura a vacío (Gastrovac®).

La descripción del equipo se presenta a continuación:

1. Olla de acero inoxidable. Su vaso está conectado a la fuente de calor mediante una sonda de temperatura.
2. Tapa. Realizada en metacrilato resistente a las condiciones de trabajo que permite la visualización del proceso.
3. Selector de temperatura. Permite establecer la temperatura del líquido de fritura.
4. Manómetro para el registro de la presión de vacío en el interior y una válvula de salida que permite el mantenimiento del vacío, para lo que está conectada a través de un tubo de conexión de vacío a la bomba de vacío.
5. Bomba de vacío. Provoca la disminución de la presión atmosférica hasta alcanzar el equilibrio correspondiente a la presión de evaporación del líquido introducido en el vaso de la olla a la temperatura seleccionada.
6. Sistema de calefacción o fuente de calor, conectado al selector de temperatura.
7. Tubo de conexión de vacío de material adecuado, goma, para soportar las condiciones de trabajo especiales en las que se encuentra el mismo.

Para el proceso de fritura/cocción, se llenó el vaso de la olla con dos litros de aceite de girasol/agua y se introdujeron las muestras colocadas en un cestillo metálico que se mantiene suspendido de la tapa mediante una ballesta. A continuación se cerró herméticamente con dicha tapa, que conecta la bomba de vacío mediante un tubo de material resistente a las condiciones de trabajo a una válvula que permite el mantenimiento del vacío constante en el interior del equipo. Mediante el selector de temperatura se estableció la temperatura del aceite/agua y, utilizando la bomba de vacío, se disminuyó la presión atmosférica hasta alcanzar el equilibrio correspondiente a la presión de evaporación del líquido a la temperatura seleccionada. Transcurrido el tiempo estimado para cada ensayo, se apagó la bomba de vacío y antes del restablecimiento de la presión atmosférica, se elevó el producto sobre el aceite/agua y se centrifugó manualmente con tal de disminuir el fenómeno de impregnación. El aceite de girasol empleado fue filtrado tras cada una de las experiencias y renovado en cada temperatura de trabajo.

4.4.2. Equipo de fritura a presión atmosférica

La fritura a presión atmosférica se llevó a cabo en una freidora redonda de agua Movilfrit F5 (Movilfrit S.A., Barcelona, España) con cestillo, filtro especial para residuos y sin cubeta desmontable. Este equipo está fabricado con exterior de metal, disponiendo de un depósito especial que permite usar agua y aceite, evitando que se mezclen sus sabores con los de los otros alimentos debido a que los residuos caen al fondo, y tiene una capacidad de 5 L de aceite y 1 L de agua.

4.5. Modelos empíricos

Los modelos empíricos no pretenden describir cómo tiene lugar el proceso y solo interpretan de forma empírica los datos. Estos modelos son útiles con fines de diseño, especialmente cuando los problemas a resolver son excesivamente complicados (Mulet, 1994). En el caso de la fritura se han propuesto diversos modelos empíricos para describir tanto la absorción de aceite como la pérdida de agua.

Existen muchos modelos matemáticos que abordan diferentes aspectos de la fritura con grados de complejidad que varían dependiendo de los objetivos concretos y el nivel de detalle buscado. Las versiones más sencillas consisten en correlaciones empíricas o pseudoempíricas que no profundizan en la naturaleza del proceso, centrándose en ajustar y predecir aspectos puntuales de la fritura, por lo que su utilidad queda limitada a su aplicación directa en el diseño de procesos concretos. Su uso era más abundante en el pasado coincidiendo con las primeras aproximaciones teóricas al proceso, generalmente de forma paralela o complementaria a las expresiones usadas en la operación de secado, y a lo poco evolucionadas que aún eran las herramientas de cálculo y análisis numérico. No obstante en la actualidad aún surgen de vez en cuando modelos simples de este tipo para aportar soluciones concretas para casos muy complejos. Dado su carácter práctico y específico, todos estos modelos se emplean casi exclusivamente para cuantificar los distintos transportes de materia, en especial la absorción de aceite por ser un fenómeno complejo y difícil de abordar.

Una de las primeras expresiones de este tipo para alimentos, fue la encontrada para patatas fritas "French fries" por Ashkenazi et al. (1984) y para "chips" de patata obtenidos a diferentes

temperaturas (145, 165 y 185 °C) por Gamble et al. (1987). En ambos casos se encontraron relaciones lineales entre el contenido en agua y la ganancia de aceite con la raíz cuadrada del tiempo de fritura, t , con fórmulas del tipo:

$$X = a - b \cdot t^{1/2} \quad \text{ecuación III.7}$$

donde:

X : es la humedad expresada en g agua/g agua inicial

a y b : son parámetros de ajuste que dependen de las condiciones experimentales.

Baumann y Escher (1995) desarrollaron un modelo para rodajas de patata de diferentes grosores (entre 0,8 y 1,6 mm) fritas a diferentes temperaturas (entre 150 y 180 °C). Encontraron un comportamiento exponencial, análogo al de la operación de secado convencional para la evolución temporal de la pérdida de agua:

$$X = X_0 \cdot e^{(-kt)} \quad \text{ecuación III.8}$$

donde:

X : es la humedad expresada en g agua/g agua inicial

X_0 y k : son parámetros de ajuste que dependen de las condiciones experimentales

4.6. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). Con el objetivo de comprobar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos para cada uno de los

parámetros evaluados se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó el procedimiento LSD (Least Significant Difference) para comprobar las diferencias a un nivel de significación $\alpha=0,05$. Así, se realizaron diferentes ANOVAS simples para cada uno de los parámetros fisicoquímicos y ANOVAS factoriales para el tratamiento de vacío utilizando como factores: la temperatura y el tiempo. Finalmente se realizó un Análisis Factorial con el programa SPSS v.16.0. (IBM Corp., New York, USA) con licencia de uso en la UPV para los datos de fritura a vacío.

III.5. RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados obtenidos para cada parámetro analizado, teniendo como objetivo principal estudiar cómo afecta el tratamiento empleado y las variables de proceso (tiempo y temperatura) a los filetes de dorada (*Sparus aurata*), tanto para el proceso de fritura como el de cocción en condiciones de vacío continuo.

5.1. Fritura

La fritura es un proceso físico-químico complejo en el cual el producto a freír (patatas, carne, pescado, productos empanados, etc.) se somete a una temperatura alta con el propósito de modificar la superficie del producto, impermeabilizándolo de alguna manera, para controlar la pérdida de agua desde su interior (White, 1995). De esta forma, es posible conservar muchas de las características propias del alimento mejorando, en la mayoría de los casos, su sabor, textura, aspecto y color. Así, se puede obtener un producto más "apetecible", lo cual sin lugar a dudas contribuye al éxito del consumo de los productos fritos. La fritura en condiciones de presión atmosférica es un método tradicional de

preparar los alimentos para ser consumidos. Actualmente, la fritura a vacío está siendo estudiada por muchos autores (Shyu y Hwang, 2001; Garayo y Moreira, 2002; Tan y Mittal 2006) y se presenta como una alternativa a la fritura tradicional de alimentos con características organolépticas deseables. El proceso de fritura, tal y como se ha descrito en la introducción del presente capítulo, conlleva una serie de alteraciones en el producto sometido a tratamiento. Diversos trabajos (Dobarganes et al., 1988; Pokorny, 1998) ponen de manifiesto fenómenos físicos y químicos que ocurren en la matriz del producto sometido a fritura durante este proceso.

Entre ellos:

[1] Fenómenos de transferencia o transporte:

- Transferencia de agua del alimento al medio de fritura y posterior evaporación.
- Absorción y adsorción por parte del alimento de compuestos de alteración del aceite.

[2] Migración de los componentes lipídicos entre ambos productos en contacto, lo que origina cambios en la composición del alimento. Ambos fenómenos (1 y 2) dependen de la capacidad de penetración del aceite de fritura, la cual se ve afectada por factores como la temperatura y el tiempo de fritura y por las características del alimento (superficie, estructura, humedad, porosidad, forma).

[3] Transferencia de calor, lo que origina deshidratación e interacciones químicas entre los aceites de fritura y los componentes naturales del producto frito originando sustancias nuevas producidas en el seno del alimento.

[4] Deformaciones mecánicas incluyendo expansiones, disgregación de la matriz sólida, desarrollo de porosidad y de una superficie rugosa.

[5] Reacción de Maillard, degradación de proteínas y reacciones de pirólisis, condensación y polimerización.

[6] Transformaciones fisicoquímicas, como la gelatinización, la retrogradación del almidón, la gelificación de ciertas proteínas, etc.

En este apartado se evalúan las alteraciones sufridas por el producto debido al tratamiento de fritura tratando de explicar los cambios experimentados por las muestras en base a lo expuesto. Para llevar a cabo los diferentes análisis se caracterizaron en primer lugar los filetes de dorada sin ningún tipo de tratamiento siguiendo las metodologías descritas en el apartado de materiales y métodos del presente capítulo. En la Tabla III.2. se muestran algunos parámetros composicionales y físico-químicos para los filetes de dorada, utilizados como referencia para analizar el efecto del tiempo y la temperatura de las muestras sometidas al tratamiento de fritura.

Tabla III.2. Caracterización de las muestras frescas.

% Humedad	% Grasa	% Proteína	L*	a*	b*	h _{ab} *	C _{ab} *
69,32	4,7	20,3	47,07	-3,84	-0,83	190,6	4,02

5.1.1. Caracterización y estudio cinético de los parámetros físico-químicos en el proceso de fritura

En este apartado se va a analizar como afecta el proceso de fritura a vacío a la pérdida de peso, de humedad, ganancia de aceite y encogimiento, de filetes de dorada tratados por fritura a vacío (90, 100 y 110 °C) y a presión atmosférica (165 °C). Por otra parte se van a estudiar las cinéticas de estos fenómenos para su mejor comprensión.

5.1.1.1. Perfil de temperaturas durante el proceso de fritura

En el proceso de fritura se producen fenómenos de transferencia de calor por conducción y convección a través de toda la superficie del filete debido al gradiente de temperaturas entre el producto y el medio de cocción. La Figura III.2. muestra el perfil de temperaturas alcanzado en el centro de producto de los filetes de dorada tras el tratamiento de fritura en función del tiempo.

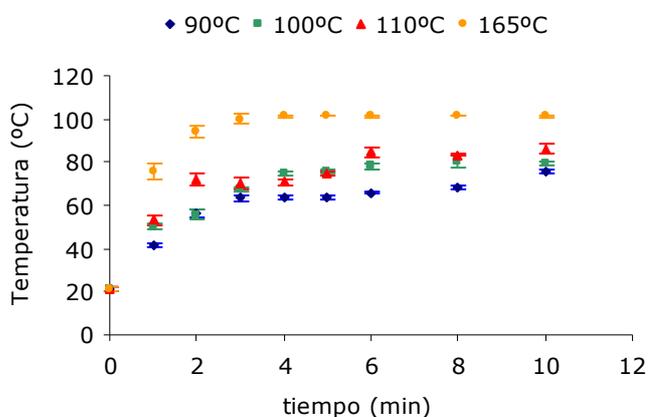


Figura III.2. Perfil de temperaturas en filetes de dorada tratados a vacío (90 °C, 100 °C y 110 °C) y a presión atmosférica (165 °C).

A tiempos cortos de procesado se puede observar un rápido aumento de la temperatura, posteriormente ésta se sigue incrementando muy ligeramente hasta equilibrarse con la temperatura de evaporación del agua en las condiciones de proceso. Este comportamiento está relacionado con los mecanismos de transferencia de calor en cada una de las etapas del procesado. En la primera etapa, el calor que absorbe el producto se emplea en aumentar la temperatura del producto (calor sensible) hasta el punto en el que se alcanza la temperatura de ebullición del agua (calor latente) que es función de la presión

de vacío a la que se trabaja. En las experiencias realizadas, las condiciones de procesado estudiadas fueron: para 90 °C se estableció una presión de vacío de 15 kPa, para 100 °C 20 kPa, para 110 °C 25 kPa y 101,3 kPa para 165 °C lo que equivale a unos puntos de ebullición del agua libre de 55,5 °C; 62,3 °C; 67,6 °C y 100 °C respectivamente. Estas temperaturas se alcanzaron entre los 2 y 2,5 minutos para los tratamientos a vacío a 90 °C, 100 °C y 110 °C y a los 3 minutos para el tratamiento a presión atmosférica a 165 °C. Como se observa en la Figura III.2. las temperaturas alcanzadas en el interior del producto son mayores que las de evaporación del agua a la presión de trabajo para las diferentes temperaturas estudiadas. Estas diferencias ponen de manifiesto que en el interior del producto se crean sobrepresiones que implican incrementos en la temperatura de ebullición de entre 10 y 20 °C por encima de las que corresponderían a la presión de la cámara.

El proceso de fritura a vacío ha sido estudiado por muchos autores para tratar de determinar cómo influye sobre las características del producto final (color, textura, contenido en grasa, etc), pero son muy pocos los trabajos que han analizado el comportamiento y los equilibrios que se establecen en el interior del producto (Andrés-Bello et al., 2011). Algunos autores como Halder et al. (2007) y Datta (2007) han empezado a abordar el estudio de la fritura a vacío bajo el punto de vista del medio poroso. Durante el proceso de fritura a vacío en el interior de la estructura porosa del alimento se producen sobrepresiones por efecto del vapor que se va formando que afectan a la temperatura de evaporación del agua y eso influye en la temperatura a la cual se produce dicha evaporación y que difiere de la temperatura que cabría esperar si el agua estuviera libre en el interior de la cámara,

en cuyo caso se puede establecer una correlación entre la presión de la cámara y la temperatura de evaporación del agua. Así pues, la evolución de la temperatura interna en fritura a vacío puede ser explicada atendiendo a la sobrepresión interna que aumenta la temperatura de saturación y tensiona la corteza hasta que se crean caminos preferenciales o se produce su colapso. Esto libera la sobrepresión y hace que el sistema alcance una presión de equilibrio que es la que marca la nueva temperatura interna a la cual el proceso se estabiliza. Las diferentes tasas de evaporación correspondientes a las diferentes temperaturas empleadas en fritura a vacío provocan que los máximos de temperatura correspondan a unos u otros valores y se produzcan antes o después. Por tanto, se observa que en el proceso de fritura a vacío se producen diversos fenómenos al mismo tiempo. Por una parte, el fenómeno de evaporación del agua del producto depende de las condiciones de presión de cada tratamiento y de las propiedades del alimento. Por otra parte, el fenómeno de transferencia de calor por conducción en la matriz del producto y convección en el elemento de cocción. Hay que tener en cuenta el efecto de la evaporación del agua sobre el calentamiento del producto, ya que la evaporación del agua supone un enfriamiento de la matriz, y por otra parte, como se ha comentado, el vapor generado influye en los coeficientes de transferencia de calor. Todos estos aspectos influyen en la velocidad de evaporación del agua del producto, la ganancia de aceite y la pérdida de peso como se discute a continuación.

5.1.1.2. Variación de peso

En este punto se estudia como las variables de proceso estudiadas, tiempo-temperatura, van a afectar de manera directa a

la matriz proteica del filete de pescado produciendo cambios irreversibles relacionados con la solubilización del colágeno y la coagulación proteica, que traen consigo la pérdida del agua de constitución del producto.

El músculo de pescado está formado por segmentos angulares superpuestos que se llaman miotomos, los cuales están unidos por capas intermedias de tejido conjuntivo que se llaman miocomos. Las proteínas fibrilares del pescado (actina, miosina, etc.) son más sensibles a la desnaturalización y a la proteólisis que las de la carne. El tejido conjuntivo de los peces es más débil que el de los mamíferos y aves (tiene menos colágeno, éste está menos polimerizado y se gelatiniza a 40 °C) por esta razón, con el tratamiento térmico, los miotomos se desprenden unos de otros (Primo-Yúfera, 1998). El tratamiento térmico de un alimento ocasiona un descenso de su peso como consecuencia de la liberación de parte del agua y compuestos solubles de su composición al medio de cocción. A partir de los 50 °C las proteínas plasmáticas y sarcoplasmáticas se desnaturalizan (desplegamiento de las α -hélices), se produce agregación y coagulación. A los 63 °C la elastina hincha pero debido a su configuración se modifica poco y la actomiosina se hace más firme y menos soluble disminuyendo su capacidad de retención de agua (Cheftel y Cheftel, 1992). En el presente estudio, al ser las temperaturas de trabajo superiores en todos los casos a 63 °C, todos estos cambios asociados a la temperatura se van a producir en los filetes de dorada. Por otra parte hay que tener en cuenta que en la operación de fritura la pérdida de peso del producto es el resultado de los flujos de salida de agua y entrada de aceite en el filete.

La Figura III.3. muestra la pérdida de peso experimentada por los filetes de dorada (*Sparus aurata*) después de ser sometidos a

tratamiento de fritura tradicional (condiciones de presión atmosférica) y bajo condiciones de vacío continuo a 90, 100 y 110 °C. Como se puede observar en la figura, para ambos tratamientos empleados (vacío y presión atmosférica), a mayor temperatura de trabajo y tiempo de fritura se produjo una mayor pérdida de peso.

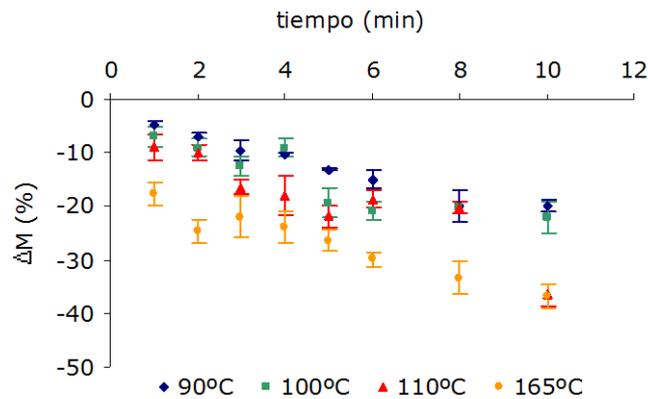


Figura III.3. Variación de peso de los filetes de dorada en función del tiempo para las diferentes temperaturas de trabajo empleadas.

El tratamiento en condiciones de presión atmosférica (165 °C) produjo un descenso del peso de los filetes mayor que el tratamiento en condiciones de vacío continuo (90, 100, 110 °C), registrándose a los 8 y 10 minutos las diferencias más elevadas. Una de las ventajas de trabajar en condiciones de vacío es la posibilidad de trabajar a temperaturas inferiores a las utilizadas en condiciones atmosféricas lo que permite obtener un producto más jugoso y menos deteriorado por la acción del calor. En la Figura III.3. se puede observar que para un mismo tiempo de tratamiento (10 min) las muestras sometidas a fritura tradicional pierden hasta un 44(2)% de peso respecto de su peso inicial mientras que las muestras tratadas a vacío experimentan pérdidas que oscilan

entre 19(1)% para 90 °C, 22,1(0,1)% para 100 °C y hasta 36(2)% a los 110 °C. Como se puede observar, tanto para los tratamientos a vacío como los de presión atmosférica las mayores pérdidas de peso se producen cuanto mayor es la temperatura y el tiempo de tratamiento.

Para llevar a cabo los análisis estadísticos se evaluaron por una parte los datos correspondientes a los tratamientos de vacío (90, 100 y 110 °C) y por otra parte la fritura tradicional a presión atmosférica (165 °C). Los análisis estadísticos mostraron como la interacción entre el tiempo y la temperatura para las temperaturas analizadas en condiciones de vacío continuo resultó significativa ($p \leq 0,05$) y se observó como a mayor tiempo de fritura se produjo una mayor pérdida de peso para cualquiera de las temperaturas analizadas y las diferencias comenzaron a ser significativas ($p \leq 0,05$) a partir de los 3 minutos de tratamiento. Por otra parte, una mayor temperatura de trabajo también implicó una mayor pérdida de peso para el conjunto del proceso siendo las diferencias entre las temperaturas de vacío ensayadas significativas. En el caso de la fritura a presión atmosférica a mayor tiempo de tratamiento se produjo una mayor pérdida de peso y en este caso el tiempo de tratamiento también resultó significativo ($p \leq 0,05$).

5.1.1.3. Evolución de la pérdida de agua y ganancia de grasa de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) debido al tratamiento de fritura

5.1.1.3.1. Evolución de la pérdida de agua

Al someter un alimento al tratamiento de fritura se produce una pérdida de humedad, consecuencia de la aplicación de calor. La pérdida de humedad durante la fritura puede presentar un perfil

típico de un proceso de secado. El proceso de secado en los alimentos está generalmente caracterizado por tres períodos que pueden llegar a distinguirse. El primer período, es un período de calentamiento inicial en el cual el producto húmedo absorbe calor del medio que le rodea y se calienta por encima de su temperatura inicial hasta una temperatura a la cual la humedad comienza a evaporarse del alimento. En fritura a vacío este período de calentamiento inicial es muy corto y difícil de cuantificar. El segundo período, es conocido como un período de secado constante, en él el secado está limitado por la transferencia de calor del medio de secado al producto y continúa mientras el producto permanezca húmedo en superficie. Cuando el nivel de humedad en el producto es tan bajo que su superficie ya no se encuentra húmeda, el proceso de secado entra en el tercer período conocido como período de caída, durante el cual el secado es controlado por mecanismos difusionales. El agua durante este período está en el alimento retenida por adsorción multi-molecular y condensación capilar (Garayo y Moreira, 2002). En los tratamientos realizados debido a los tiempos empleados (tiempos relativamente cortos) y a las características de los tratamientos (temperatura/presión) y al tipo de producto utilizado (filetes), el primer período transcurre con rapidez y lo que predomina es la etapa correspondiente al secado constante.

La Figura III.4. muestra los valores de pérdida de humedad durante el proceso de fritura para los diferentes tratamientos. La evolución que presentan los datos experimentales que muestra la figura es semejante a los reportados en la literatura tanto para procesos convencionales de deshidratación de alimentos (Prothon, 2003; Sacilik y Elicin, 2006), como para fritura (Farkas et al., 1996b; Krokida et al., 2000a; Moreira et al., 1995; Pedreschi y

Moyano, 2005b; Sahin et al., 1999; Vitrac et al., 2002). Se puede apreciar que los datos presentan la forma de las curvas típicas de secado en su etapa de velocidad constante, aunque en el caso de la fritura a 165 °C parece apreciarse el inicio del periodo de velocidad decreciente (a partir de los 8 minutos de tratamiento).

Como se observa en la Figura III.4., tras 10 minutos de fritura, a 165 °C (presión atmosférica), el contenido de humedad fue de 0,59(0,03) $g_{\text{agua}}/g_{\text{ms}}$, 1,73(0,03) $g_{\text{agua}}/g_{\text{ms}}$ a 90 °C (fritura a vacío), y 1,2(0,2) $g_{\text{agua}}/g_{\text{ms}}$ a 110 °C. El contenido de humedad desciende durante el tratamiento de fritura para las diferentes temperaturas estudiadas. Conforme aumenta la temperatura de fritura el contenido de humedad para el mismo tiempo de tratamiento disminuye. Durante los primeros minutos de tratamiento el descenso del contenido de humedad es similar tanto en la fritura a presión atmosférica como a vacío, sin embargo tal y como observaban Mariscal y Bouchon (2008a) en su trabajo llevado a cabo con manzanas, las diferencias empiezan a hacerse muy evidentes a tiempos de fritura largos.

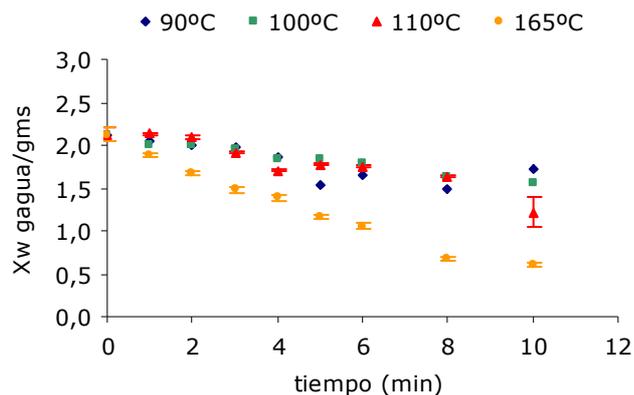


Figura III.4. Variación de la humedad experimentada por los filetes de dorada (*Sparus aurata*) en función del tratamiento empleado.

El efecto de las variables de proceso estudiadas (tiempo y temperatura) sobre la pérdida de agua, en el caso de las temperaturas de vacío, mostró un efecto significativo ($p \leq 0,05$) siendo el tiempo la variable con mayor peso en la interacción. Así pues los análisis estadísticos pusieron de manifiesto diferencias significativas entre las tres temperaturas de vacío ensayadas siendo las muestras tratadas a 100 °C las que mostraron una menor pérdida de agua aunque muy similares a las de 90 °C. El tiempo de tratamiento produjo un descenso del contenido de agua que empezó a ser significativo ($p \leq 0,05$) a partir de los tres minutos de proceso para las tres temperaturas de vacío estudiadas. En el caso de la fritura a presión atmosférica se observó un descenso significativo ($p \leq 0,05$) del contenido de agua con el tiempo de tratamiento y dichas diferencias fueron significativas a partir del primer minuto de proceso. La pérdida de humedad en las muestras tratadas a vacío fue de entre un 25 y 40% y entorno al 70% en las muestras tratadas a presión atmosférica tras 10 minutos de fritura. La combinación de altas temperaturas (165 °C) con largos tiempos de fritura (10 min) produce un producto más seco, afectando a la jugosidad del producto final y a su posible aceptación.

Una aproximación para modelizar la pérdida de agua consiste en aplicar expresiones empíricas sencillas análogas a las que se utilizan en la fritura convencional a presión atmosférica. De entre estos modelos, tal como se ha expuesto en el apartado 4.5 de materiales y métodos para el ajuste de los datos experimentales, se han utilizado el modelo de la raíz cuadrada del tiempo (ecuación III.7) y el de la caída exponencial (ecuación III.8). En la Figura III.5. se recogen los ajustes gráficos obtenidos tras la aplicación de ambos modelos para las diferentes temperaturas y condiciones de trabajo.

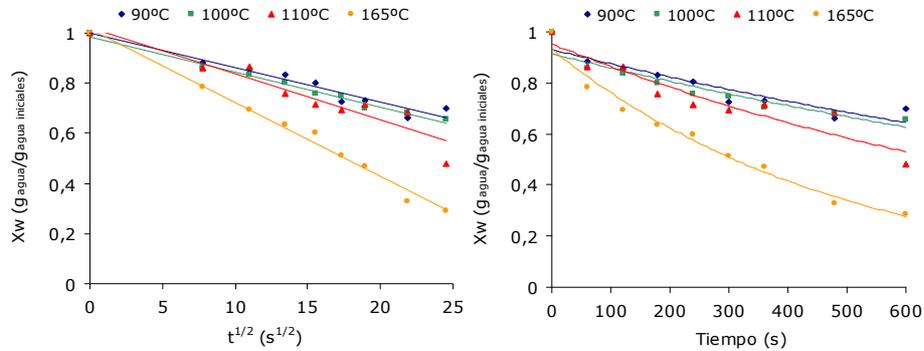


Figura III.5. Ajustes obtenidos para predecir la pérdida de agua con el modelo empírico de la raíz cuadrada del tiempo (izquierda) y el modelo exponencial (derecha) para la fritura a presión atmosférica (165 °C) y en condiciones de vacío continuo (90, 100 y 110 °C).

En la Tabla III.3. se pueden observar los parámetros de ajuste (a, b, Xo y k) y el coeficiente de correlación obtenidos en cada caso para ambos modelos aplicados.

Tabla III.3. Coeficientes de regresión (R^2) y parámetros de ajuste para los dos modelos empíricos empleados para la pérdida de agua.

Temperatura °C		90	100	110	165
Presión de trabajo		Vacío	Vacío	Vacío	Atmosférica
Modelo de la raíz cuadrada	a	0,998	0,984	1,0180	1,0170
	b (s^{-1})	0,0137	0,014	0,0184	0,0295
	R^2	0,948	0,985	0,896	0,989
Modelo exponencial	Xo	0,930	0,913	0,952	0,932
	k (s^{-1})	0,000613	0,000628	0,000980	0,00201
	R^2	0,857	0,892	0,873	0,983

Como se puede observar en los valores de la Tabla III.3. el modelo de la raíz cuadrada del tiempo presenta coeficientes de correlación superiores a los del modelo de la caída exponencial,

siendo los más altos para ambos modelos los correspondientes a la fritura a presión atmosférica.

Tal como se puede observar en la Figura III.5. y la Tabla III.3, los parámetros relacionados con la velocidad de la pérdida de agua en el filete (tanto el parámetro "b" del primer modelo como el "k" del segundo modelo) muestran que éstas son muy similares en los tratamientos a 90 y 100 °C, mientras que a 110 °C ya se produce un ligero aumento de la velocidad de pérdida de agua. El tratamiento a 165 °C es el que experimenta una mayor velocidad en la pérdida de agua con un mayor valor tanto de b como de k.

En la Tabla III.4. se muestran otros modelos cinéticos que aparecen en bibliografía (Gamble et al., 1987; Bauman y Escher, 1995; Krokida et al., 2000a) para ajustes de la pérdida de agua durante el proceso de fritura. En estos modelos se correlaciona la humedad del producto en base seca (W) frente al tiempo. Al igual que ocurre en los modelos anteriores los parámetros cinéticos indican que las mayores velocidades de pérdida de agua se corresponden con la fritura realizada a presión atmosférica a 165 °C. Podemos considerar, tras analizar los resultados obtenidos, que el efecto del gradiente de temperatura, en las condiciones de trabajo estudiadas, tiene un mayor efecto sobre la pérdida de agua que el gradiente de presiones, ya que en ningún caso la velocidad de pérdida de agua es mayor en los tratamientos a vacío.

Tabla III.4. Parámetros de ajuste para modelos cinéticos empleados para la pérdida de agua en el proceso de fritura.

Temperatura °C		90	100	110	165	
Presión de trabajo		Vacío	Vacío	Vacío	Atmosférica	
Gamble et al. (1987)	a	2,43	2,22	2,36	2,58	
	$W = a - bt^{1/2}$	b (s ⁻¹)	0,0391	0,0245	0,037	0,0826
		R ²	0,76	0,89	0,729	0,985
		SEE	0,1434	0,0549	0,1434	0,065
Bauman and Escher (1995)	a	2,22	2,1	2,21	2,343	
	$W = ae^{-bt}$	b (s ⁻¹)	0,000724	0,0004922	0,0008	0,0024
		R ²	0,617	0,9528	0,832	0,961
		SEE	0,1798	0,0364	0,1162	0,1054
Krokida et al. (2000)	(W ₀ -W _e)	0,952	2,1	2,214	2,149	
	$\frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = e^{-k_x t}$	kx	0,00742	0,00049	0,0008	0,00296
		R ²	0,821	0,952	0,832	0,9636
		SEE	0,1241	0,0368	0,1174	0,1038

5.1.1.3.2. Evolución de la ganancia de grasa

El mecanismo de adsorción de aceite es un aspecto muy importante a tener en cuenta en el proceso de fritura de alimentos y está siendo estudiado por muchos autores (Ufheil y Escher, 1996; Moreira et al., 1997; Moreira y Barrufet, 1998). Algunos estudios han demostrado que el aceite no penetra en el producto durante el proceso de fritura pero sí durante el período de enfriamiento una vez extraído el producto del aceite (Ufheil y Escher, 1996; Moreira et al., 1997; Moreira y Barrufet, 1998).

En este trabajo la ganancia de aceite de las muestras se analizó, según lo descrito en el apartado 4.3.6 de materiales y métodos, una vez extraídas las muestras del aceite de fritura, centrifugadas y tras un breve período de enfriamiento de las mismas sobre papel absorbente, para intentar reducir al máximo la absorción de aceite tras la fritura. Por ello, los datos experimentales obtenidos permiten un enfoque fenomenológico, sin tener en cuenta el mecanismo de transferencia durante las etapas posteriores a la fritura (Krokida et al., 2000a). En la Figura III.6. se

muestra la evolución del porcentaje de grasa en base seca en los filetes de dorada para los diferentes tratamientos aplicados. En ella, se puede observar que el fenómeno de ganancia de grasa en los filetes aparece con cierta variabilidad mostrando una tendencia al aumento del contenido graso al aumentar el tiempo de fritura. Esta tendencia es muy ligera para los tratamientos a vacío y más acusada en el caso de la fritura en condiciones de presión atmosférica. En este estudio se parten de filetes de dorada con un contenido inicial de grasa de $0,15(0,02) \text{ g}_{\text{grasa}}/\text{g}_{\text{ms}}$, que en porcentaje corresponden al $4,7(0,7)\%$ de grasa en el filete fresco. Los máximos valores obtenidos para el contenido graso oscilaron entre $0,24(0,02) \text{ g}_{\text{grasa}}/\text{g}_{\text{ms}}$ a los ocho minutos de tratamiento a 90°C a vacío y los $0,30(0,01) \text{ g}_{\text{grasa}}/\text{g}_{\text{ms}}$ a los ocho minutos de tratamiento a 165°C .

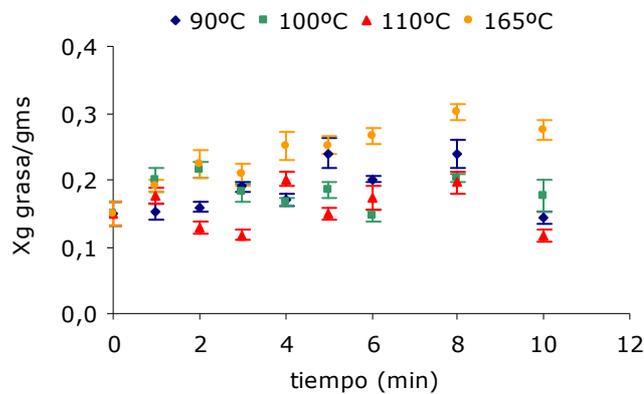


Figura III.6. Variación del contenido graso experimental por los filetes de dorada (*Sparus aurata*) en función del tratamiento empleado.

Como se ha comentado, en la Figura III.6. se puede observar que en los tratamientos a vacío la ganancia de grasa en los filetes es menor que en el tratamiento a presión atmosférica. Cuando se

analiza el efecto de la temperatura en los tratamientos de fritura a vacío en los filetes de dorada se observan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ellos. A vacío, la absorción de grasa disminuye con el aumento de la temperatura, siendo el tratamiento a 110 °C el que menores porcentajes de grasa muestra en los filetes. Para explicar estos valores en las ganancias de aceite podemos hablar en términos de mecanismos de transferencia de materia. En la fritura en condiciones de presión atmosférica los mecanismos de transferencia de materia se dividen en dos periodos: el de fritura y el de enfriamiento. Durante el periodo de fritura (calentamiento) se está produciendo una salida de vapor y aire de los poros lo que hace que no exista una fuerza impulsora para la penetración del aceite hacia el interior del producto. Durante el periodo de enfriamiento el aceite adherido en la superficie penetra hacia el interior de los poros y al producirse un enfriamiento aumenta la presión capilar que ocasiona una diferencia de presión entre la superficie y el poro que crea una fuerza impulsora que lleva a la penetración de aire y aceite hacia el interior del poro (Garayo y Moreira, 2002). En la fritura en condiciones de vacío los mecanismos de transferencia de materia pueden dividirse en tres periodos: el de fritura, el de presurización y el de enfriamiento. En la etapa de fritura al igual que en el caso anterior la salida de agua impide la entrada de aceite, aunque en este caso la evaporación de agua se realiza de una manera más rápida (debido a la menor presión). El segundo periodo comienza cuando los filetes de dorada se sacan del aceite y se mantienen en condiciones de temperatura y vacío a los que se estaba realizando el proceso. Al romper vacío el aire y el aceite de la superficie fluyen hacia los espacios porosos hasta que se restablece la presión atmosférica. Sin embargo, debido a la baja presión, el gas (aire) difunde mucho más rápido

hacia el interior de los poros, dificultando la entrada de aceite. En el periodo de enfriamiento al haber una menor adherencia de aceite en la superficie del filete la absorción de aceite es menor (Garayo y Moreira, 2002).

Resultados similares fueron observados por Tan y Mittal (2006) en su estudio llevado a cabo en fritura a vacío de donuts. Estos autores concluyen que cuanto mayor es el nivel de vacío y menor la temperatura de vacío empleada mayor es el contenido de aceite final en el donut.

La temperatura es un factor que afecta de forma directa y significativa a los tres mecanismos principales de absorción de aceite. Una temperatura más alta implica una degradación mayor de la superficie del producto favoreciendo la absorción del aceite estructural; al favorecer también una eliminación más rápida del agua aumenta la absorción del aceite durante el enfriamiento y, como implica una degradación más rápida del medio de fritura, incrementa la formación de sustancias tensoactivas y mayores contenidos de aceite superficial (Mir-Bel, 2010). Fan et al. (2005a) friendo láminas de zanahoria a temperaturas moderadas (80, 100 y 120 °C) encontraron una influencia significativa de la temperatura de trabajo en el contenido final de grasa. Estos últimos también observaron que las diferencias se acrecentaban conforme se trabaja a niveles menores de vacío. Esta influencia del nivel de vacío podría estar relacionada con la diferente velocidad de formación de la corteza y con los diferentes grados de turbulencia que generan las burbujas de vapor.

En algunos casos aparecen máximos de absorción en tiempos intermedios. Este hecho también ha sido descrito por algunos autores para la fritura a vacío (Garayo y Moreira, 2002; Tan y Mittal, 2006) y se explica asumiendo que el aceite se absorbe

mayoritariamente por fenómenos capilares en la etapa de presurización. Estos máximos se corresponderían entonces a casos donde quedaría bastante humedad residual en los poros de la superficie. Conforme se va eliminando el agua residual, el aire que entra en el sistema durante la presurización penetra más fácilmente en los poros, de forma que el contenido final de aceite disminuye.

La ganancia de aceite durante el enfriamiento en los procesos a vacío depende en gran medida de los cambios de presión asociados a la presurización, además de los asociados a la condensación de vapor, que son los únicos que influyen en la fritura a presión atmosférica. El aumento en los tiempos de escurrido (Mir-Bel et al., 2009) y todas las operaciones que afectan previamente al drenaje del aceite, como la centrifugación (Moreira et al., 2009), reducirán la cantidad de aceite disponible para su absorción posterior.

Con el fin de analizar el proceso de fritura, Pinthus et al. (1993) introdujeron el término U_R el cual expresa el ratio entre la cantidad de aceite ganado y el agua eliminada, y lo definen como:

$$U_R = \text{ganancia de aceite (g)} / \text{pérdida de agua (g)} \quad \text{ecuación III.9.}$$

Pinthus et al. (1993) asumen que para un mismo cambio de volumen, el valor teórico de U_R debería ser 0,9 para un sistema ideal en el cual el mecanismo de ganancia de aceite está gobernado por el mecanismo de pérdida de agua. Estos autores concluyen que, cuando un sistema muestra valores muy diferentes de U_R ya sean por encima del valor teórico o por debajo, muchos otros factores que el "simple" mecanismo de pérdida de agua están involucrados en el proceso. Los valores obtenidos en este estudio para el parámetro U_R son menores que 0,9 para todas las temperaturas estudiadas: 0,08 para 90 °C, 0,03 para 110 °C y 0,4

para 165 °C, después de 10 minutos de fritura. Estos valores podrían sugerir, que en el caso de la fritura a vacío, existe otro mecanismo importante, como el de presurización que gobierna el proceso de sustitución de agua por aceite. Valores reducidos del parámetro U_R para todas las temperaturas están relacionados con una baja pérdida de agua y una baja ganancia de aceite durante el proceso.

Al igual que para la pérdida de agua, las ganancias de aceite se modelizaron utilizando el modelo de la raíz cuadrada del tiempo (ecuación III.7) y el de la caída exponencial (ecuación III.8). En este caso la variable "X" representa los gramos de grasa a tiempo t dividido por los gramos de grasa iniciales (Mir-Bel, 2010).

La Figura III.7 muestra los ajustes obtenidos para ambos modelos de forma gráfica y en la Tabla III.5. se agrupan los parámetros obtenidos para cada una de las condiciones de presión y temperatura estudiadas.

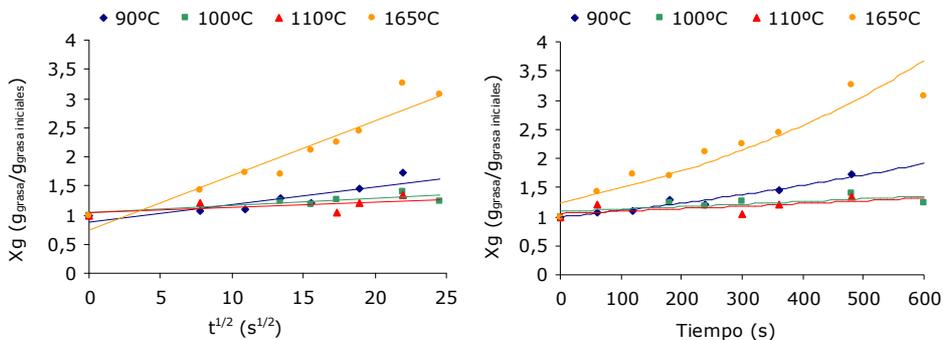


Figura III.7. Ajustes obtenidos para predecir la ganancia de grasa con el modelo empírico de la raíz cuadrada del tiempo (izquierda) y el modelo exponencial (derecha) para la fritura a presión atmosférica (165 °C) y en condiciones de vacío continuo (90, 100 y 110 °C).

Tabla III.5. Coeficientes de regresión (R^2) y parámetros de ajuste para los dos modelos empíricos empleados para la ganancia de grasa.

Temperatura °C		90	100	110	165
Presión de trabajo		Vacío	Vacío	Vacío	Atmosférica
Modelo de la raíz cuadrada	a	0,8749	1,0285	1,0282	0,7497
	b (s^{-1})	0,0306	0,0123	0,0098	0,0941
	R^2	0,782	0,699	0,430	0,909
Modelo exponencial	X_0	0,991	1,088	1,0519	0,9463
	k (s^{-1})	0,0011	0,0004	0,0004	0,0018
	R^2	0,947	0,511	0,425	0,897

Como se puede observar en la Figura III.7. ambos modelos ajustan bien para las temperaturas de 90 °C (vacío) y 165 °C (atmosférica) pero presentan bajos valores de R^2 para las temperaturas de 100 y 110 °C (Tabla III.5.). Hay que recordar que el R^2 representa la proporción de varianza de la variable dependiente que está explicada por la variable independiente, lo que nos viene a decir que para el caso de la fritura a vacío a 100 y 110 °C no existe una correlación elevada entre la ganancia de aceite y el tiempo de fritura. Como se comentó anteriormente el tratamiento a 165 °C a presión atmosférica es el que muestra una mayor ganancia de aceite y ésta aumenta con el tiempo de fritura. Un fenómeno similar pero a menor escala ocurre con la fritura a vacío a 90 °C, mientras que a 100 y 110 °C la ganancia es muy pequeña.

Tras una revisión bibliográfica y ajustes de los datos experimentales a otros modelos aplicados a la ganancia de aceite en el proceso de fritura se obtuvieron los parámetros que se recogen en la Tabla III.6. para cada uno de los modelos seleccionados. La mayor parte de estos modelos representan el contenido de aceite de la muestra en base seca (Y , $g_{aceite}/g_{muestra}$

seca) en función del tiempo de fritura y diversas constantes que pueden ser relacionadas con el comportamiento de las muestras en relación a la ganancia de aceite. Los modelos analizados presentaron bajos coeficientes de correlación por lo que no se muestran en la tabla, como parámetro estadístico del ajuste se muestra el SEE (Standard Error of Estimate). Hay que decir que la mayoría de estos modelos han sido utilizados para fritura de productos vegetales como chips de patata, zanahoria o manzana (Shyu y Hwang, 2001; Fan et al., 2005b; Shyu et al., 2005; Mariscal y Bouchon, 2008b; Da Silva y Moreira, 2008; Nunes y Moreira, 2009; Troncoso et al., 2009) y que no se han encontrado en la bibliografía modelos adaptados a la fritura a vacío de productos como carne o pescado, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar modelos no empíricos que tengan en cuenta factores como la estructura, porosidad, composición, equilibrio de presiones y condiciones de trabajo durante el proceso de fritura a vacío. Como se comentó anteriormente la modelización del proceso de fritura bajo el prisma del estudio de las operaciones de transferencia de materia y calor del medio poroso (Halder et al., 2007; Datta, 2007) puede ser una solución que permita definir adecuadamente lo que ocurre en este proceso en el que coexisten cambios de fase, presiones, temperaturas, tamaño, etc., que se traducen en estados de no equilibrio durante el procesado.

Tabla III.6. Parámetros de ajuste para modelos cinéticos empleados para la ganancia de aceite en el proceso de fritura.

Temperatura °C		90	100	110	165
Presión de trabajo		Vacío	Vacío	Vacío	Atmosférica
Gamble et al. (1987)	$y_0=a$	0,1565	0,1785	0,1548	0,1613
$Y = a - bt^{1/2}$	$a=-b$	0,0019	0,0002	0,0001	0,0052
	SEE	0,0355	0,0274	0,0342	0,0214
Moreira et al. (1995)	$a=Ye$	0,1965	0,184	0,1572	0,2636
Krokida et al. (2000)	$b=k_y$	0,0206	0,8204	1,0729	0,017
Budzaki and Segura (2005)	SEE	0,0522	0,0405	0,0503	0,052
$Y = Y_e [1 - e^{-k_y t}]$					
Nielsen (2004)	a	0,2095	0,184	0,1572	0,2944
$Y = \frac{at}{b+t}$	b	23,5802	3,12E-09	2,10E-08	39,9165
	SEE	0,0522	0,0405	0,0503	0,0497
Chen and Ramaswamy (2002)	$y_0 = A_0$	0,1542	0,1059	0,1418	0,1694
Moreira et al. (2009)	$x_0 = t_0$	171,4411	0,0035	208,187	197,2497
$Y = A_0 + \frac{A}{1 + e^{-k_i(t-t_0)}}$	$a = A$	0,0469	0,0781	0,0255	0,1197
	$b = -1/k_t$	34,7508	0,0051	0,7945	101,7637
	SEE	0,0327	0,0245	0,032	0,0198
Chen and Ramaswamy (2002)	$y_0 = Y_e$	0,1426	0,1931	0,1572	0,316
$\frac{Y - Y_e}{Y_0 - Y_e} = Ae^{-kt}$	$a = (Y_0 - Y_e) * k$	0,04273	-0,0121	-0,0067	-0,1433
	$b = k$	9,96E-12	6,92E-12	1	0,0028
	SEE	0,0376	0,0274	0,0342	0,0202

Para terminar este análisis, en las Figuras III.8. y III.9. se presenta el comportamiento simultáneo de la pérdida de agua y de la absorción de aceite durante el proceso de fritura a vacío y a presión atmosférica. En estas figuras se puede observar como evolucionan ambos parámetros en función del tratamiento y la relación entre la cantidad de agua perdida y la absorción de aceite durante la fritura.

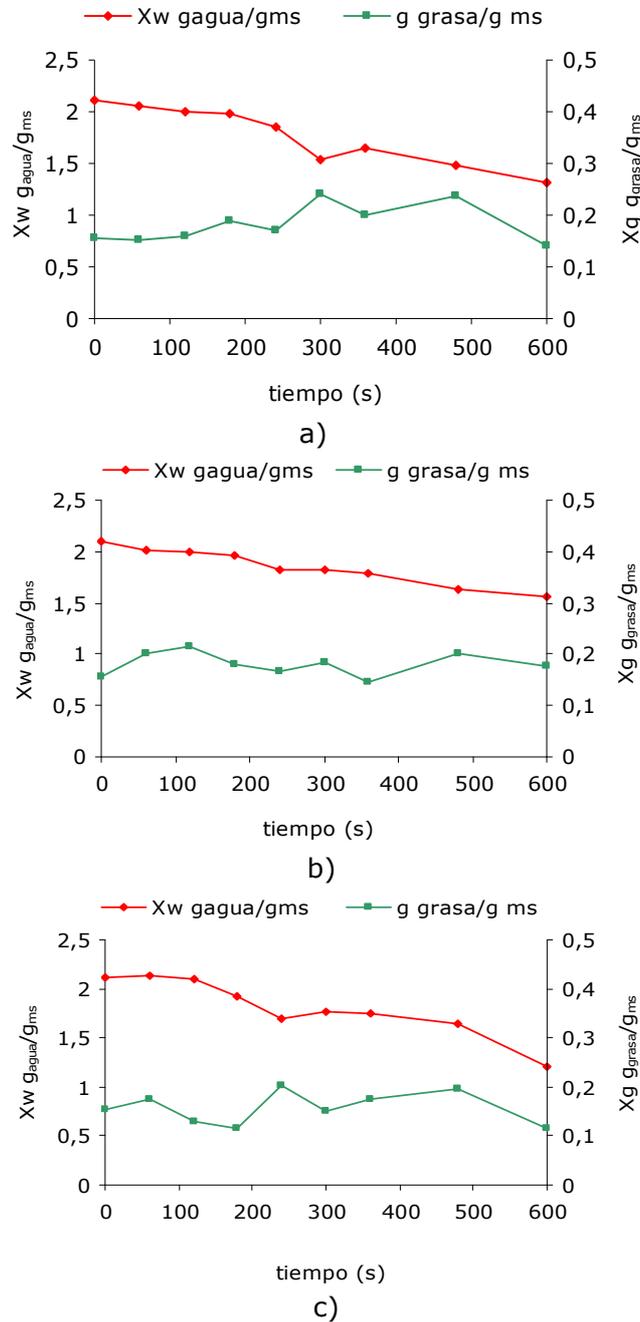


Figura III.8. Evolución de la humedad y del contenido de aceite de los filetes de dorada (*Sparus aurata*): a) 90 °C y 15 kPa; b) 100 °C y 20 kPa; c) 110 °C y 25 kPa.

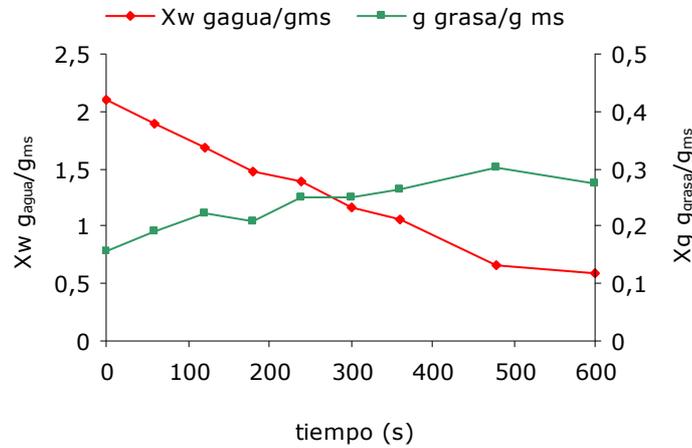


Figura III.9. Evolución de la humedad y del contenido de aceite de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) a 165 °C y presión atmosférica.

La reducción del contenido de aceite en las muestras fritas en condiciones de vacío podría deberse a una menor pérdida de humedad en dichas muestras (para un mismo tiempo de fritura). Altas temperaturas (como la utilizada en fritura a presión atmosférica) induce cambios estructurales, como consecuencia de la degradación de los tejidos y los constituyentes del producto, que aumentan la absorción de aceite por parte de éste. La pérdida de humedad es un factor importante y limitante en la absorción de aceite (Gamble et al., 1987; Pinthus et al., 1993). De hecho la cantidad de agua eliminada durante el proceso determina la formación de la costra en el producto que posteriormente definirá la cantidad de aceite final.

La relación entre la pérdida de agua y la ganancia de aceite podría ser entendida de dos modos: por una parte se puede pensar que la cantidad de agua eliminada definirá el volumen vacío que podrá ser ocupado posteriormente por aceite o que ambas

cantidades, pérdida de agua y ganancia de aceite, están determinadas por la formación de una corteza con unas características de permeabilidad determinadas que condicionará la fracción de agua y de aceite presente en el producto frito (Mariscal y Bouchon, 2008a).

5.1.1.4. Cambios en la forma de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) debido al tratamiento de fritura

El encogimiento experimentado por las muestras debido al tratamiento de fritura se evaluó según lo expuesto en el apartado 4.3.9. de materiales y métodos. En la Figura III.10. se muestra el porcentaje de encogimiento de los filetes de dorada fritos a presión atmosférica y a vacío para los diferentes tiempos de tratamiento.

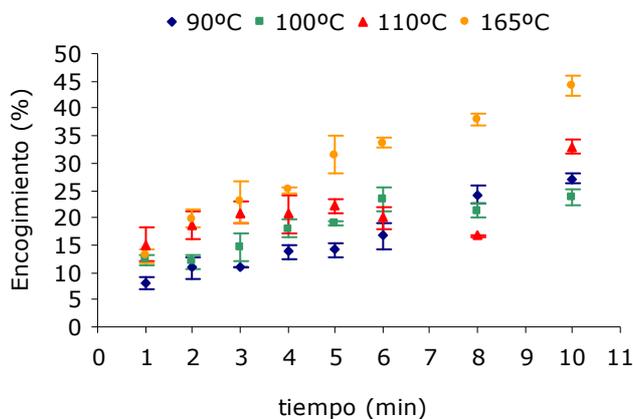


Figura III.10. Grado de encogimiento de los filetes de dorada para cada tiempo y temperatura de tratamiento de fritura aplicado.

El tratamiento a presión atmosférica es el que ocasiona un mayor descenso del volumen de los filetes alcanzando valores de 44,11% de encogimiento respecto a la muestra fresca para diez minutos de tratamiento. Para el tratamiento de fritura a vacío los

valores de encogimiento a los diez minutos fueron del 27,1% a 90 °C, 23,7% a 100 °C y 33% a 110 °C. El análisis estadístico mostró que, para los datos correspondientes a las temperaturas de vacío, la interacción entre el tiempo y la temperatura fue significativa ($p \leq 0,05$), siendo en este caso el tiempo la variable que más peso presentó en la interacción. A partir de los tres minutos de proceso las diferencias en el encogimiento experimentado por las muestras fueron significativas para las tres temperaturas estudiadas (Figura III.10.), siendo también significativas ($p \leq 0,05$) las diferencias entre dichas temperaturas de vacío. En el caso de la fritura a presión atmosférica (165 °C) los análisis estadísticos también mostraron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) del tiempo de tratamiento, apareciendo dichas diferencias a los dos minutos de proceso. A mayor tiempo de tratamiento se produjo un mayor grado de encogimiento para las temperaturas y condiciones estudiadas, tal y como era de esperar.

En la Figura III.11. se puede apreciar de manera visual el encogimiento de los filetes antes y después del tratamiento. El encogimiento experimentado por las muestras tratadas a presión atmosférica es mayor debido a la mayor pérdida de peso (agua) que se produjo en dichos filetes.

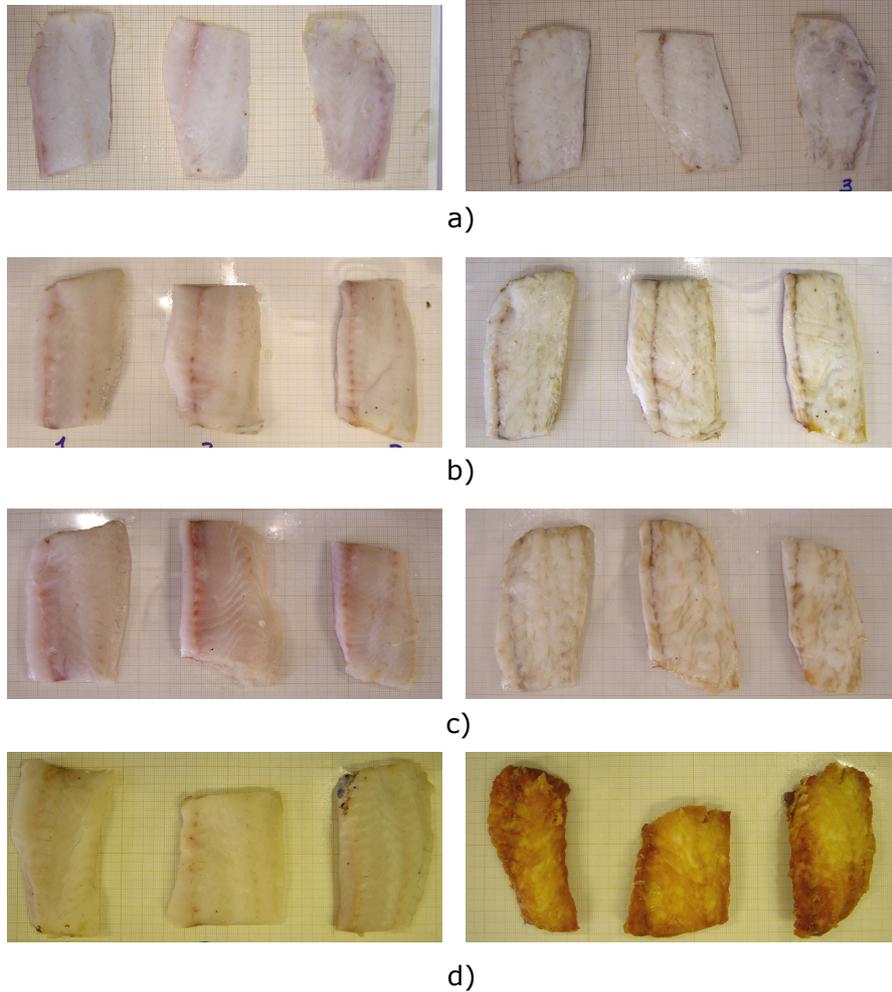


Figura III.11. Aspecto de los filetes de dorada antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento de fritura durante 10 minutos. (a) 90 °C vacío, (b) 100 °C vacío, (c) 110 °C vacío y (d) 165 °C presión atmosférica.

Como se ha comentado en el apartado 5.1.1.2. del presente capítulo, el tratamiento térmico afecta a la estructura de las proteínas modificando su configuración y disminuyendo su capacidad de retención de agua. Las proteínas se contraen y

agregan por efecto de la temperatura, el complejo actomiosina va a contraerse en mayor o menor medida dependiendo de la intensidad del tratamiento (temperatura) y del tiempo. Así pues, los resultados obtenidos muestran que tratamientos a temperaturas más suaves (90-100 °C) mantienen mejor la estructura del producto y su tamaño.

Para intentar modelizar la reducción de tamaño de los filetes de dorada, los datos de encogimiento se ajustaron a un modelo semiempírico en función de la raíz cuadrada del tiempo (ecuación III.7.) tal como muestra la Figura III.12. Los parámetros de este ajuste se muestran en la Tabla III.7. Excepto para la temperatura de 110 °C, en el tratamiento a vacío se obtuvieron coeficientes de correlación elevados. Como se puede observar los valores obtenidos para el parámetro "b" muestran un incremento de la velocidad del encogimiento con la temperatura de tratamiento, siendo mucho mayor para la fritura realizada a presión atmosférica a 165 °C.

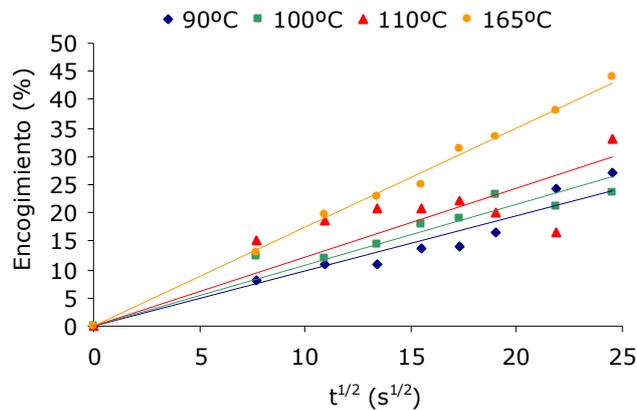


Figura III.12. Ajustes obtenidos para predecir el grado de encogimiento experimentado por los filetes de dorada con el modelo empírico de la raíz cuadrada del tiempo para la fritura a

presión atmosférica (165 °C) y en condiciones de vacío continuo (90, 100 y 110 °C).

Tabla III.7. Coeficientes de regresión (R^2) y parámetros de ajuste para los dos modelos empíricos empleados para el encogimiento de los filetes de dorada.

Temperatura °C		90	100	110	165
Presión de trabajo		Vacío	Vacío	Vacío	Atmosférica
Modelo de	b (s^{-1})	0,981	1,078	1,2220	1,7550
la raíz	R^2	0,931	0,913	0,656	0,994
cuadrada					

5.1.2. Análisis factorial de las muestras tratadas a vacío

El análisis factorial llevado a cabo es capaz de explicar el 94,445% de la variabilidad mostrada por los datos (Tabla III.8.) mediante dos factores. El primer factor explica el 64,609% de la variabilidad y recoge las variables: pérdida de peso, humedad y encogimiento mientras que, el factor 2 explica el 29,836% de la variabilidad y recoge la variable: contenido en grasa, tal y como se observa en la Tabla III.9.

Tabla III.8. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.

Factor	%Explicado	%Acumulado
1	64,609	64,609
2	29,836	94,445

Tabla III.9. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.

	Factor 1 Jugosidad	Factor 2 Grasa
ΔM	0,975	
Encogimiento	0,955	
Humedad	-0,834	
Grasa		0,980

La Figura III.13. muestra la distribución en el plano factorial de las diferentes muestras y variables estudiadas. Tras analizar los resultados de los apartados anteriores y observando el resultado obtenido en el análisis factorial podríamos recomendar como temperatura de fritura a vacío 110 °C ya que parece ser la que, de manera general, supone un menor contenido graso con unas pérdidas de humedad, peso y encogimiento razonables.

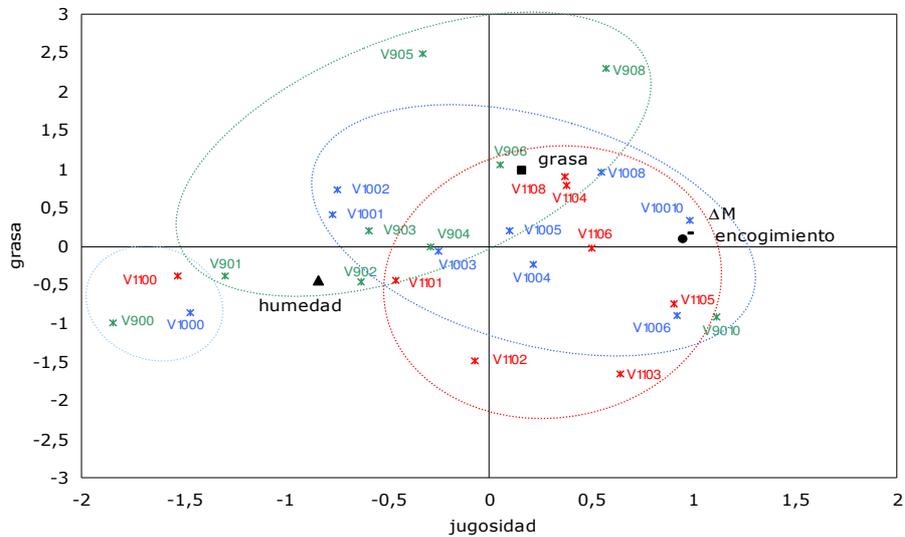


Figura III.13. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas. El código de las muestras es V (vacío), los siguientes dos o tres

dígitos la temperatura de fritura (90, 100 ó 110 °C) y los últimos dígitos el tiempo de fritura (de 0 a 10 minutos).

5.1.3. Calidad del aceite de fritura

El aceite utilizado es determinante en la calidad y rendimiento resultante del proceso de fritura. Durante el proceso de fritura se producen diversos cambios físicos y químicos tanto en el aceite como en el alimento, aunque no deben tomarse automáticamente como signos de deterioro indeseable o perjudicial.

El alimento a lo largo de la fritura experimenta los siguientes procesos:

El agua se va liberando continuamente del alimento al aceite caliente, dando lugar a un efecto de destilación en corriente de vapor que arrastra los productos de oxidación volátiles del aceite.

El agua liberada agita el aceite y acelera la hidrólisis, dando lugar a un incremento de los ácidos grasos libres (Fennema, 1993). Durante la fritura, los compuestos volátiles pueden desarrollarse en el alimento por sí mismo o por la interacción entre el alimento y el aceite.

La presencia de oxígeno en la fritura tradicional, induce una serie de reacciones de oxidación que conducen a la formación de hidroperóxidos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos y ésteres. Las temperaturas altas, los tiempos de fritura largos y la presencia de contaminantes metálicos favorecen una mayor descomposición del aceite. En condiciones de vacío continuo se reduce el contenido de oxígeno y la temperatura de trabajo y por tanto el deterioro experimentado por el aceite debe ser menor.

Para estudiar la calidad del aceite a lo largo del proceso de fritura, se midió el porcentaje de compuestos polares (CP) presentes en el aceite antes del tratamiento de fritura y después

según la metodología descrita en el apartado 4.3.6. de materiales y métodos.

En la Tabla III.10. se muestran los valores obtenidos para el porcentaje de compuestos polares del aceite utilizado en los diferentes tratamientos aplicados.

Tabla III.10. Porcentaje de compuestos polares presentes en el aceite después de la fritura en función de la temperatura. Valores promedio (SD).

Temperatura (°C)	%CP _{promedio}	%CP máx
90	15,01 (0,01)	16,7
100	14,13 (0,88)	15,5
110	14,19 (0,84)	15
165	14,63 (1,62)	17

De las técnicas existentes para la determinación del deterioro de la calidad del aceite, el análisis de sustancias polares (criterio internacionalmente aceptado) es el que mejor permite determinar el punto de descarte de los aceites para asegurar su calidad degustativa y nutricional. La determinación de la formación de compuestos polares (CP) es utilizada en la legislación de muchos países como criterio para la estimación de la calidad de un aceite en el proceso de fritura (Dobarganes et al., 1988). Esencialmente el procedimiento mide el deterioro estructural de los ácidos grasos y su transformación en estructuras poliméricas con carga eléctrica (polares). Siguiendo la normativa española, según la orden del 26 de enero de 1989 para aceites y grasas comestibles calentados (Anónimo, 1989) el porcentaje máximo permitido de compuestos polares es del 25%, determinados siguiendo una metodología específica que, aunque no es la utilizada en la presente tesis, permite tener un criterio objetivo para la discusión de los resultados. El mayor porcentaje de compuestos polares se mostró

en el tratamiento de fritura tradicional a 165 °C, aunque hay que decir que las variaciones entre los tratamientos no fueron significativas ($p > 0,05$) debido a la corta duración de los ciclos y la renovación del aceite para cada uno de los tratamientos realizados. No obstante, en un proceso industrial donde la reutilización y las cantidades de aceite que se utilizan son mucho mayores, las diferencias entre los tratamientos realizados a presión atmosférica a 165 °C y los realizados a menores temperaturas en condiciones de vacío podrían ser más acusadas, siendo la utilización de vacío un factor a considerar en la elección del tratamiento.

5.1.4. Evolución del color en los filetes

El color es un parámetro que, en los procesos de fritura, puede ser determinante en la aceptación del producto.

En la Figura III.14. se puede observar la evolución de la luminosidad (L^*) en función del tratamiento y del tiempo de proceso. El tratamiento en condiciones de vacío (90, 100 y 110 °C) mostró valores más elevados de L^* que los obtenidos para el tratamiento en condiciones de presión atmosférica (165 °C). L^* es un parámetro crítico para la industria de los productos fritos y normalmente se emplea como parámetro de calidad de gran importancia. Altos valores de L^* son asociados principalmente con reacciones de pardeamiento no enzimático (Mariscal y Bouchon, 2008a). Debido al tratamiento térmico se produce la coagulación proteica produciendo cambios tanto en la textura como en el color del producto. En el caso del color, la coagulación proteica va a producir una mayor opacidad en el producto que junto con la pérdida de agua de constitución va a dar como resultado una pérdida de luminosidad. El análisis estadístico de los datos correspondientes a las temperaturas de vacío mostró que la

interacción entre el tiempo y la temperatura fue significativa ($p \leq 0,05$) y en este caso fue la temperatura la variable que mayor influencia presentó en los cambios encontrados en la coordenada L^* . La temperatura de 100 °C fue la que mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a 90 y 110 °C. El tiempo produjo un incremento significativo de los valores de luminosidad a partir del primer minuto de proceso independientemente de la temperatura estudiada y a partir de los dos minutos de tratamiento se mantuvieron los valores estables ($p > 0,05$). En las muestras tratadas a presión atmosférica (165 °C) el tiempo de tratamiento mostró un efecto significativo ($p \leq 0,05$) produciendo un incremento de la coordenada L^* al inicio del proceso que posteriormente fue descendiendo hasta el final del tratamiento.

La coordenada a^* (Figura III.14.), sin embargo, se incrementó considerablemente en el caso de la fritura a presión atmosférica pasando de valores negativos (verdosos) a valores positivos (rojizos) a partir de los 5 minutos de tratamiento. Este comportamiento puede ser explicado en base a la modificación sufrida por los azúcares. La principal reacción de los azúcares es la de Maillard (pardeamiento no enzimático), reacción que se produce entre los grupos amino libres de aminoácidos, péptidos o proteínas y los grupos carbonilo de los azúcares u otros aldehídos o cetonas. Diversos productos intermedios, que reciben el nombre de productos de Amadori, o premelanoidinas, son rápidamente polimerizados a la temperatura de fritura formando macromoléculas de color oscuro (melanoidinas). Este oscurecimiento se acelera a temperaturas superiores a 150 °C. Otros compuestos volátiles se originan como productos secundarios de la reacción y participan en el flavor y aroma del producto frito (pirazinas). En el tratamiento a presión atmosférica la temperatura

de trabajo es de 165 °C y la coordenada a^* evoluciona hacia colores marrones debido a las reacciones de Maillard. El tiempo de tratamiento mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el caso de la fritura a presión atmosférica mostrando dichas diferencias a partir de los cuatro minutos de tratamiento. La fritura a vacío, presentó un comportamiento similar al comentado para la luminosidad siendo también la temperatura la variable que mostró un mayor efecto en las variaciones encontradas en la coordenada a^* . Sin embargo, en este caso, los valores permanecen negativos a lo largo de todo el proceso debido a que, tal y como se observa en la Figura III.11., las muestras no presentan reacción de Maillard. Así mismo, en la Figura III.14. se puede observar como la coordenada colorimétrica b^* evoluciona en el mismo sentido que a^* , mostrando mayores valores para el tratamiento a presión atmosférica que para los tratamientos a vacío.

Respecto a los valores del tono (h_{ab}^*) y del croma (C_{ab}^*), el mayor descenso se produjo al minuto de tratamiento y continuó descendiendo ligeramente hasta los 10 minutos. Esta disminución fue mayor en los tratamientos realizados a presión atmosférica en los que la variación de color fue mayor debido a los efectos de la fritura a altas temperaturas. La temperatura fue la variable que mayor efecto tuvo en las coordenadas estudiadas para las temperaturas de vacío analizadas y el tiempo tuvo una influencia significativa en dichas coordenadas para el tratamiento a presión atmosférica (165 °C).

La observación (Figura III.11.) de las muestras tras el tratamiento resulta coherente con los resultados de las medidas espectrocolorimétricas ya que, las muestras fritas en condiciones de presión atmosférica presentan un aspecto más oscuro y más rojizo que las fritas en condiciones de vacío debido principalmente,

como ya se ha comentado antes, a la reacción de Maillard que no se da en las muestras tratadas a vacío en las condiciones estudiadas.

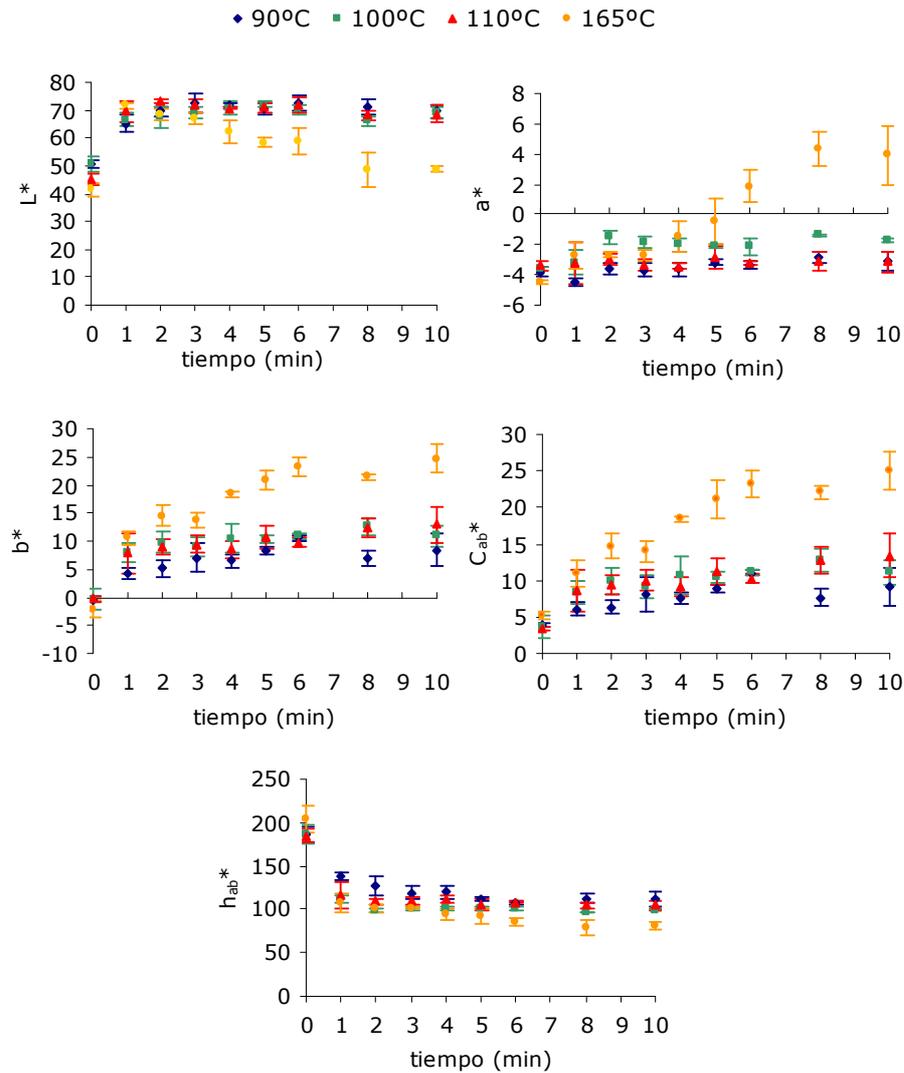


Figura III.14. Evolución de L*, a*, b*, h_{ab}* y C_{ab}* con el tiempo de tratamiento para cada temperatura empleada.

En general podemos decir que, comparada con la fritura tradicional, la fritura a vacío de filetes de dorada puede suponer una reducción del contenido de aceite de las muestras. La fritura a presión atmosférica supone además una mayor pérdida de peso y encogimiento. No obstante, en el proceso de fritura a vacío el producto no adquiere los colores característicos de los productos fritos al trabajar a bajas temperaturas. Así pues, el proceso de fritura a vacío para filetes de dorada puede ser una alternativa para obtener productos de dorada en la elaboración de preparaciones culinarias con unos adecuados atributos composicionales. De entre los tratamientos ensayados la fritura a vacío a 110 °C es la que aporta un menor contenido graso con unas pérdidas de humedad, peso y encogimiento razonables por lo que estas podrían ser unas condiciones adecuadas para la aplicación de este tratamiento.

5.2. Cocción

Tal y como se ha comentado en la introducción, la cocción de los alimentos envasados al vacío no es una técnica nueva. La técnica del "papillote" fue la precursora del sistema *sous-vide* (Schellekens y Martens, 1992).

Existen numerosos trabajos publicados sobre cocina *sous-vide*, sin embargo la bibliografía disponible sobre el estudio de la cocción a vacío continuo (*cook-vide*) es aún muy escasa. En este apartado se muestran los resultados obtenidos para la aplicación de esta técnica en filetes de dorada (*Sparus aurata*).

5.2.1. Caracterización y estudio cinético de los parámetros físico-químicos en el proceso de cocción

En este apartado se va a analizar cómo afecta el proceso de cocción en condiciones de vacío continuo (70, 80 y 90 °C) y a

presión atmosférica (100 °C) a la pérdida de peso, de humedad, cambios en el contenido proteico y graso, perfil lipídico, variaciones de tamaño y variaciones de color en filetes de dorada. Por otra parte, se van a estudiar las cinéticas de pérdida de agua para su mejor comprensión.

5.2.1.1. Perfil de temperaturas durante el proceso de cocción

El perfil de temperaturas de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) se obtuvo midiendo la temperatura en el centro del filete inmediatamente después del proceso de cocción (Figura III.15.).

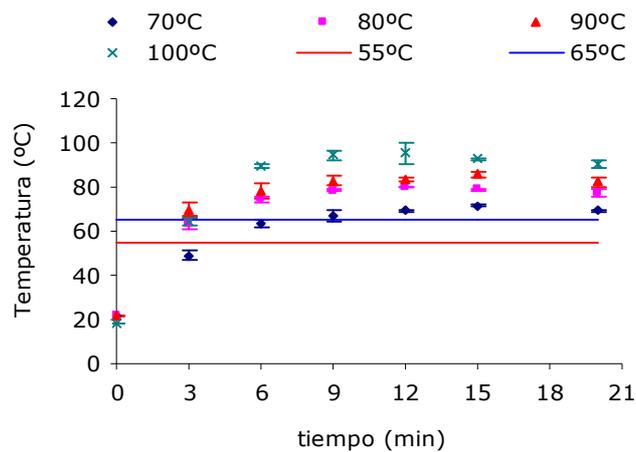


Figura III.15. Perfil de temperaturas en filetes de dorada tratados a vacío (70 °C, 80 °C y 90 °C) y a presión atmosférica (100 °C).

Como se observa en la Figura III.15. la temperatura en el centro de producto fue incrementándose hasta alcanzar la temperatura de consigna del medio de cocción para cada caso. Las presiones asociadas a las temperaturas de trabajo fueron para 70 °C, 31 kPa, para 80 °C, 47 kPa y para 90 °C 69 kPa, que se

corresponden con las presiones de ebullición del agua a las temperaturas de trabajo. Por otra parte y desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, tal y como se puede observar en la Figura III.15. la temperatura en el centro del filete fue superior a 60 °C a los 6 minutos de cocción para todos los tratamientos estudiados (60 °C es la mínima temperatura que debe de alcanzar el centro de producto de acuerdo con la legislación española, R.D. 1420/2006). Se puede decir que 6 minutos de tratamiento sería el tiempo que asegura la calidad microbiológica para todas las temperaturas estudiadas.

5.2.1.2. Variación de peso

En la Figura III.16. se muestra la pérdida de peso experimentada por los filetes de dorada para los tratamientos estudiados.

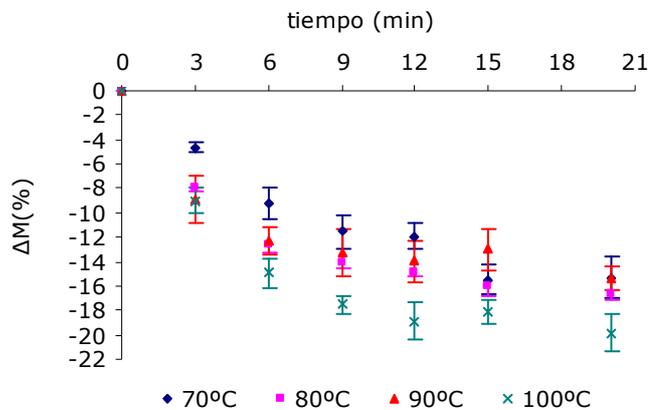


Figura III.16. Variación de peso de los filetes de dorada en función del tiempo para las diferentes temperaturas de trabajo empleadas.

Las pérdidas de peso oscilaron entre 15(1)% para largos tiempos de cocción a vacío (20 min) a 70 °C y 19(1)% para la cocción a presión atmosférica a 100 °C. Tanto el tiempo de

tratamiento como la temperatura mostraron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) en la variación de peso para el tratamiento a vacío (70, 80 y 90 °C), siendo el tiempo la variable que mostró un mayor peso en la interacción. En la Figura III.16. se observa una mayor pérdida de peso conforme aumenta el tiempo de tratamiento ($p \leq 0,05$) para las tres temperaturas en los tratamientos a vacío estudiados y el mismo efecto sucede para el tratamiento a presión atmosférica (100 °C) siendo en este caso las pérdidas de peso más acusadas.

En la cocción de carnes la temperatura crítica de tratamiento está alrededor de 60 °C cuando el colágeno comienza a contraerse y se produce la contracción de las proteínas miofibrilares y la consecuente expulsión de jugo del interior del músculo. Sin embargo, en el pescado el colágeno no juega exactamente el mismo papel puesto que la capacidad que tiene de contraerse es muy débil y generalmente colapsa antes de que se produzca la coagulación (Cheftel y Cheftel, 1992). En el pescado son principalmente las fibras musculares (actina y miosina) y la coagulación de éstas las que determinan su textura. Las proteínas musculares del pescado son más sensibles al tratamiento térmico que las del tejido animal.

5.2.1.3. Evolución de la pérdida de agua de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) debido al tratamiento de cocción

El contenido de humedad de los filetes de dorada en fresco fue de 69,3(0,3) g agua/100 g producto. Este valor de humedad es similar al reportado por otros autores (Yeannes y Almandos, 2003). La Figura III.17. muestra la evolución del contenido de humedad de las muestras en función del tiempo de cocción. Las variaciones experimentadas por las muestras fueron menores al 5,5% para

tiempos de cocción largos (20 min). El tratamiento a vacío a 80 °C es el que mostró una menor pérdida de humedad (68,30(0,07)%) dando lugar por tanto a muestras más jugosas.

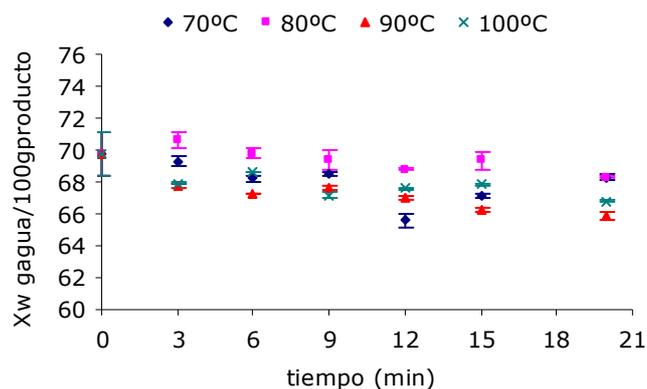


Figura III.17. Variación de la humedad experimentada por los filetes de dorada (*Sparus aurata*) en función del tratamiento empleado.

La interacción entre el tiempo y la temperatura para las temperaturas de vacío estudiadas resultó significativa ($p \leq 0,05$) siendo en este caso la temperatura el factor que mostró un mayor peso en la interacción. El tratamiento llevado a cabo a vacío a 80 °C es el que presentó mayores valores de humedad, siendo las diferencias significativas entre dicha temperatura y 70 y 90 °C. A partir de los 9 minutos de tratamiento los valores de humedad disminuyen significativamente ($p \leq 0,05$) para las tres temperaturas de vacío estudiadas. Los tiempos cortos de tratamiento (entre 0-9 min) y los tiempos largos (entre 12-20 min) no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Los cambios estructurales producidos durante el tratamiento térmico son los responsables de la pérdida irreversible de agua en el filete. El tratamiento a presión atmosférica (100 °C) también mostró un descenso significativo

($p \leq 0,05$) del contenido de humedad de los filetes debido al tiempo de tratamiento.

Al igual que en el estudio del proceso de fritura, para modelizar la pérdida de agua se aplicaron expresiones empíricas sencillas análogas a las que se utilizan en el secado a presión atmosférica. De entre estos modelos tal como se ha expuesto en el apartado 4.5 de materiales y métodos para el ajuste de los datos experimentales, se han utilizado el modelo de raíz cuadrada del tiempo (ecuación III.7) y el de caída exponencial (ecuación III.8). En la Figura III.18. se recogen los ajustes gráficos obtenidos tras la aplicación de ambos modelos.

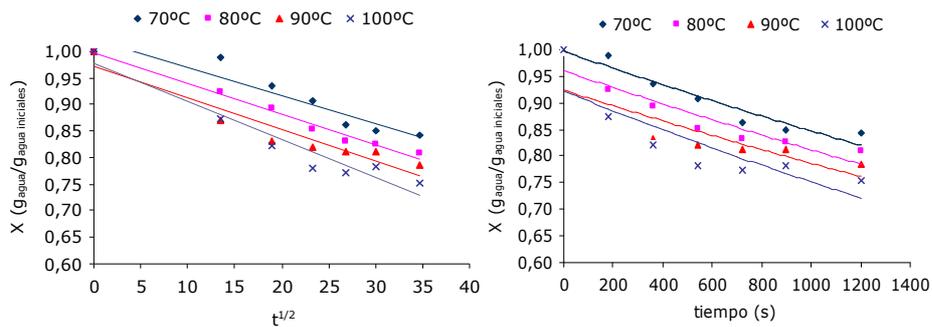


Figura III.18. Ajustes obtenidos para predecir la pérdida de agua con el modelo empírico de la raíz cuadrada del tiempo (izquierda) y el modelo exponencial (derecha) para la cocción a presión atmosférica (100 °C) y en condiciones de vacío continuo (70, 80 y 90 °C).

En la Tabla III.11. se pueden observar los parámetros de ajuste (a , b , X_0 y k) y el coeficiente de correlación obtenidos en cada caso para ambos modelos aplicados.

Tabla III.11. Coeficientes de regresión (R^2) y parámetros de ajuste para los dos modelos empíricos empleados para la pérdida de agua.

Temperatura °C		70	80	90	100
Presión de trabajo		Vacío	Vacío	Vacío	Atmosférica
Modelo de la raíz cuadrada	a	1,0763	0,9936	0,9007	0,9263
	b (s^{-1})	0,0073	0,0056	0,0031	0,0053
	R^2	0,948	0,960	0,688	0,863
	X_0	0,996	0,960	0,923	0,921
Modelo exponencial	k (s^{-1})	0,000163	0,000168	0,000161	0,000205
	R^2	0,926	0,879	0,695	0,747

Como se puede observar en la tabla, para ambos modelos las pendientes no parecen seguir una tendencia definida. Lo que si que se observa en los valores asignados a las ordenadas en origen para ambos modelos (a y X_0) es que a 70 y 80 °C se presentan valores más próximos a la unidad, que es el valor correspondiente a tiempo cero, mientras que para 90 y 100 °C presentan valores algo menores. Esto nos puede hacer pensar que es a tiempos muy cortos donde se producen las mayores pérdidas de humedad a temperaturas más elevadas.

5.2.1.4. Evolución del contenido proteico y graso de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) debido al tratamiento de cocción

El contenido proteico y graso de los filetes de dorada se evaluó siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.3.4. y 4.3.5. de materiales y métodos del presente capítulo para el filete fresco y a los 9 y 20 minutos de cocción para los distintos tratamientos. El contenido proteico inicial de los filetes de dorada en fresco fue de 20,3(0,3) g proteína/ 100 g muestra (Tabla III.12.). El contenido proteico de los filetes tratados a vacío se incrementó de 98% a 118% debido a la pérdida de humedad experimentada por el filete.

Estos valores fueron similares a los reportados por Kumar y Aalbersberg (2006) para filetes de pescado tratados por microondas. Los valores obtenidos para el contenido proteico no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en función de la temperatura aplicada para el tratamiento a vacío (70, 80 y 90 °C). El descenso en el contenido de humedad ha sido descrito como el cambio más destacado que hace que el contenido proteico y graso aumente en los filetes tratados térmicamente (García-Arías et al., 2003) siendo el factor significativo ($p \leq 0,05$) en estos cambios el tiempo de tratamiento.

Tabla III.12. Efecto de las condiciones de cocción (temperatura, tiempo y método de cocción) sobre el contenido proteico de los filetes de dorada (*Sparus aurata*).

Tiempo (min)	CV*			PA*
	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
	% contenido proteico			
0	20,3 (0,6) ^(a)	20,3 (0,6) ^(a)	20,3 (0,6) ^(a)	20,3 (0,6) ^(a)
9	23,1 (0,5) ^(b)	24,6 (0,3) ^(b)	23,9 (0,9) ^(a)	25,4 (0,6) ^(b)
20	23,3 (0,4) ^(b)	24,5 (0,5) ^(b)	24,3 (0,4) ^(a)	27,8 (0,6) ^(c)

*CV: cocción a vacío (Cook-vidé); *PA: presión atmosférica

Las letras significan diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) entre tiempos para una misma temperatura.

El tiempo de tratamiento implicó un aumento en el contenido graso apareciendo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) después de 20 minutos de tratamiento (Tabla III.13.). Como se comentó para el caso de la proteína, estos cambios (aumento del contenido graso) están asociados a la pérdida de agua de las muestras que implica un incremento porcentual del contenido graso.

Tabla III.13. Efecto de las condiciones de cocción (temperatura, tiempo y método de cocción) sobre el contenido graso de los filetes de dorada (*Sparus aurata*).

Tiempo (min)	CV*			PA*
	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
	% grasa total			
0	5,3 (1,3) ^(a)	5,3 (1,3) ^(a)	5,3 (1,3) ^(a)	5,3 (1,3) ^(a)
9	7,3 (0,5) ^(b)	6,5 (0,4) ^(a)	6,4 (0,5) ^(ab)	6,6 (0,3) ^(b)
20	7,4 (0,3) ^(b)	6,2 (0,3) ^(a)	7,5 (0,6) ^(b)	6,9 (0,6) ^(b)

*CV: cocción a vacío (Cook-vide); *PA: presión atmosférica

Las letras significan diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) entre tiempos para una misma temperatura.

Para detectar posibles cambios en la composición en los ácidos grasos de las muestras por efecto de la temperatura o la mayor presencia de oxígeno durante la cocción (tratamientos a vacío o presión atmosférica) se realizó un análisis del perfil lipídico de las muestras al tiempo más largo de tratamiento (20 minutos). La Tabla III.14. muestra las concentraciones de cada uno de los ácidos grasos expresadas como un porcentaje del contenido total para los filetes de dorada tras veinte minutos de cocción.

La Tabla III.15. muestra, agrupados en función del grado de insaturación, los ácidos grasos de los filetes de dorada, así como los porcentajes correspondientes a las series n-3 y n-6.

Tabla III.14. Perfil lipídico para filetes de dorada tras veinte minutos de cocción tratados a vacío (70, 80 y 90 °C) y a presión atmosférica (100 °C).

TEMPERATURA TRATAMIENTO	Fresca	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
ÁCIDOS GRASOS	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
C14:0 Mirístico	1,91	2,02	1,62	1,58	1,78
C14:1 Miristoleico	1,94	0,00	0,06	0,05	0,06
C15:0 Pentadecanoico	0,27	0,27	0,25	0,24	0,26
C16:0 Palmítico	16,03	16,51	17,12	17,02	18,10
C16:1 Palmitoleico	4,06	3,99	3,46	3,49	3,54
C17:0 Heptadecanoico	0,29	0,29	0,31	0,31	0,31
C17:1 cis-10-Heptadecenoico	0,27	0,26	0,41	0,39	0,46
C18:0 Esteárico	4,26	4,51	4,91	5,01	5,08
C18:1(n9)t. Eláidico	0,00	0,00	0,14	0,15	0,10
C18:1(n9)c. Oleico	20,29	19,41	18,63	18,84	18,96
C18:1 (n7)	2,54	2,51	2,37	2,52	2,39
C18:2(n6)c. Linoleico	20,41	19,70	18,90	19,12	19,27
C20:0 Araquídico	0,12	0,15	0,14	0,14	0,15
C18:3(n6) Gamma-Linolénico	0,14	0,13	0,12	0,13	0,07
C20:1(n9) Eicosenoico	1,24	1,24	1,14	1,14	1,23
C18:3(n3) Linolénico	1,96	1,83	1,72	1,76	1,86
C20:2(n6) Eicosadienoico	0,59	0,53	0,37	0,40	0,57
C22:0 Behénico	0,00	0,10	0,10	0,10	0,13
C20:3(n6) Cis-8,11,14-Eicosatrienoico	0,26	0,29	0,29	0,29	0,24
C22:1(n9) Erúcico	0,21	0,20	0,47	0,45	0,50
C20:3(n3) Cis-11,14,17-Eicosatrienoico	0,12	0,23	0,00	0,00	0,07
C20:4(n6) Arquidónico	1,24	1,39	1,62	1,67	1,85
C23:0 Tricosanoico	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
C22:2 Docosadienoico	0,76	0,62	0,62	0,59	0,55
C24:0 Lignocérico	0,16	0,00	0,09	0,09	0,10
C20:5(n3) Eicosopentanoico EPA	4,21	4,34	4,39	4,76	5,17
C24:1(n9) Nervónico	0,50	0,54	0,60	0,60	0,72
C22:6(n3) Docohexanoico DHA	16,22	18,94	20,16	19,16	16,49
TOTAL	100	100	100	100	100

Tabla III.15. Porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados con series n-3 y n-6 para filetes de dorada tras veinte minutos de cocción tratados a vacío (70, 80 y 90 °C) y a presión atmosférica (100 °C).

TEMPERATURA TRATAMIENTO	Fresca	70 °C	80 °C	90 °C	100 °C
ÁCIDOS GRASOS	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Saturados	23,05	23,85	24,54	24,50	25,90
Monoinsaturados	31,04	28,16	27,27	27,63	27,96
Poliinsaturados	45,91	47,99	48,19	47,87	46,13
Serie n-3	22,51	25,33	26,27	25,67	23,58
Serie n-6	22,64	22,03	21,30	21,61	22,01

Como se puede observar tanto en la Tabla III.14. como en la Tabla III.15. y al igual que ocurría para el contenido total de grasa, la cocción de los filetes de pescado en diferentes condiciones de tiempo y temperatura no suponen grandes cambios en el perfil lipídico. El tratamiento a presión atmosférica aumenta ligeramente la cantidad de ácidos grasos saturados, mostrando valores de 23,85% para los tratamientos a vacío a 70 °C y de 25,9% para los tratamientos a 100 °C a presión atmosférica. En general cuando se comparan los datos con los de la muestra fresca los tratamientos provocan un aumento de los ácidos grasos saturados y una disminución de los monoinsaturados. Esta tendencia es mayor al aumentar la temperatura. Tal y como se muestra en la Figura III.19. donde se puede ver la evolución de las series C16, C18, y de los ácidos grasos EPA y DHA, el tratamiento a vacío a 70 °C es el que mayor cantidad de ácido palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) retiene con respecto al filete fresco, mientras que los tratamientos a 100 °C (a presión atmosférica) y a 80 y 90 °C sufren mayores pérdidas. En cuanto al contenido del ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docohexanoico (DHA), tal y como otros autores (Gladyshev et al., 2006 y 2007) han reportado,

parece que el tratamiento térmico en general no disminuye el contenido de estos ácidos en el pescado. La cocción en vacío continuo podría contribuir a preservar algunos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (oleico y linoleico).

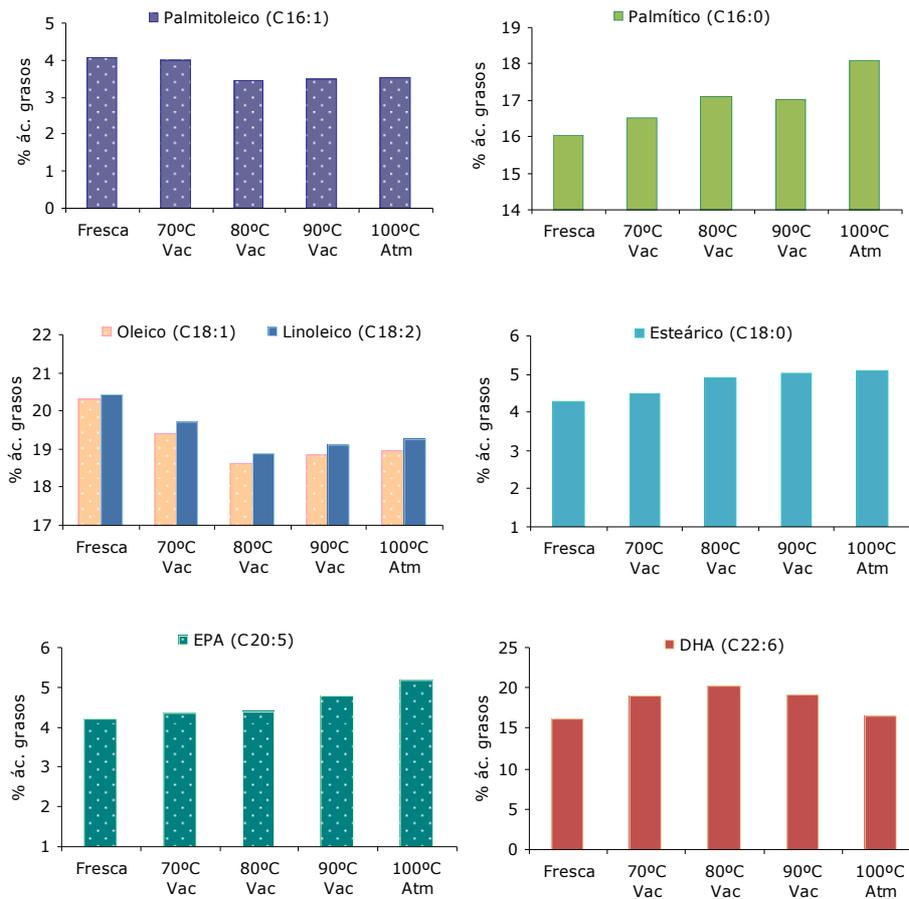


Figura III.19. Contenido de las series C16, C18, y de los ácidos grasos EPA y DHA para filetes de dorada tras veinte minutos de cocción tratados a vacío (70, 80 y 90 °C) y a presión atmosférica.

Tras analizar estos datos podemos pensar que si bien los diferentes tratamientos estudiados parecen no afectar al contenido

total en grasas del pescado, sí que puede resultar interesante para la conservación de algunos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (Figura III.19.) realizar tratamientos a vacío y a bajas temperaturas (70 °C).

5.2.1.5. Cambios en la forma de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) debido al tratamiento de cocción

Al igual que para los tratamientos de fritura a vacío, el encogimiento experimentado por las muestras debido al tratamiento de cocción se evaluó según lo expuesto en el apartado 4.3.9. de materiales y métodos. En la Figura III.20. se muestra el porcentaje de encogimiento de los filetes de dorada cocidos a presión atmosférica y a vacío para los tiempos de tratamiento de nueve y veinte minutos. La Figura III.21. muestra el aspecto de dichos filetes antes y después de su cocción.

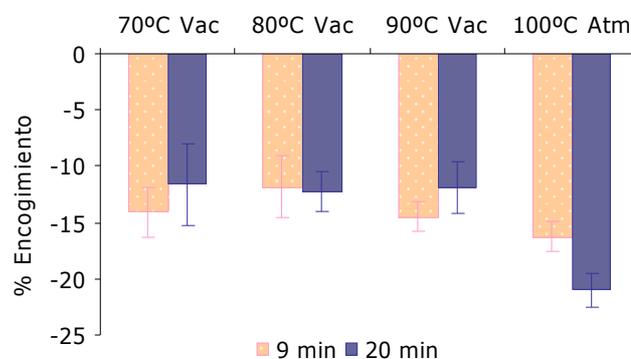


Figura III.20. Grado de encogimiento de los filetes de dorada para cada tiempo y temperatura de tratamiento de cocción aplicado.

El encogimiento más elevado (21(1)%) se obtuvo para las muestras tratadas a presión atmosférica durante 20 minutos y el menor para las muestras tratadas a vacío a 70 °C durante 20

minutos (11(3)%). El análisis estadístico de los datos no mostró interacción entre el tiempo y la temperatura para los datos correspondientes a la cocción a vacío y tampoco aparecieron diferencias significativas ($p > 0,05$) ni para el tiempo de cocción, ni entre las tres temperaturas estudiadas. En el caso del tratamiento a presión atmosférica (100 °C) el tiempo de tratamiento tampoco afectó ($p > 0,05$) al encogimiento de las muestras. Al comparar el encogimiento para los distintos tratamientos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos a vacío y el de presión atmosférica tras los veinte minutos de cocción. Al igual que se comentó en el apartado de fritura, el tratamiento térmico afecta a la estructura de las proteínas, éstas se contraen y agregan por efecto de la temperatura cambiando ligeramente el aspecto de las muestras, pero como se puede ver en la Figura III.21. en ninguno de los tratamientos estudiados supone alteraciones importantes en la forma de los filetes. Así pues, los tratamientos a vacío y a menores temperaturas presentan menores valores de encogimiento que los de presión atmosférica sobre todo a tiempos más largos de cocción.

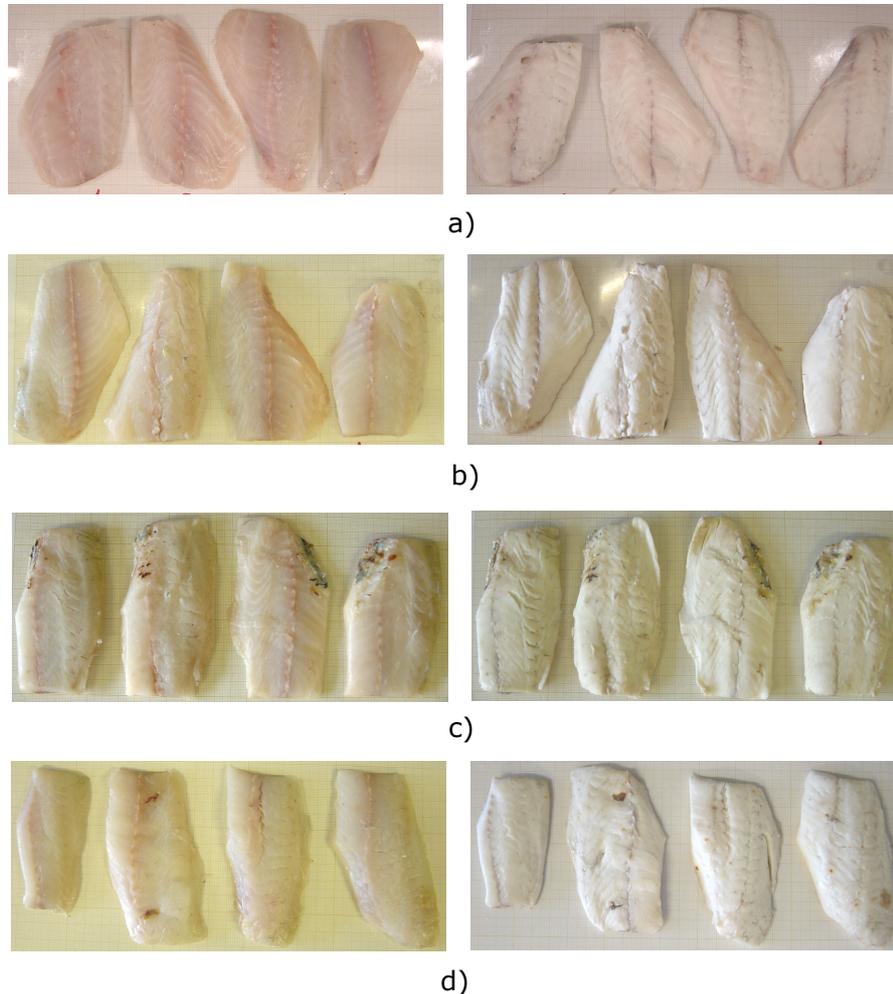


Figura III.21. Aspecto de los filetes de dorada antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento de cocción durante 20 minutos. (a) 70 °C vacío, (b) 80 °C vacío, (c) 90 °C vacío y (d) 100 °C presión atmosférica.

5.2.1.6. Evolución del color en los filetes

Por último, se analizaron los cambios de color que sufren los filetes como consecuencia del tratamiento de cocción a vacío y a presión atmosférica tal como se describe en el punto 4.3.7. de

materiales y métodos. En la Figura III.22. se pueden observar los cambios de color experimentados en los filetes de dorada tras el proceso de cocción.

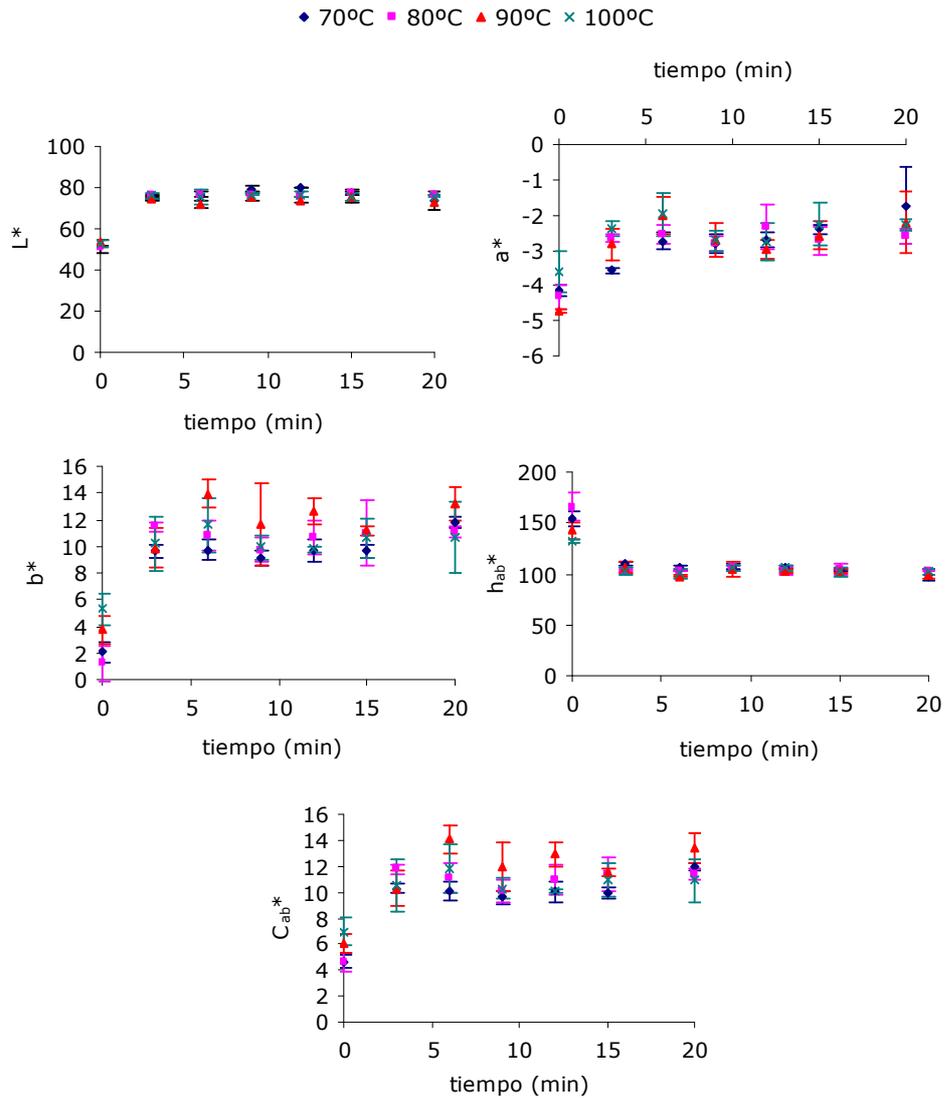


Figura III.22. Evolución de L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^* con el tiempo para cada temperatura empleada.

Los valores de L^* se incrementaron debido al tratamiento térmico y permanecieron estables a partir de los 3 minutos de cocción para todas las condiciones estudiadas. El incremento inicial en los valores de L^* se puede atribuir a la desnaturalización y coagulación de las proteínas solubles lo que produce una reducción en la penetración de la luz, incrementando la blancura al inicio del tratamiento térmico (Figura III.22.). Los valores de a^* se incrementaron conforme se incrementaba el tiempo de tratamiento. La temperatura induce la coagulación de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares que son posiblemente las responsables de los cambios observados en la coordenada a^* . Los valores de b^* se incrementaron con la temperatura de tratamiento, pero no se detectaron diferencias debido al método de tratamiento y al tiempo de cocción. En general, se puede decir que no se aprecian diferencias significativas ($p > 0,05$) en los atributos de color entre los tratamientos empleados. El tratamiento a 70 °C fue el que dio como resultado un mejor aspecto visual de las muestras.

Para concluir este apartado podemos decir que si bien los diferentes tratamientos estudiados de cocción a vacío parecen no afectar de manera significativa a propiedades de las muestras como son su color, contenido total en proteínas o grasas del pescado, sí que pueden resultar interesantes para la conservación de algunos ácidos grasos mono y poliinsaturados. Por otra parte estos tratamientos permiten mantener valores más elevados de humedad del producto (mayor jugosidad) y presentan un menor grado de encogimiento de los filetes. Por todo esto los tratamientos de cocción a vacío de filetes de dorada podrían ser considerados como una alternativa a la cocción a presión atmosférica en los procesos de transformación de los filetes de dorada.

III.6. CONCLUSIONES

En este apartado se ha estudiado el proceso de fritura y cocción en condiciones de vacío continuo en filetes de dorada (*Sparus aurata*). Las conclusiones para ambos bloques se presentan por separado para una mejor comprensión del estudio.

1. Estudio del proceso de fritura en condiciones de vacío continuo de filetes de dorada (*Sparus aurata*)

1.1. En cuanto a la evolución de la temperatura en el centro del filete se puede decir que las temperaturas alcanzadas en el interior del producto fueron mayores que las temperaturas de evaporación del agua a la presión de trabajo para las diferentes temperaturas estudiadas. Estas diferencias ponen de manifiesto que en el interior del producto se crean sobrepresiones que implican incrementos en la temperatura de ebullición de entre 10 y 20 °C por encima de las que corresponderían a la presión de la cámara.

1.2. El tratamiento en condiciones de presión atmosférica (165 °C) produjo un descenso del peso de los filetes mayor que el tratamiento en condiciones de vacío continuo (90, 100, 110 °C), registrándose a los 8 y 10 minutos las diferencias más elevadas.

1.3. La pérdida de humedad en las muestras tratadas a vacío fue de entre un 25 y 40% y entorno al 70% en las muestras tratadas a presión atmosférica tras 10 minutos de fritura. La combinación de altas temperaturas (165 °C) con largos tiempos de fritura (10 min) produce un producto más seco, afectando a la jugosidad del producto final y a su posible aceptación.

1.4. El modelo cinético de la raíz cuadrada del tiempo presentó coeficientes de correlación superiores a los del modelo de la caída exponencial, siendo los más altos para ambos modelos los correspondientes a la fritura a presión atmosférica. Los parámetros relacionados con la velocidad de la pérdida de agua en el filete (tanto el parámetro "b" del primer modelo como el "k" del segundo modelo) mostraron que éstas son muy similares en los tratamientos a 90 y 100 °C, mientras que a 110 °C ya se produce un ligero aumento de la velocidad de pérdida de agua. El tratamiento a 165 °C es el que experimenta una mayor velocidad en la pérdida de agua con un mayor valor tanto de b como de k.

1.5. La ganancia de grasa en los filetes fue superior en el tratamiento a presión atmosférica y se incrementó con el tiempo de fritura. A vacío, la absorción de grasa disminuye con el aumento de la temperatura, siendo el tratamiento a 110 °C y 25 kPa el que menores porcentajes de grasa mostró.

1.6. Los modelos cinéticos para evaluar la ganancia de grasa ajustaron bien para las temperaturas de 90 °C (vacío) y 165 °C (atmosférica). Para el caso de la fritura a vacío a 100 y 110 °C no existe una correlación elevada entre la ganancia de aceite y el tiempo de fritura.

1.7. El análisis de los modelos cinéticos pone de manifiesto la conveniencia de abordar modelos que impliquen una aproximación fenomenológica y estructural del proceso. La modelización del proceso de fritura bajo el prisma del medio poroso puede ser una solución que permita definir adecuadamente lo que ocurre en este proceso en el que coexisten cambios de fase, presiones,

temperaturas, tamaño, etc., que se traducen en estados de no equilibrio durante el procesado.

1.8. En lo referente al encogimiento de las muestras, el tratamiento a presión atmosférica es el que ocasionó un mayor descenso del volumen. Tanto el tiempo como la temperatura presentaron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) pero el tiempo fue el factor que más peso tuvo en el encogimiento de las muestras.

1.9. El análisis factorial de los datos de humedad, pérdida de peso, contenido graso y encogimiento mostró que el tratamiento a 110 °C es el que supuso un menor contenido graso con unas pérdidas de humedad, peso y encogimiento razonables.

1.10. En cuanto a los cambios de color asociados al proceso de fritura el tratamiento en condiciones de vacío (90, 100 y 110 °C) mostró valores más elevados de L^* que los obtenidos para el tratamiento en condiciones de presión atmosférica (165 °C). El tratamiento a presión atmosférica mostró un oscurecimiento de las muestras superior al de las muestras tratadas en condiciones de vacío (la coordenada a^* evolucionó hacia colores marrones debido a las reacciones de Maillard).

1.11. En general se puede decir que, comparado con la fritura tradicional, la fritura a vacío de filetes de dorada puede suponer una reducción del contenido de aceite de las muestras y de la pérdida de humedad. La fritura a presión atmosférica supone una mayor pérdida de peso y encogimiento. No obstante, en el proceso de fritura a vacío el producto no adquiere los colores característicos de los productos fritos al trabajar a bajas temperaturas, con el

inconveniente que ello puede suponer en la aceptación del producto. Así pues, el proceso de fritura a vacío para filetes de dorada puede ser una alternativa para la elaboración de preparaciones culinarias con dorada (*Sparus aurata*) con unos adecuados atributos composicionales.

1.12. De entre los tratamientos estudiados, la fritura a vacío a 110 °C y 25 kPa es la que aporta un menor contenido graso con unas pérdidas de humedad, peso y encogimiento razonables por lo que éstas podrían ser unas condiciones adecuadas para la aplicación de este tratamiento.

2. Estudio del proceso de cocción en condiciones de vacío continuo de filetes de dorada (*Sparus aurata*)

2.1. La temperatura en el centro del filete fue superior a 60 °C a los 6 minutos de cocción para todos los tratamientos estudiados por lo que todos los tratamientos estudiados de tiempos superiores cumplen con la normativa higiénico-sanitaria.

2.2. Tanto el tiempo de tratamiento como la temperatura mostraron un efecto significativo en la variación de peso para el tratamiento a vacío (70, 80 y 90 °C), siendo el tiempo la variable que mostró un mayor peso en la interacción.

2.3. Las variaciones en el contenido de humedad experimentadas por las muestras fueron menores al 5,5% para tiempos de cocción largos (20 min). El tratamiento a vacío a 80 °C fue el que mostró una menor pérdida de humedad dando lugar por tanto a muestras más jugosas.

2.4. El contenido proteico de los filetes tratados a vacío se incrementó de 98% a 118% debido a la pérdida de humedad experimentada por el filete. Los valores obtenidos para el contenido proteico no mostraron diferencias significativas en función de la temperatura aplicada para el tratamiento a vacío (70, 80 y 90 °C).

2.5. El tiempo de tratamiento implicó un aumento porcentual en el contenido graso debido a la pérdida de agua, apareciendo diferencias significativas después de 20 minutos de tratamiento.

2.6. La cocción de los filetes de pescado en las diferentes condiciones de tiempo y temperatura no supuso grandes cambios en el perfil lipídico. El tratamiento a presión atmosférica aumentó ligeramente la cantidad de ácidos grasos saturados.

2.7. El análisis de los datos mostró que puede resultar interesante para la conservación de algunos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados del pescado realizar tratamientos a vacío y a bajas temperaturas (70 °C).

2.8. Los tratamientos a vacío y a bajas temperaturas presentaron menores valores de encogimiento que los de presión atmosférica sobre todo a tiempos más largos de cocción.

2.9. No se apreciaron diferencias significativas en los atributos de color entre los tratamientos empleados. El tratamiento a 70 °C fue el que dio como resultado un mejor aspecto visual de las muestras.

2.10. Como conclusión final podemos decir que, si bien los diferentes tratamientos estudiados de cocción a vacío parecen no

afectar al contenido total en proteínas y grasas del pescado, sí que pueden resultar interesantes para la conservación de algunos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados ya que, además mantienen valores más elevados de humedad y presentan un menor encogimiento.

No obstante, sería recomendable continuar en esta línea de trabajo con el análisis sensorial de las muestras analizadas, estudiar el comportamiento del producto durante su almacenamiento como ingrediente de un plato preparado y, como se ha comentado, incidir en la modelización de la operación.

CAPÍTULO IV.
OBTENCIÓN DE PRODUCTOS REESTRUCTURADOS
A BASE DE DORADA (*Sparus aurata*)

IV. OBTENCIÓN DE PRODUCTOS REESTRUCTURADOS A BASE DE DORADA (*Sparus aurata*)

IV.1. INTRODUCCIÓN

En la sociedad actual, los países occidentales se caracterizan fundamentalmente por un envejecimiento importante de la población y por un cambio notable en los estilos de vida que atañen de forma directa a los hábitos de consumo. Diferentes estudios sobre el patrón alimentario de los españoles (Serra et al., 2003; Aranceta et al., 2006; Díez-Gañán et al., 2007), ponen de manifiesto un alejamiento de la dieta mediterránea. Los hábitos observados se caracterizan por la ingesta insuficiente de verduras, hortalizas, frutas y legumbres y por lo que se refiere al pescado el consumo se acerca a las recomendaciones sin superarlas, sin embargo, estudios posteriores realizados remarcan una creciente tendencia negativa al consumo de dicho alimento tanto en los comedores escolares como en el hogar (Aranceta et al., 2006; Díez-Gañán et al., 2007; FROM, 2006; Aranceta et al., 2008; Martínez y Polanco, 2007). Los factores más frecuentes que inciden sobre el bajo consumo de pescado son: la preferencia, por parte de la gente joven, por la comida rápida (Fast-food) frente a la cocina tradicional, la palatabilidad (el pescado resulta menos apetecible que la carne y además los formatos de consumo son menos variados), y su funcionalidad (resulta más difícil de manipular y de cocinar y las espinas son un inconveniente para la mayoría de los consumidores). En general, los pescados aportan un buen balance de proteínas de alto valor biológico, vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles, algunos elementos minerales y un contenido calórico relativamente bajo. Además, muchas especies constituyen una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados de la serie

omega 3, cuyo consumo se ha asociado con efectos beneficiosos frente a diversos estados patológicos (Aquerreta, 2000; Oomen et al., 2000; Serra et al., 2006). Por este motivo el desarrollo de productos pesqueros que resulten más llamativos y de fácil consumo es una ayuda en la nutrición diaria de toda la población y especialmente de los más jóvenes. En este sentido, el desarrollo de productos reestructurados a base de pescado y la aplicación de nuevos ingredientes surgen como una nueva vía para crear dichos productos atractivos para los jóvenes y que además permitan dar salida a las especies de pescado de escaso valor comercial, presentando nuevas alternativas a la industria del procesado de pescado (Sánchez et al., 2004).

Un producto se denomina reestructurado cuando se le trocea o pica y después conjuntamente con otros ingredientes o sin ellos, se crea una estructura diferente que va a dar una nueva apariencia y una nueva textura. Se han desarrollado varios métodos para la elaboración de productos reestructurados pero la técnica más comúnmente utilizada es la solubilización y extracción de las proteínas miofibrilares mediante la adición de 20–30 g/kg de cloruro sódico (NaCl) con el fin de obtener un exudado más o menos “pegajoso” que es utilizado para unir pequeños trozos de pescado (Kuraishi et al., 1997). El nivel de NaCl empleado es muy importante porque influye en la cantidad de exudado proteico obtenido que a su vez afectará al posterior mecanismo de agregación proteica (Sun, 2009; Téllez-Luis et al., 2002). Existen varios agentes proteicos que se utilizan como agentes “ligantes”, tales como: huevo (Yetim y Ockerman, 1995), caseína y plasmotrombina de carne de ternera (Baker et al., 2000) o proteína de suero concentrada (Uresti et al., 2004). Dichos agentes proteicos mejoran las propiedades mecánicas y funcionales del

producto pero el más utilizado en la industria de alimentos para inducir las uniones covalentes entre proteínas para la elaboración de productos reestructurados es la transglutaminasa microbiana (MTGasa).

En el presente capítulo se emplea transglutaminasa microbiana como agente "ligante" que permite obtener diferentes texturas. La transglutaminasa microbiana es una enzima extracelular independiente del calcio, producida por los microorganismos *Streptovercillium genus*, *Bacillus subtilis*, y *Physarum polycephalum* (Ando et al., 1989; Kanaji et al., 1993; Téllez et al., 2004). En la actualidad esta enzima puede ser obtenida de *Streptovercillium ladakanum* y *Streptovercillium mobaraense* (Jiang et al., 1998). Las transglutaminasas son una familia de enzimas (EC 2.3.2.13) que catalizan la reacción de formación de un enlace covalente entre un grupo amino (p.e. la cadena lateral de una lisina -Lys-) y un grupo carboxiamida (p.e. la cadena lateral de un residuo de glutamina -Gln-). Se trata de enzimas que, a diferencia de la mayoría de enzimas industriales –amilasas, lipasas y proteasas– que catalizan reacciones de hidrólisis, inducen a la polimerización de las proteínas. En consecuencia, son capaces de modificar las propiedades funcionales y de textura de las proteínas creando productos con mayor consistencia y de mejor calidad.

Teniendo en cuenta que una de las mayores ventajas de los productos reestructurados es la posibilidad de modificación de la composición del producto final mediante la reformulación del producto original que ha sido previamente troceado o picado (Sánchez-Alonso et al., 2007) y que dicha reformulación puede llevarse a cabo mediante la adición de determinados aditivos, como es el caso de la fibra dietética, en el presente capítulo se estudiará el efecto de la adición de Konjac glucomanano, carboximetilcelulosa

y goma xantana sobre la matriz proteica formada mediante la adición de transglutaminasa microbiana. Se designan bajo el nombre de "fibra alimentaria", elementos animales o vegetales que, aún figurando en la alimentación humana, no son degradados por los enzimas digestivos. Las fibras aportan diversas propiedades en función de su composición y de su granulación. Su interés es básicamente nutracéutico, aunque también actúan como elementos funcionales. Desde un punto de vista tecnológico la fibra alimentaria mejora la capacidad de retención de agua, mejora el poder de gelificación, reduce la pérdida de rendimiento y mantiene la forma del producto después del cocinado (Ang y Crosby, 2005). Apenas existen productos pesqueros con fibra alimentaria añadida, especialmente como fuente de fibra, sin embargo han sido ampliamente utilizadas en productos cárnicos picados concretamente como reemplazante textural de la grasa.

El Konjac glucomanano (KGM) es una fibra dietética soluble en agua, se obtiene de los tubérculos de la planta originaria del este asiático *Amorphophallus konjac*, la cual pertenece a la familia Araceae. La estructura química del glucomanano incluye D-manosa y D-glucosa (en una proporción 8:5, respectivamente), unidas por enlace β (1 \rightarrow 4) (Figura IV.1). Esta fibra se caracteriza por una excepcional capacidad de captar agua, según indican Maekaji (1974) y Kishida et al. (1978), proporcionando una elevada viscosidad a las soluciones que forma (González et al., 2004).

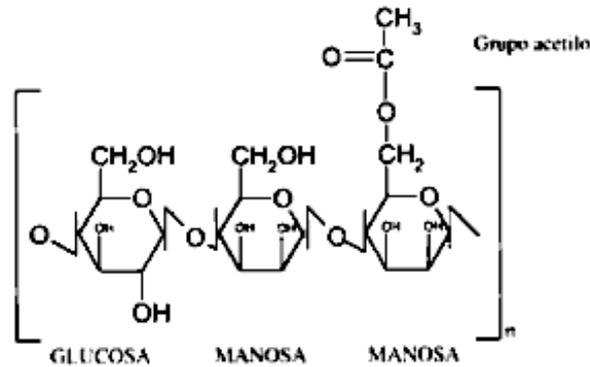


Figura IV.1. Molécula de la fibra de konjac glucomanano (Cubero, 2002).

El konjac glucomanano ha sido introducido en Europa y USA como aditivo alimentario (E425) debido a sus propiedades emulsionantes y gelificantes. En Japón ha sido tradicionalmente utilizado en la cocina asiática desde hace cientos de años (Khanna y Tester, 2006). Recientemente se ha descubierto que esta fibra presenta sinergias con otras gomas como la goma xantana, el k-carragenato, el almidón o la goma gellan, mejorando su capacidad gelificante (Shinsaku et al., 2002). Tiene la propiedad de disminuir el colesterol en sangre así como el nivel de azúcar, ayuda a la pérdida de peso, promueve la actividad intestinal, etc. (Zhang et al., 2005). Existen estudios realizados sobre la aplicación de konjac para mejorar la calidad de salchichas tipo frankfurt bajas en calorías (Lin y Huang, 2003), mejorar las propiedades texturales y la capacidad de retención de agua de geles hechos con carne de cerdo (Chin et al., 2009) y otras aplicaciones.

La carboximetilcelulosa sódica (CMC) es un derivado de la fibra insoluble celulosa, polímero más abundante en la naturaleza, y está reconocido como aditivo alimentario (GRAS, generally recognized

as safe) con el número E-466. Su formación se muestra en la Figura IV.2. El CMC, es un polímero que no se encuentra de forma natural en los alimentos, es aniónico y soluble en agua. Esto determina sus propiedades físicas básicas: la solubilidad (comportamiento en disolución), reología (viscosidad) y la adsorción en las superficies (Cubero et al., 2002). El uso en los diferentes alimentos se deriva de estas propiedades básicas.

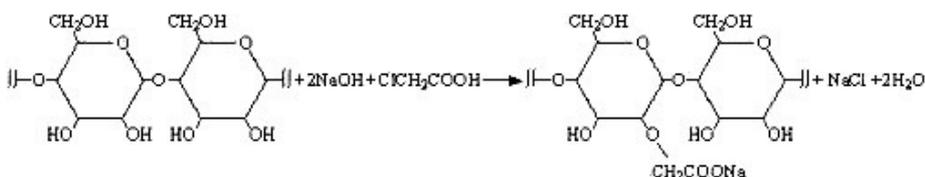


Figura IV.2. Formación de carboximetilcelulosa sódica (CMC) a partir de la reacción de celulosa, sosa cáustica y ácido monocloraacético en condiciones óptimas (Cubero et al., 2002).

A pesar de la existencia de gomas con propiedades comparables en el mercado, el CMC es frecuentemente el producto de elección debido a su eficiencia con poca cantidad, lo que le otorga una elevada relación coste-efectividad (Akzo, 2008). La carboximetilcelulosa se utiliza como espesante en salsas y aliños para ensaladas, como agente reductor de aceite al reducir el contenido lipídico en fritura en productos a base de masa (Priya et al., 1996), como espesante y estabilizador en helados, donde se ayuda a evitar que los cristales de hielo se formen durante la congelación o la recongelación después de una descongelación, entre otras funciones. Además, se ha utilizado como modificador de textura en formulaciones de surimi (Zdzislaw, 1994).

Finalmente, la xantana es producida por el microorganismo *Xhantomonas campestris*. La molécula de xantana (Figura IV.3)

consta de una cadena principal de D-glucopiranosilo con enlace a 1-4, como en la celulosa. A la cadena se anexan cadenas laterales de trisacárido compuestas por residuos de D-manopiranosilo y de ácido D-glucopiranosilurónico.

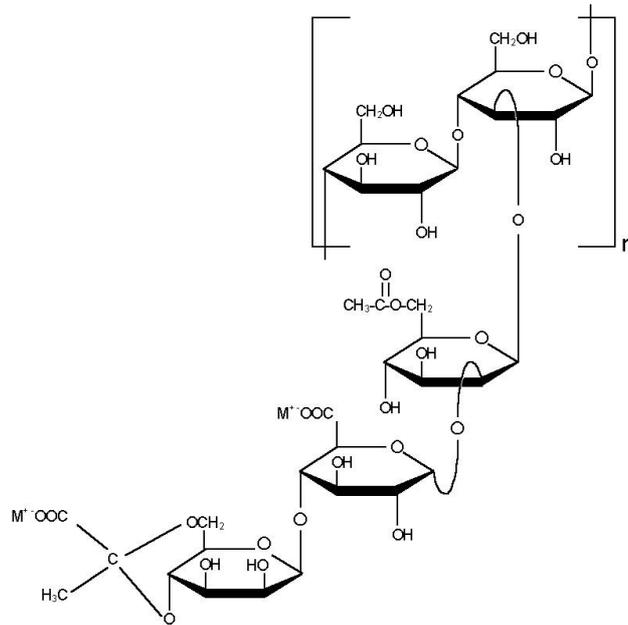


Figura IV.3. Estructura de la xantana (Flores, 1998).

Las soluciones de xantana son estables frente a la acción del calor en un amplio intervalo de temperaturas y su estabilidad aumenta con sales catiónicas mono y divalentes. La viscosidad es independiente del pH en presencia de sales a pH entre 1 y 13 (Slodki, 1998).

IV.2. OBJETIVO

2.1. Objetivo general

El objetivo de este capítulo es obtener un producto reestructurado a base de dorada (*Sparus aurata*) mediante la adición de sal (NaCl) y transglutaminasa microbiana (MTGasa) así como analizar el efecto de la adición de diferentes hidrocoloides (konjac glucomanano (KGM), carboximetilcelulosa sódica (CMC) y goma xantana) sobre la matriz proteica del gel con el fin de obtener un producto reestructurado de pescado como "fuente de fibra". Para ello se van a estudiar los aspectos físico-químicos, texturales, sensoriales y microbiológicos de dichos productos que permitan entender el papel que los diferentes ingredientes desempeñan en el producto.

2.2. Objetivos específicos

1. Desarrollar un producto reestructurado mediante la adición de MTGasa y NaCl.
2. Estudiar el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades del producto reestructurado.
3. Analizar los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, pH, capacidad de retención de agua y propiedades ópticas) de los productos obtenidos con y sin tratamiento térmico.
4. Analizar los cambios texturales de las diferentes formulaciones con y sin tratamiento térmico.
5. Evaluar sensorialmente las formulaciones obtenidas para determinar la aceptación del producto y fijar el nivel de transglutaminasa microbiana (MTGasa) y cloruro sódico óptimo en la formulación del producto reestructurado.

6. Estudiar la microestructura de las formulaciones para una mejor comprensión de las interacciones entre los componentes de la formulación.
7. Evaluar el comportamiento de las formulaciones durante el almacenamiento desde un punto de vista físico-químico y microbiológico.
8. Analizar el efecto de la adición de diferentes hidrocoloides (konjac glucomanano (KGM), carboximetilcelulosa sódica (CMC) y goma xantana) sobre la matriz proteica del gel con y sin tratamiento térmico.
9. Estudiar el efecto de la adición de hidrocoloides sobre las propiedades físico-químicas, mecánicas, sensoriales y estructurales.
10. Obtener una formulación que pueda ser considerada como fuente de fibra a partir de los hidrocoloides estudiados.
11. Evaluar la vida útil (físico-química y microbiológica) del producto obtenido como fuente de fibra.

VI.3. PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo dichos objetivos se diseñó el siguiente plan de trabajo con las actividades descritas a continuación:

1. Revisión bibliográfica de los siguientes temas: productos reestructurados, efecto de la transglutaminasa microbiana (MTGasa) y el cloruro sódico (NaCl) sobre la matriz proteica del producto reestructurado, elaboración de geles de pescado, influencia de los hidrocoloides en la matriz proteica del gel y análisis sensorial.

2. Elaboración de un producto reestructurado de dorada (*Sparus aurata*) mediante la utilización de transglutaminasa microbiana (MTGasa) y cloruro sódico (NaCl).
 - 2.1. Estudio del efecto del cloruro sódico (NaCl) y la transglutaminasa (MTGasa) a diferentes niveles, sobre las propiedades físico-químicas (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y mecánicas del producto reestructurado sin tratamiento térmico.
 - 2.2. Estudio del efecto del cloruro sódico (NaCl) y la transglutaminasa (MTGasa) a diferentes niveles, sobre las propiedades físico-químicas (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y mecánicas del producto reestructurado con tratamiento térmico.
 - 2.3. Caracterización del perfil sensorial y de aceptación del producto para fijar el nivel de cloruro sódico (NaCl) óptimo en la formulación del producto reestructurado.
 - 2.4. Caracterización del perfil sensorial y de aceptación del producto para fijar el nivel de transglutaminasa microbiana (MTGasa) óptimo en la formulación del producto reestructurado.
 - 2.5. En base a los resultados obtenidos en los puntos anteriores, selección de la formulación base del producto reestructurado óptimo.
 - 2.6. Control del crecimiento de microorganismos de la formulación base seleccionada y control de la variación experimentada por los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y mecánicos, durante 20 días de almacenamiento para el producto sin tratamiento térmico y 56 días para el producto tratado térmicamente.

3. Elaboración de un producto reestructurado de dorada (*Sparus aurata*) con el nivel de cloruro sódico y de transglutaminasa microbiana seleccionada en el estudio anterior, y con la incorporación de goma konjac (KGM) a diferentes niveles y de carboximetilcelulosa sódica (CMC).
 - 3.1. Estudio del efecto de la adición de goma konjac a dos niveles sobre la matriz proteica del gel. Análisis de los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y mecánicos del producto reestructurado sin tratamiento térmico.
 - 3.2. Estudio del efecto de la adición de goma konjac a dos niveles sobre la matriz proteica del gel. Análisis de los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y mecánicos del producto reestructurado con tratamiento térmico.
 - 3.3. Estudio del efecto de la adición de carboximetilcelulosa sódica (CMC) a un nivel sobre la matriz proteica del gel. Análisis de los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y mecánicos del producto reestructurado sin tratamiento térmico.
 - 3.4. Estudio del efecto de la adición de carboximetilcelulosa sódica (CMC) a un nivel sobre la matriz proteica del gel. Análisis de los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y mecánicos del producto reestructurado con tratamiento térmico.
4. Elaboración de un producto reestructurado de dorada (*Sparus aurata*) fuente de fibra mediante la adición de konjac glucomanano y goma xantana.

- 4.1. Estudio del efecto de la adición de konjac glucomanano y goma xantana sobre la matriz proteica del gel. Análisis de los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y propiedades mecánicas del producto sin tratamiento térmico.
- 4.2. Estudio del efecto de la adición de konjac glucomanano y goma xantana sobre la matriz proteica del gel. Análisis de los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y propiedades mecánicas del producto con tratamiento térmico.
- 4.3. Caracterización del perfil sensorial y de aceptación del producto con el fin de evaluar el efecto de la presencia de fibra sobre la percepción sensorial del mismo por parte de los consumidores.
- 4.4. En base a los resultados obtenidos en los puntos anteriores, selección de la formulación fuente de fibra.
- 4.5. Control del crecimiento de microorganismos de la formulación fuente de fibra seleccionada y control de la variación experimentada por los parámetros físico-químicos (humedad, actividad de agua, capacidad de retención de agua, color y pH) y mecánicos, durante 21 días de almacenamiento para el producto sin tratamiento térmico y 77 días para el producto tratado térmicamente.

IV.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materia prima y preparación de la muestra

En el presente capítulo se emplearon doradas (*Sparus aurata*) procedentes de piscifactoría concretamente de la empresa ELS ALFACS (Alcanar Playa, Tarragona). Una vez en el laboratorio, las doradas se evisceraron, se lavaron para eliminar restos de sangre, y se congelaron a una temperatura de -20(1) °C. Para la preparación de las muestras los pescados fueron descongelados en refrigeración a 4 °C durante 24 horas. Una vez descongeladas, las doradas se filetearon y posteriormente los filetes se picaron con una trituradora Kenwood A920 PK001 (Kenwood Ltd, Hampshire, U.K.), formándose una pasta de pescado, a la cual se adicionaron los componentes de las diferentes formulaciones (transglutaminasa, sal, KGM, CMC y xantana según formulación). Posteriormente la pasta fue embutida en forma de salchicha en tripa de celulosa suministrada por la empresa Pilarica S.A. (Paterna, España) y fueron envasadas a vacío en bolsas de polietileno mediante una envasadora Tecnotrip (Terrasa S.A., Barcelona, España) y posteriormente se almacenaron refrigeradas a 4 °C. Las muestras tratadas térmicamente permanecieron 24 horas en refrigeración a 4 °C antes del tratamiento térmico para favorecer el fenómeno "suwari" o "setting" (proceso de gelificación de las proteínas del músculo). El tratamiento térmico se llevó a cabo sumergiendo las muestras en un baño Precistern S .386 (Selecta, Barcelona, España) con agua a 80 °C durante 7 minutos. La temperatura fue controlada con una sonda Testo 925 (Testo GMBH y Co., Lenzkirch, Germany). Tras el tratamiento térmico las muestras fueron atemperadas, embolsadas a vacío nuevamente y almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta el momento de los análisis.

4.1.2. Otros ingredientes

La tran glutaminasa (MTGasa) empleada fue suministrada por la empresa Apliena S.A. El preparado enzimático tiene origen fúngico (100 µL/g) que procede de Ajinomoto Inc. (USA), el cual fue reconocido como seguro por la FDA (GRAS NOTICE Nº GRN 000004), estabilizado en forma de polvo con caseinato de sodio y maltodextrina.

La sal (NaCl) empleada fue sal marina de mesa yodada adquirida en un establecimiento local procedente de la Salinera española S.A. (Murcia, España).

Además de estos ingredientes bases se utilizaron tres fibras: goma konjac o glucomanano (KGM), carboximetilcelulosa sódica (CMC) y goma xantana.

La goma konjac o glucomanano (Surimi Konjac 3) (E-425) fue proporcionada en forma de polvo por la empresa Safic-Alcan S.A. (Barcelona, España). El preparado es una harina seca molida, color canela blanquecina, extraída del tubérculo *Amorphophallus konjac* procede de Kalys S.A (Bernin, Francia). Se compone del polisacárido glucomanano en un contenido mayor de 75%, con un contenido menor del 12% en humedad, 3% en lípidos, 3% en proteínas, 3% de almidón.

La carboximetilcelulosa sódica (Akucell® AF3265) fue suministrado por la empresa Akzo Nobel Functional Chemical bv (Herkenbosch, The Netherlands). El contenido mínimo de CMC sódico es de 99,5%, con un máximo de 8% de humedad y de 0,5% de cloruro sódico. El nombre alimenticio de esta fibra es carboximetilcelulosa sódica (CMC), y es un polvo blanco higroscópico. Cumple con los estándares de calidad autorizados por autoridades como la FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (UN) y la Comunidad Europea. En Europa está

designada con el número E-466 y su uso está permitido en todos los grupos de alimentos. Esta goma actúa como espesante, estabilizador y emulgente de las grasas. Además, sus usos también implican controlar la cristalización y retener la humedad.

Finalmente, la goma xantana fue suministrada por la empresa Cargill S.L.U. (Barcelona, España). En Europa está designada con el número E-415 y su uso también está permitido en todos los grupos de alimentos. La goma xantana es soluble en frío y en caliente y es capaz de espesar medios alcohólicos. Resiste muy bien los procesos de congelación-descongelación. Aunque se le aplique temperatura no pierde propiedades espesantes. Se compone en un 73% de fibra dietética, con un contenido del 8% en humedad y 7% en proteínas.

4.2. Determinaciones analíticas

4.2.1. Humedad

La determinación de la humedad se realizó mediante el método de la AOAC 950.46 (1997) según lo descrito en el apartado 4.3.3. de materiales y métodos del capítulo III.

4.2.2. Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) se determinó a partir de las muestras de los reestructurados de dorada previamente triturados. Para esta determinación se empleó un higrómetro de punto de rocío Aqualab GB-X modelo Fast-Lab (GBX, Romans-sur-Isère, France).

4.2.3. pH

Para la determinación del pH se empleó el equipo Seveneasy pH Meter S20 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) midiendo el potencial desarrollado entre los electrodos. Las muestras

analizadas se obtuvieron por dilución 1:1, siendo 10 g de muestra y 10 g de agua destilada (AOAC, 1995).

4.2.4. Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Cuando se aplica una cierta presión (centrifugación) sobre el músculo de pescado, los fluidos del tejido son expulsados. El porcentaje de capacidad de retención de agua se utiliza como medida del líquido que permanece dentro de la estructura del alimento, se relaciona con la interacción entre las proteínas miofibrilares y el agua del alimento (Boatella et al., 2004). Existe una correlación entre la capacidad de retención de agua y otras propiedades físicas y químicas, por ejemplo, pH y contenido de sal. El porcentaje de agua retenida por la muestra es función de las características de la estructura proteica. Para medir la CRA, las muestras fueron sometidas a una fuerza mediante la centrífuga MEDIFRIGER-BL modelo 7001085 (J. P. Selecta S.A., Barcelona, España).

Muestras de 4,0(0,5) g se pesaron y colocaron entre dos papeles Whatman nº1. La capacidad de retención de agua se calculó como el porcentaje de agua total menos el agua no retenida. Para ello las muestras se centrifugaron a una velocidad de 400 rpm a una temperatura de 15°C durante cinco minutos. Tras la centrifugación las muestras se pesaron nuevamente. Las medidas se realizaron por triplicado. La capacidad de retención de agua de las muestras se determinó mediante la ecuación IV.1:

$$\%CRA = 100 - \left(\frac{m_0 - m_c}{m_0} \right) \cdot 100 \quad \text{ecuación IV.1}$$

donde:

m_0 = Peso inicial de la muestra (g)

m_c = Peso final tras centrifugado (g)

4.2.5. Propiedades ópticas

El color depende de las condiciones de medición en los alimentos, así como la capacidad de su superficie para reflejar, dispersar, absorber o transmitir la luz visible. La medida de color de las muestras se realizó según lo descrito en el apartado 4.3.7. de materiales y métodos del capítulo III.

4.2.6. Ensayos mecánicos

La textura es uno de los factores que condicionan la aceptación o el rechazo del consumidor. Para el estudio de las propiedades mecánicas de las distintas formulaciones se realizó un ensayo de TPA (Texture Profile Analysis). Para ello se emplearon rodajas de 1,25(0,2) cm de espesor. Para llevar a cabo el ensayo se empleó una prensa universal TA-XT2 (ANAME, Madrid, España) equipada con una célula de carga de 50 kg. Los datos instrumentales se procesaron empleando el programa Texture Exponent 32 v 1.0 (Stable Micro Systems, Surrey, UK). En el ensayo de TPA, la prensa se equipó con la célula de ensayo P/75 (Stable Micro Systems, Surrey, UK) cilíndrica de 7,5 cm de diámetro y fondo plano. El equipo se programó para que presionara a una velocidad de 1 mm/s hasta que las piezas alcanzaran una deformación del 75% de su altura.

Los parámetros descritos mediante este ensayo son: dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, masticabilidad y gomosidad.

- Dureza: viene definida como la fuerza máxima correspondiente a la curva de la primera compresión (g).

- Adhesividad: es el valor del área de la curva negativa que aparece tras la primera compresión (g·s).
- Elasticidad: altura que el alimento recupera durante el tiempo que transcurre entre el final de la primera compresión y el inicio de la segunda compresión.
- Cohesividad: es la relación existente entre el área correspondiente a la segunda y a la primera compresión, y evalúa la energía mecánica necesaria para destruir la estructura interna del material.
 - Gomosidad: es el producto de la dureza y la cohesividad.
 - Masticabilidad: es el producto de la dureza, la cohesividad y la elasticidad.

4.3. Análisis sensorial

Se realizaron tres análisis sensoriales de los reestructurados de dorada (*Sparus aurata*). El objeto del primer análisis fue seleccionar el nivel de transglutaminasa óptimo para conseguir la dureza deseada en la formulación base. Para ello se fijó un nivel de sal y se probaron tres niveles de transglutaminasa. El segundo análisis se llevó a cabo con el fin de obtener el nivel de sal óptimo en la formulación base. En este segundo caso se partió del nivel de transglutaminasa elegido por los catadores en el primer análisis y se ensayaron tres niveles de sal. Con el resultado de estos dos análisis se obtuvo la fórmula base a la que posteriormente se le adicionaron distintos hidrocoloides con el fin de obtener ventajas tecnológicas así como un producto fuente de fibra. Finalmente se llevó a cabo el tercer análisis sensorial con el objetivo de evaluar la preferencia de los catadores frente a tres formulaciones diferentes. Las muestras en los diferentes análisis sensoriales se presentaron a los catadores tras un tratamiento térmico de cocción a 80 °C

durante 7 minutos, tal y como se llevaron a cabo los análisis para el estudio de los diferentes parámetros en las muestras tratadas térmicamente del presente estudio. A continuación se describen cada uno de los tres análisis sensoriales realizados.

El primer análisis sensorial de reestructurados de dorada se llevó a cabo con un panel de 27 catadores, no expertos y no entrenados. Se realizaron pruebas de comparación pareada entre las muestras con diferentes niveles de transglutaminasa (Normas AENOR, 1992). Los atributos aspecto, dureza, gomosidad así como la muestra preferida, fueron evaluadas por los catadores. A cada catador se le presentaron tres parejas de muestras en la misma sesión, que resultaban de obtener todas las combinaciones posibles entre los distintos tratamientos:

- A: Formulación control con 1% de NaCl y 0% de Transglutaminasa
- B: Formulación obtenida con 1% de NaCl y 0,3% de Transglutaminasa
- C: Formulación obtenida con 1% de NaCl y 0,6% de Transglutaminasa

Las parejas obtenidas fueron: AB, AC y BC.

Según las preferencias de los panelistas, obtenidas de este primer análisis sensorial, se escogió un nivel de transglutaminasa. Con dicho nivel de transglutaminasa seleccionado, se realizó una nueva prueba sensorial en la cual se analizó el nivel de sal para obtener la fórmula base, realizando de nuevo una prueba similar a la expuesta anteriormente, en este caso con 30 jueces. Los atributos evaluados en esta prueba fueron: aspecto, dureza, sabor salado así como la muestra preferida por los catadores. Las formulaciones a evaluar fueron las siguientes:

A: Formulación control con 0,3% de Transglutaminasa y 0% de NaCl

B: Formulación obtenida con 0,3% de Transglutaminasa y 1% de NaCl

C: Formulación obtenida con 0,3% de Transglutaminasa y 2% de NaCl

En este caso las parejas obtenidas fueron tres: AB, AC, BC.

Las muestras, en ambos análisis sensoriales, fueron presentadas a los catadores atemperadas y codificadas con números aleatorios de tres dígitos. Cada catador respondió a las preguntas de los cuestionarios que se muestran en los anexos A y B.

Una vez establecida la fórmula base, se procedió a un tercer análisis sensorial con el objetivo de obtener una formulación fuente de fibra aceptable por los consumidores. Para este último análisis se utilizó la norma que se encontraba en vigor en ese momento: Normas AENOR, 2009 (UNE-EN ISO 5495), dicha norma anula y sustituye a la anteriormente citada Norma UNE 87005:1992. Esta nueva norma no permite preguntar por la muestra preferida a la vez que se evalúan los atributos y por tanto en este caso se tuvieron que hacer cuestionarios separados (Anexo C y D). En primer lugar se les presentó el cuestionario a los catadores para evaluar la muestra preferida y posteriormente un segundo cuestionario evaluaba los diferentes atributos, en este caso los atributos evaluados fueron: aspecto, dureza, gomosidad, sabor a dorada y jugosidad. Este análisis sensorial se llevó a cabo con un panel compuesto por 53 catadores, no expertos y no entrenados.

Las formulaciones a evaluar fueron las siguientes:

A: Formulación control con 0,3% de Transglutaminasa y 1% de NaCl

B: Formulación obtenida con 0,3% de Transglutaminasa, 1% de NaCl y 1% de konjac glucomanano

C: Formulación obtenida con 0,3% de Transglutaminasa, 1% de NaCl, 1% de konjac glucomanano y 1,5% de goma xantana (con posterioridad se nombrará como "formulación fuente de fibra").

Las parejas obtenidas fueron: AB, AC y BC.

4.4. Análisis microbiológico

Las determinaciones microbiológicas se realizaron por triplicado para la formulación base (1% de NaCl y 0,3% de MTGasa, resultado de los dos primeros análisis sensoriales) y para la formulación fuente de fibra seleccionada por el panel de catadores (1% de konjac glucomanano y 1,5% de goma xantana) y se realizó almacenamiento en refrigeración de las muestras tanto en fresco como con tratamiento térmico (80 °C durante 7 min.). Los días analizados para la formulación base almacenada en fresco fueron: 0, 4, 6, 13 y 20 y para la formulación base almacenada con tratamiento térmico: 0, 4, 7, 14, 28 y 56. Finalmente, la fórmula fuente de fibra también fue almacenada en refrigeración y se realizaron los análisis microbiológicos tanto en fresco como tratadas térmicamente. Los días analizados en este caso fueron, para la muestra almacenada en fresco: 0, 7, 14 y 21 y para las muestras tratadas térmicamente: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 77, 99.

Para llevar a cabo los análisis microbiológicos se tomaron muestras de las diferentes formulaciones, a partir de las cuales se realizaron diluciones decimales, tal y como se describe en la Norma UNE EN-ISO 6887-3 (AENOR, 2004).

Para definir la vida útil de un producto es necesario realizar una evaluación microbiológica. La legislación vigente obliga a la

determinación en fresco de aerobios mesófilos, enterobacterias totales y de *Salmonella-Shigella*. En el caso de los productos cocidos a las determinaciones anteriores se agrega la de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico. La "Orden del 2 de agosto de 1991" por la que se aprueban las normas microbiológicas (BOE 15/8/91) para los productos de la pesca y de la acuicultura indica el número de unidades formadoras de colonias que no se deben exceder, estos valores se recogen en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Límites legislativos vigentes de los diferentes microorganismos en los texturizados frescos y cocidos.

Alimento	Aerobios mesófilos	<i>Enterobacteriaceae</i> totales	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella-shigella</i>
Productos frescos	1x10 ⁶ ufc/g	1x10 ³ ufc/g	No especificado	AUS/25 g
Productos cocidos	1x10 ⁵ ufc/g	1x10 ³ ufc/g	1x10 ² ufc/g	AUS/25 g

Fuente: Orden de 2 de agosto de 1991

La cuantificación de las colonias se realizó en placas cuyas diluciones presentaban un número entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (ufc).

4.4.1. Preparación de la muestra

Se formularon texturizados de 30 g. Para la preparación de la muestra se pesaron 25 g y se colocaron en bolsas de stomacher (polietileno) añadiéndoles 225 mL de agua peptonada y se homogeneizó en el stomacher durante 1 min obteniendo la dilución (10⁻¹). De esta dilución se pipeteó 1 mL y se llevó a un tubo de ensayo con 9 mL de agua de peptona estéril y se agitó con el vórtex durante 10 s, obteniendo de esta forma la dilución 10⁻². Así

sucesivamente se prepararon las diluciones seriadas hasta obtener la dilución 10^{-6} .

4.4.2. Aerobios mesófilos

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se basó en la Norma UNE-EN ISO 4833 (AENOR, 2003). La cuantificación permite estimar la flora total del producto, sin especificar el tipo de gérmenes. La siembra se realizó en masa, 1 mL, sobre agar nutritivo PCA (Plate Count Agar), incubando a 30(1) °C durante 72 horas. El recuento se realizó en aquellas placas que contenían entre 30 y 300 ufc. y el resultado se obtuvo multiplicando el número de colonias contado en la placa por el factor de dilución y por 10.

4.4.3. Enterobacterias

Los análisis microbiológicos para la determinación de enterobacterias fueron realizados siguiendo los protocolos descritos por Pascual y Calderón (2000). En este caso el recuento hace referencia a *Enterobacteriaceae* lacto-positivas, también conocidas como coliformes. A partir de cada una de las series de diluciones decimales se realizaron siembras en doble capa por duplicado. La siembra se realizó pipeteando 1 mL sobre las placas petri estériles pero en anaerobiosis, es decir, primero se vertieron aproximadamente unos 15 mL del medio agar cristal violeta-rojo neutro-bilis-glucosa (VRBD) y una vez solidificado el agar se recubrió con 5 mL más del mismo medio. Las placas se incubaron a 37(1) °C durante 48 horas.

4.4.4. *Staphylococcus aureus*

Su recuento se fundamentó en la Norma ISO 6888-1 (AENOR, 1999). Así pues, se realizó una siembra en superficie de 0,1 mL

sobre agar BP (Baird Parker). En este caso el tiempo de incubación fue de 48 horas a 37(1) °C.

4.4.5. *Salmonella shigella*

La determinación de *Salmonella spp.* Se realizó según el procedimiento descrito por Pascual y Calderón (2000). Se pesaron 25 g de muestra en una bolsa de stomacher a los que se añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada estéril y se agitó durante 1 minuto en el stomacher. A partir de esta disolución, se realizó un preenriquecimiento a 37(1) °C durante 24 h. Tras este periodo, se realizó un enriquecimiento en dos caldos diferentes, Selenito-Cistina y Rappaport-Vassiliadis. Del primer caldo, se emplearon 100 mL a los que se añadieron 10 mL del preenriquecimiento, mientras que en el caso del Rappaport-Vassiliadis se emplearon 10 mL del caldo y 0,1 mL del preenriquecimiento. A continuación, el caldo elaborado con Selenito-Cistina se incubó a 37(1) °C, mientras que el elaborado a partir de Rappaport-Vassiliadis se incubó a 42(1) °C, ambos durante 24 h.

Cada uno de los dos caldos se sembraron por duplicado y en triple estría en dos medios de cultivo diferentes: agar Verde Brillante Agar (BGA, Scharlau) y agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD, Scharlau). Todas las placas se incubaron a 37(1) °C durante 48 h. Tras la incubación, las colonias sospechosas de ser *Salmonella* aparecían de color blanco rosado en BGA, y rojas con el centro negro en XLD. Finalmente, la confirmación se realizó en tubo de agar Hierro Triple Azúcar (TSI, Scharlau), mediante siembra en estría en la superficie inclinada y en la parte profunda por picadura. Los tubos se incubaron a 37(1) °C durante 24 h. Los cultivos típicos de *Salmonella* en TSI se caracterizan por presentar color rojo en la

parte inclinada del tubo y color amarillo en la parte profunda, con o sin producción de H₂S (ennegrecimiento o no del medio).

4.5. Almacenamiento en refrigeración

El almacenamiento en refrigeración (4 °C) se llevó a cabo para la formulación base (1% de NaCl y 0,3% de MTGasa) y la fórmula fuente de fibra (1% de konjac glucomanano y 1,5% de goma xantana), tanto en las muestras frescas como las muestras tratadas térmicamente. Todas las muestras fueron envasadas a vacío en bolsas de polietileno. Los tiempos de almacenamiento variaron en función de la formulación y del tratamiento térmico.

4.6. Análisis de microestructura. Cryo-SEM

El análisis estructural de las muestras se realizó mediante la técnica Cryo-SEM. Se utilizó un equipo JEOL JSM-5410 (JEOL Ltd., Tokyo, Japón) y una cámara externa de criocongelación Oxford CT-1500 (Oxford Instruments, Eynsham, UK) del servicio de microscopía de la UPV. Se cortaron piezas de 4 mm de largo, 1,5 de ancho y 5 mm de alto de los texturizados. Las muestras se situaron en un portamuestras y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido (-210 °C). Después se pasaron a la criocámara del microscopio donde se fracturaron, sublimaron (a -94,5 °C, a vacío de 10⁻⁵ torr durante 15 minutos), se recubrieron de oro y se observaron en la cámara fría por SEM. Con este equipo la superficie fracturada de la muestra congelada se puede observar directamente mientras se mantiene a una temperatura de -150 °C o inferior.

4.7. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). Con el objetivo de comprobar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tipos de muestras para cada uno de los parámetros evaluados se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó el procedimiento LSD (*least significant difference*) para comprobar las diferencias a un nivel de significación $\alpha=0,05$. Así, se realizaron diferentes ANOVAS simples para cada uno de los parámetros fisicoquímicos y ANOVAS multifactoriales utilizando como factores: el nivel de sal, el nivel de transglutaminasa o la presencia de fibra según el caso. Finalmente se realizaron Análisis Factoriales con el programa SPSS v.16.0. (IBM Corp., New York, USA) con licencia de uso en la UPV.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos obtenidos en el análisis sensorial se realizó una comparación pareada múltiple utilizando la técnica de Análisis de Friedman (Pairwise Ranking Test) (Meilgaard et al., 1999), para comparar las distintas muestras por jueces inexpertos. La prueba permite ordenar las muestras en una escala de intensidad para el atributo escogido y proporciona una indicación numérica de las diferencias entre muestras y de la significación de estas diferencias. Para evaluar el grado de preferencia de los catadores con respecto a los resultados obtenidos según los atributos de las formulaciones evaluadas, se realizó un análisis de correspondencias con el programa SPSS v.16.0. (IBM Corp., New York, USA) con licencia de uso en la UPV.

IV.5. RESULTADOS

La obtención de reestructurados permite elaborar productos con alto valor añadido empleando como materia prima pescado proveniente de diversas fuentes como, por ejemplo: especies de pescado con escaso valor comercial, especies con tamaño comercial pequeño o restos del fileteado de especies comerciales. El desarrollo de dichos productos tiene un papel importante en el incremento del nivel socioeconómico de la industria acuícola y por otra parte la obtención de productos reestructurados de pescado en forma de "salchichas o longanizas" permite al joven consumidor tener alternativas al consumo de pescado en fresco o congelado dándoles la opción de comer dicho alimento en otras presentaciones más fáciles de cocinar y de conservar en refrigeración.

5.1. Obtención de una formulación base mediante la adición de transglutaminasa microbiana (MTGasa) combinada con NaCl a diferentes niveles

La técnica más utilizada para la obtención de productos reestructurados a base de pescado es la solubilización de los extractos de proteínas miofibrilares mediante la adición de un 1-3% de sal dando lugar a un exudado de carácter pegajoso que va a permitir formar una pasta de pescado más o menos compacta (Kuraishi et al., 1997). El nivel de sal empleado es importante ya que va a influir sobre la cantidad de exudado proteico obtenido y por tanto sobre el mecanismo de agregación proteica (Téllez-Luis et al., 2002; Sun, 2009). Varios autores han estudiado el uso de diferentes agentes "ligantes" (Yetim y Ockerman, 1995; Baker et al., 2000; Uresti et al., 2004; Min y Green, 2008) para mejorar las propiedades funcionales y texturales de los productos

reestructurados y según dichos estudios el agente "ligante" más eficiente y más ampliamente utilizado es la transglutaminasa microbiana. Dicha enzima, tal y como se ha explicado en la introducción del presente capítulo, induce las uniones covalentes entre proteínas catalizando la reacción entre un grupo amino (p.e. la cadena lateral de una lisina -Lys-) y un grupo carboxiamida (p.e. la cadena lateral de un residuo de glutamina -Gln-). El uso de transglutaminasa permite reducir la cantidad de sal necesaria añadida a la formulación para la obtención de un producto reestructurado como ha sido previamente estudiado por diversos autores (Ramírez et al., 2002a; Ramírez et al., 2002b; Téllez-Luís et al., 2002). Uresti et al. (2004) en sus estudios han concluido que la adición de un 0,3% de transglutaminasa microbiana (MTGasa) mejora las propiedades texturales de los productos reestructurados a base de pescado con bajo contenido en sal pero afirman que, la transglutaminasa en ausencia de sal no permite obtener dichos productos con las características organolépticas y texturales deseadas.

En la Tabla IV.2 se presentan las formulaciones empleadas en este apartado. Las muestras control fueron formuladas solo con NaCl sin adición de MTGasa. Los estudios se llevaron a cabo tanto en las muestras frescas (sin tratamiento térmico) como en las muestras tratadas térmicamente.

Tabla IV.2. Formulaciones estudiadas para la obtención de la fórmula base.

Formulación	Dorada (<i>Sparus aurata</i>) (%)	Agua (%)	Sal (%)	MTGasa (%)
F10 (control)	89,0	10	1	0
F103	88,7	10	1	0,3
F106	88,4	10	1	0,6
F20 (control)	88,0	10	2	0
F203	87,7	10	2	0,3
F206	87,4	10	2	0,6

El análisis de los resultados se presenta de forma individualizada evaluando por una parte los resultados obtenidos para las muestras frescas y por otra los obtenidos para las muestras tratadas térmicamente, ya que el tratamiento térmico afecta a las características de la matriz proteica y por ello resulta de interés conocer su comportamiento y características.

5.1.1. Humedad, actividad de agua y pH

La Tabla IV.3. muestra los valores promedio de: humedad, actividad de agua (a_w) y pH de las diferentes formulaciones estudiadas, en función del contenido en NaCl y MTGasa presente en la muestra así como del tratamiento térmico. Los valores de humedad para las muestras sin tratamiento térmico (muestras frescas) oscilaron entre 70,3(0,2) g agua/100 g muestra y 72,62(0,09) g agua/100 g muestra, siendo el valor más bajo el obtenido para la formulación con 2% de NaCl y 0,3% de MTGasa (F203).

Tabla IV.3. Valores de humedad, a_w y pH obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de NaCl y transglutaminasa microbiana (MTGasa) presente en la misma así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).

	% MTGasa	% NaCl	% Humedad	a_w	pH
Sin tratamiento térmico	Control	1	72,62 (0,09) ^(a)	0,983 (0,001) ^(a)	6,103 (0,006) ^(a)
		2	71,3 (0,8) ^(b)	0,978 (0,001) ^(c)	6,12 (0,01) ^(b)
	0,3	1	72,5 (0,3) ^(a)	0,983 (0,000) ^(b)	6,1 (0,0) ^(a)
		2	70,3 (0,2) ^(b)	0,976 (0,001) ^(d)	6,14 (0,01) ^(bc)
	0,6	1	71 (0,4) ^(b)	0,982 (0,001) ^(b)	6,183 (0,006) ^(d)
		2	70,8 (0,1) ^(b)	0,978 (0,001) ^(c)	6,143 (0,006) ^(c)
Con tratamiento térmico	Control	1	72,8 (0,6) ^(a)	0,983 (0,001) ^(a)	6,307 (0,006) ^(a)
		2	70,6 (0,2) ^(bc)	0,980 (0,001) ^(b)	6,283 (0,006) ^(c)
	0,3	1	72,4 (0,5) ^(a)	0,984 (0,000) ^(a)	6,407 (0,006) ^(b)
		2	70,8 (0,2) ^(bc)	0,979 (0,001) ^(b)	6,277 (0,006) ^(c)
	0,6	1	71 (0,4) ^(b)	0,985 (0,001) ^(a)	6,4 (0,0) ^(b)
		2	70,1 (0,8) ^(c)	0,979 (0,001) ^(b)	6,2 (0,0) ^(d)

(a)(b)(c)(d) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) utilizando como factor las formulaciones estudiadas.

La adición de agua a los productos reestructurados es importante para conseguir una textura adecuada en el producto final. La naturaleza polar de las moléculas de agua favorece el agrupamiento de los residuos hidrofóbicos dentro de la cadena polipeptídica para minimizar la entropía que resultaría de la exposición al agua de la superficie de los residuos hidrofóbicos. Esto hecho también contribuye a la estabilidad conformacional de las moléculas proteicas antes del calentamiento y podría ser la base de las uniones intermoleculares cuando residuos hidrofóbicos de moléculas proteicas adyacentes son expuestas a la superficie durante el calentamiento. De esta manera, el agua sirve inicialmente para dispersar las proteínas miofibrilares, permitiendo una red más amplia para llevar a cabo las uniones proteína-

proteína formadas durante el calentamiento. Las proteínas miofibrilares cargadas son solubles en agua y en presencia de sal, siendo estabilizadas en una particular red tridimensional por el balance entre las fuerzas intermoleculares y las interacciones superficiales con el agua (Lanier, 1990). La presencia de agua es importante ya que puede afectar a parámetros fundamentales para la aceptación del producto, tales como: la dureza, la cohesividad, el color y el flavor del gel y por ello es necesario desarrollar una formulación que mantenga una cantidad de agua óptima en su matriz. La presencia de NaCl y MTGasa en las formulaciones frescas tuvieron un efecto significativo sobre la humedad de las mismas. Los valores más bajos de humedad se obtuvieron en aquellas muestras que contenían un 2% de NaCl. La adición de 0,3% de MTGasa presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ambos niveles de sal empleados, sin embargo cuando se empleó un 0,6% de MTGasa el nivel de NaCl no mostró ningún efecto sobre este parámetro. Las muestras tratadas térmicamente presentaron valores de humedad similares a las frescas. El valor más bajo se obtuvo para la formulación con 2% de NaCl y 0,6% de MTGasa (F206). En este caso aparecieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre 1% y 2% de NaCl independientemente del nivel de MTGasa.

En cuanto a los valores de actividad de agua (a_w) de las muestras frescas se observa que, las diferentes formulaciones se vieron afectadas fundamentalmente por la adición de sal, tal y como era de esperar. La a_w descendió significativamente ($p \leq 0,05$) por el incremento del nivel de NaCl independientemente del nivel de MTGasa empleado. El efecto conservador de la adición de sal es debido fundamentalmente al descenso de los valores de a_w que provoca, limitando así el crecimiento de microorganismos. El

tratamiento térmico no afectó a los valores de a_w observándose el mismo comportamiento que para las muestras frescas.

Finalmente, los valores de pH obtenidos en función del nivel de sal y de MTGasa empleada en la formulación para las muestras frescas mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ambos niveles de NaCl independientemente del nivel de MTGasa empleado. Por otra parte, para las formulaciones con 1% de NaCl la adición de MTGasa también mostró diferencias significativas entre el nivel de 0,3 y 0,6%. Las muestras tratadas térmicamente con un 2% de NaCl en su formulación presentaron menores valores de pH ($p \leq 0,05$) que las muestras que solo contenían 1% de NaCl. En este caso también aparecieron diferencias significativas entre ambos valores de NaCl independientemente del nivel de MTGasa empleado. El incremento del nivel de transglutaminasa produjo un ligero pero significativo descenso ($p \leq 0,05$) en los valores de pH. Leroi y Joffraud (2000) en un estudio llevado a cabo en salmón ahumado, concluyen que la adición de sal (NaCl) en la formulación produjo un descenso lineal significativo en los valores de pH. El descenso de pH en el pescado debido a la adición de sal puede ser explicado por el incremento de la fuerza iónica de la solución que se encuentra en el interior de las células (Leroi y Joffraud, 2000).

De acuerdo con Uresti et al. (2004), tras el análisis de los resultados obtenidos, se observa que la adición de sal no solo es necesaria para favorecer la acción de la transglutaminasa si no también para reducir el nivel de humedad y de actividad de agua presente en la muestra, factores limitantes para la vida útil del producto.

5.1.2. Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua (CRA) es un parámetro directamente relacionado con la jugosidad de los alimentos, de manera que valores altos de CRA se corresponden con productos jugosos (Huss, 1998). La CRA de agua de este tipo de productos es importante por diversos motivos: desde un punto de vista económico, la pérdida de agua es comercialmente equivalente a la pérdida de producto y además el exudado acumulado no es atractivo para el consumidor. Por otra parte, hay que destacar que la habilidad de un producto por retener agua tiene una influencia importante sobre la textura del mismo (Fennema, 1990; Olsson et al., 2003). La Figura IV.4. muestra la variación de los valores obtenidos para la capacidad de retención de agua en función de la formulación estudiada y del tratamiento térmico. Los valores de CRA para las muestras sin tratamiento térmico (Figura IV.4. a) oscilaron entre 93,1(0,5)% y 96,2(0,2)%, siendo el valor más alto el obtenido en la formulación con 2% de NaCl y 0,6% de MTGasa (F206). En las muestras con 1% de NaCl la adición de MTGasa afectó significativamente ($p \leq 0,05$) provocando un descenso de los valores de CRA. La interacción entre la sal y MTGasa en las muestras frescas resultó significativa y los análisis estadísticos mostraron que en las formulaciones con 0,6% de MTGasa la cantidad de NaCl afectó de forma significativa obteniéndose valores más altos en aquellas formulaciones con 2% de NaCl.

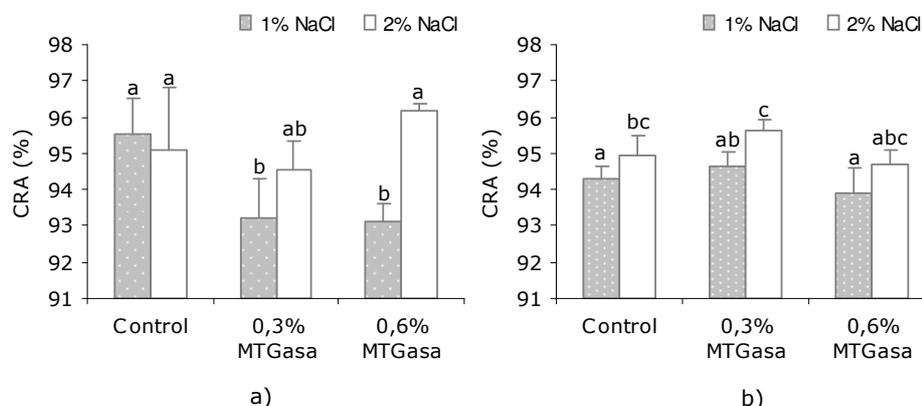


Figura IV.4. Valores de capacidad de retención de agua (CRA) obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de sal y de transglutaminasa empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).

En las muestras tratadas térmicamente se observa (Figura IV.4. b) que la aplicación del tratamiento térmico redujo, en algunos casos, los valores de CRA siendo el valor más alto 95,6(0,3)% correspondiente a la formulación con 2% de NaCl y 0,3% de MTGasa (F203). En este caso la adición de 2% de NaCl dio mayores valores de CRA mostrando diferencias significativas en las muestras control y en aquellas que contenían 0,3% de MTGasa. Por otra parte, las formulaciones con 0,6% de MTGasa mostraron valores más bajos de CRA comparados con aquellas con 0,3% de MTGasa aunque no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Sin embargo, este resultado ya fue observado por Ramírez et al. (2002b) en sus estudios, en donde se veía que un exceso MTGasa en la formulación podía causar un incremento en las interacciones proteína-proteína con el consecuente descenso entre las uniones proteína-agua induciendo por tanto un descenso en la capacidad de retención de agua. Así pues, la aplicación de una alta concentración

de MTGasa (0,6%) podría producir una excesiva agregación proteica en detrimento de las propiedades texturales y de la capacidad de retención de agua en los productos reestructurados cocidos.

Los resultados mostraron que la adición de NaCl es necesaria para inducir las uniones proteína-agua durante la elaboración de los productos reestructurados aunque para la obtención de un gel bien estructurado es necesario un correcto balance entre las uniones proteína-agua y las uniones proteína-proteína inducidas por la MTGasa. En términos generales, la adición de NaCl a la pasta de pescado, con suficiente grado de picado, rompe las uniones iónicas entre proteínas, disolviendo y desestabilizando su estructura molecular hacia la subsecuente desnaturalización térmica y promueve las interacciones hidrofóbicas. Estas interacciones hidrofóbicas, reordenación de los puentes de hidrógeno así como de las uniones covalentes de proteínas, juegan un papel muy importante en la formación de la red proteica cuando el gel es calentado. Sin embargo, todavía hay desconocimiento sobre el mecanismo exacto responsable de la formación del gel (Sánchez-González et al., 2008) y en la bibliografía se puede observar que existen discrepancias sobre la contribución de la MTGasa en la capacidad de retención de agua y se considera que está condicionada por el tipo de producto, la cantidad de enzima, las condiciones de procesado, la calidad de la proteína, el tamaño de las partículas a partir de las cuales se elabora el reestructurado, etc. (Fisher, 1999; Kerry et al., 1999; Kuraishi et al., 2001; Cofrades et al., 2006).

5.1.3. Propiedades ópticas

Los valores correspondientes a las coordenadas de color (L^* , a^* , b^* , tono (h_{ab}^*) y croma C_{ab}^*) de las diferentes formulaciones en función del nivel de NaCl y MTGasa, así como del tratamiento térmico, se presentan en la Tabla IV.4. En las muestras frescas la adición de 1 ó 2% de NaCl en aquellas muestras sin MTGasa (control) no afectó de manera significativa ($p > 0,05$) a ninguna de las coordenadas colorimétricas. Los valores de L^* se vieron modificados por la adición de MTGasa apareciendo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ambos niveles de NaCl para cada nivel de MTGasa estudiado. Sin embargo, los valores de a^* no se vieron afectados ni por la adición de NaCl ni por la MTGasa.

En las muestras con 1% de NaCl la adición de 0,3 ó 0,6% de MTGasa también modificó significativamente los valores de b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^* siendo las diferencias más evidentes en aquellas fórmulas con 0,3% de MTGasa entre ambos niveles de NaCl. El tratamiento térmico produjo un aumento de los valores de luminosidad (L^*) alcanzando valores de 67,5(2,4) pero en este caso, la adición de NaCl y de MTGasa no afectó a este parámetro. El tratamiento térmico aumentó los valores de L^* , debido a la coagulación proteica, sin apreciarse diferencias significativas por la adición de NaCl ni MTGasa. El resto de coordenadas colorimétricas (a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^*) en las muestras tratadas térmicamente se vieron afectadas por la presencia de NaCl, apareciendo diferencias significativas entre el 1 y 2% de NaCl para cada nivel de MTGasa estudiado.

Tabla IV.4. Coordenadas de color CIEL*a*b*, tono (h_{ab}^*) y croma (C_{ab}^*) de las diferentes formulaciones estudiadas en función del nivel de NaCl y MTGasa, así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).

	% MTGasa	% NaCl	L*	a*	b*	h_{ab}^*	C_{ab}^*
Sin tratamiento térmico	Control	1	51,0 (2,7) ^(a)	-2,3 (0,6) ^(a)	6,2 (1,1) ^(a)	110,4 (5,6) ^(a)	6,6 (1,1) ^(a)
		2	49,4 (1,3) ^(a)	-2,1 (0,2) ^(a)	5,5 (1,3) ^(a)	111,7 (6,3) ^(ab)	5,9 (1,1) ^(a)
0,3	Control	1	51,4 (1,3) ^(c)	-2,0 (0,2) ^(a)	6,7 (0,7) ^(c)	106,6 (0,8) ^(c)	7,0 (0,8) ^(b)
		2	48,3 (1,6) ^(a)	-2,5 (0,3) ^(a)	5,1 (0,7) ^(ab)	116,4 (3,2) ^(a)	5,7 (0,7) ^(ab)
0,6	Control	1	51,1 (0,8) ^(c)	-2,4 (0,1) ^(a)	6,2 (0,5) ^(bc)	111,0 (2,1) ^(bc)	6,6 (0,4) ^(b)
		2	51,6 (2,2) ^(b)	-2,4 (0,1) ^(a)	6,2 (0,6) ^(bc)	110,9 (2,2) ^(abc)	6,6 (0,5) ^(b)
Con tratamiento térmico	Control	1	67,5 (2,4) ^(a)	-2,2 (0,2) ^(a)	8,1 (1,1) ^(a)	105,2 (3,0) ^(a)	8,4 (1,0) ^(a)
		2	66,5 (3,0) ^(a)	-2,6 (0,4) ^(c)	6,4 (0,8) ^(bc)	112,4 (4,4) ^(c)	6,9 (0,7) ^(bc)
0,3	Control	1	65,0 (1,1) ^(a)	-2,2 (0,2) ^(b)	7,9 (0,8) ^(b)	105,5 (2,0) ^(b)	8,2 (0,7) ^(b)
		2	64,6 (2,8) ^(a)	-2,2 (0,4) ^(bc)	7,2 (1,9) ^(c)	107,9 (4,2) ^(bc)	7,5 (1,8) ^(c)
0,6	Control	1	67,4 (2,4) ^(a)	-2,1 (0,2) ^(a)	8,3 (1,0) ^(a)	104,7 (3,1) ^(a)	8,5 (0,9) ^(a)
		2	65,9 (1,8) ^(a)	-2,5 (0,4) ^(bc)	6,6 (1,3) ^(c)	111,4 (5,0) ^(c)	7,1 (1,2) ^(c)

(a)(b)(c) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) utilizando como factor las formulaciones estudiadas.

Las diferencias de color encontradas para las formulaciones estudiadas no suponen en este caso un factor limitante a la hora de escoger una u otra formulación ya que, aunque dichas diferencias en algunos casos son significativas, no muestran ninguna tendencia en función de la cantidad de NaCl o MTGasa añadida.

5.1.4. Propiedades mecánicas

Con el objetivo de analizar como afecta la adición de NaCl y NaCl combinado con MTGasa así como el tratamiento térmico en las propiedades mecánicas del producto reestructurado, se llevó a cabo el ensayo de TPA descrito en el apartado 4.2.6. de materiales y métodos. Los valores de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con dicho ensayo para las diferentes formulaciones en función del nivel de sal y de transglutaminasa (MTGasa), se muestran en la Figura IV.5. En las muestras frescas (Figura IV.5. a), la adición de NaCl afectó fundamentalmente a los valores de dureza, gomosidad y cohesividad, siendo las muestras con 2% de NaCl significativamente ($p \leq 0,05$) más duras, más gomosas y menos cohesivas que aquellas que tan solo contenían 1% de NaCl, independientemente del nivel de MTGasa empleado en la formulación. Sin embargo, la adición de MTGasa afectó a los valores de dureza, adhesividad y cohesividad siendo las muestras con MTGasa más duras y menos adhesivas y cohesivas que las muestras control. Entre ambos niveles de MTGasa no aparecieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los parámetros comentados para un mismo nivel de NaCl. La disminución en los valores de adhesividad debido a la presencia de MTGasa puede ser explicada por la acción de dicha enzima sobre las uniones proteína-proteína formando una red tridimensional responsable de una mayor

retención de agua y una disminución de exudado que es el responsable de que la superficie se muestre “pegajosa”. Los valores de elasticidad se vieron significativamente afectados por la adición de 0,3% de MTGasa mostrando comportamientos inversos en función del nivel de NaCl empleado. Los análisis estadísticos realizados para las muestras tratadas térmicamente (Figura IV.5. b) mostraron que la adición de NaCl y MTGasa no afectó significativamente ni a la cohesividad ni a la elasticidad de las muestras. Uresti et al. (2006), en estudios llevados a cabo en geles de surimi, observaron que la cohesividad de éstos no se ve afectada por el tratamiento térmico ni por los tratamientos de altas presiones pero que concentraciones superiores al 0,5% de MTGasa la disminuye, por lo que se considera que esa cantidad no debe ser sobrepasada ya que afecta negativamente a uno de los principales parámetros de calidad del los geles de surimi. La dureza se vio significativamente afectada por la adición de MTGasa ($p \leq 0,05$) y solo aparecieron diferencias significativas entre ambos niveles de MTGasa para el 2% de NaCl. Finalmente, la gomosidad de las muestras tratadas térmicamente también se vio afectada por la interacción de ambos factores: la adición de NaCl y MTGasa. El tratamiento térmico aumenta considerablemente la dureza, la gomosidad y la elasticidad del producto reestructurado y reduce la adhesividad con respecto a las muestras frescas.

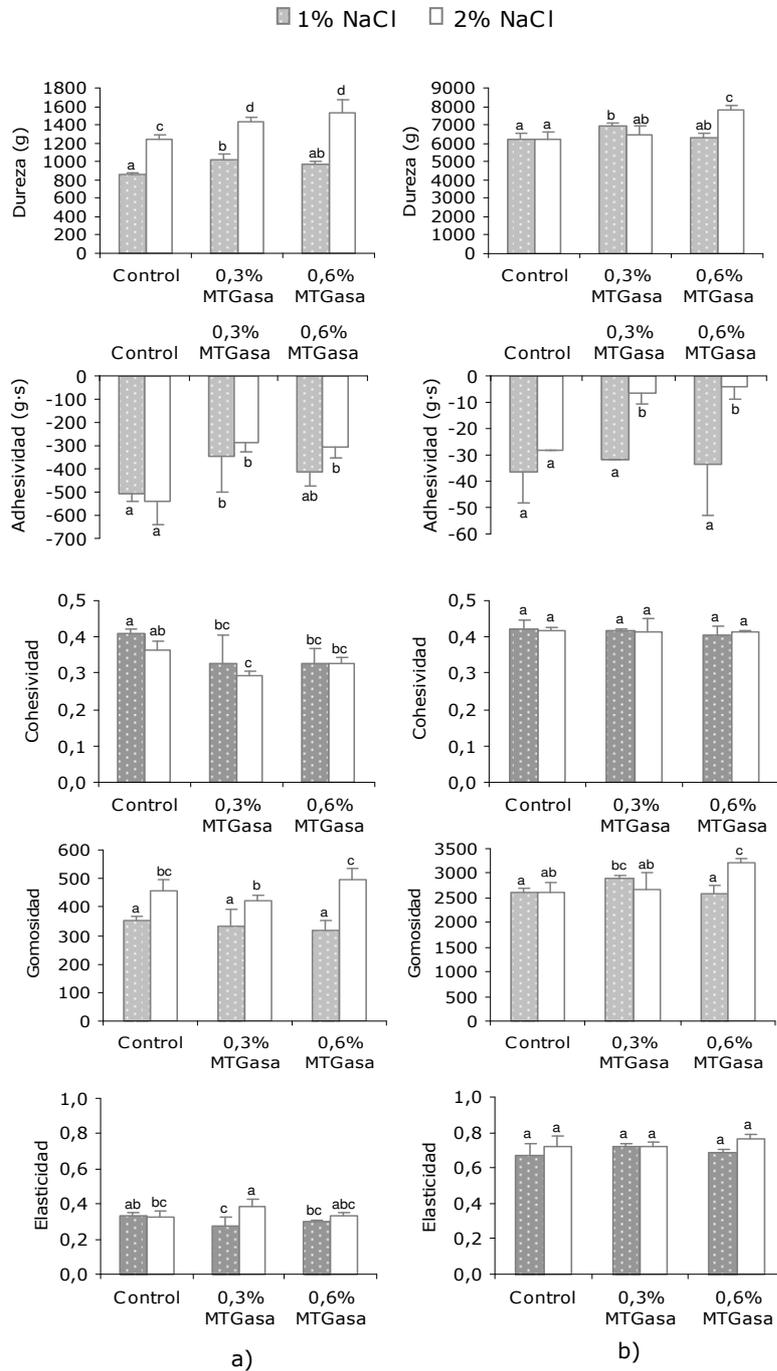


Figura IV.5. Valores de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con

el ensayo de TPA para las diferentes formulaciones en función del nivel de sal y de transglutaminasa (MTGasa) empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).

En resumen, se puede observar que tanto la adición de NaCl como de MTGasa afectan a los parámetros texturales del producto reestructurado confiriéndole propiedades diferentes que influirán fundamentalmente en la aceptación del mismo por parte del consumidor. Esto vuelve a poner de manifiesto el efecto sinérgico del NaCl y la MTGasa que ha sido confirmado por otros autores, como Kütemeyer et al. (2005) que en sus estudios afirman que la adición de cloruro sódico tiene efecto positivo sobre la actividad enzimática de la MTGasa mejorando su actividad y la solubilidad del enzima en agua. Wan et al. (1992) en sus trabajos observaron que la adición de NaCl resultó en un incremento de la dureza del gel de las muestras frescas y tratadas térmicamente mostrando un efecto sinérgico con la MTGasa.

Los resultados obtenidos para los parámetros físico-químicos y las propiedades ópticas y mecánicas, muestran que es necesaria la incorporación de NaCl para la obtención de productos reestructurados con propiedades aceptables utilizando transglutaminasa como agente "ligante". La aplicación de 1% de NaCl junto con 0,3% de MTGasa permite obtener productos reestructurados con buenas propiedades texturales y atributos funcionales apropiados. No obstante, para determinar la cantidad de sal y de MTGasa aceptada por los consumidores, se realizó un análisis sensorial cuyos resultados se muestran en el apartado 5.1.6.

5.1.5. Análisis factorial de las muestras formuladas con NaCl y MTGasa

Con el objetivo de tratar de evaluar y relacionar en mayor grado el efecto de la adición de NaCl y MTGasa a diferentes niveles sobre las propiedades del producto reestructurado de dorada (*Sparus aurata*) se llevó a cabo un análisis factorial con los datos obtenidos en los parámetros físico-químicos y mecánicos con los datos físico-químicos y texturales.

5.1.5.1. Análisis factorial de las muestras con NaCl y MTGasa sin tratamiento térmico

En este apartado se muestran los resultados obtenidos para el análisis factorial de las muestras sin tratamiento térmico. De dicho análisis se obtuvieron dos factores que explican el 76,512% de la variabilidad de los datos (Tabla IV.5.).

Tabla IV.5. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.

Factor	% Explicado	% Acumulado
1	48,216	48,216
2	28,295	76,512

El Factor 1, que explica el 48,216% de la variabilidad (Tabla IV.6), recoge las siguientes variables: gomosidad, elasticidad, dureza, actividad de agua (a_w) y capacidad de retención de agua (CRA), mientras que el Factor 2, que explica el 28,295% de la variabilidad, recoge las variables: cohesividad, adhesividad y humedad.

Tabla IV.6. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.

	Factor 1	Factor 2
Gomosidad	0,934	
Elasticidad	0,759	
Dureza	0,72	
a_w	-0,706	
CRA	0,663	
Cohesividad		0,957
Adhesividad		-0,871
Humedad		-0,635

Tal y como se puede observar en la Figura IV.6., el análisis factorial muestra un efecto importante del nivel de NaCl presente en la formulación lo que confirma los resultados analizados hasta el momento para los parámetros físico-químicos y mecánicos, es decir, que el nivel de NaCl afecta en mayor medida a las propiedades estudiadas que la proporción de MTGasa empleada. Las muestras con 2% NaCl presente en la formulación mostraron mayores valores para las propiedades mecánicas estudiadas (dureza, elasticidad, gomosidad) así como una mayor capacidad de retención de agua con un menor nivel de humedad y de actividad de agua (a_w). El nivel de NaCl afecta de manera directa y determinante a la dureza, gomosidad, elasticidad, a_w y CRA de las muestras separando claramente a las muestras con 1% de NaCl de aquellas que fueron formuladas con 2% de NaCl.

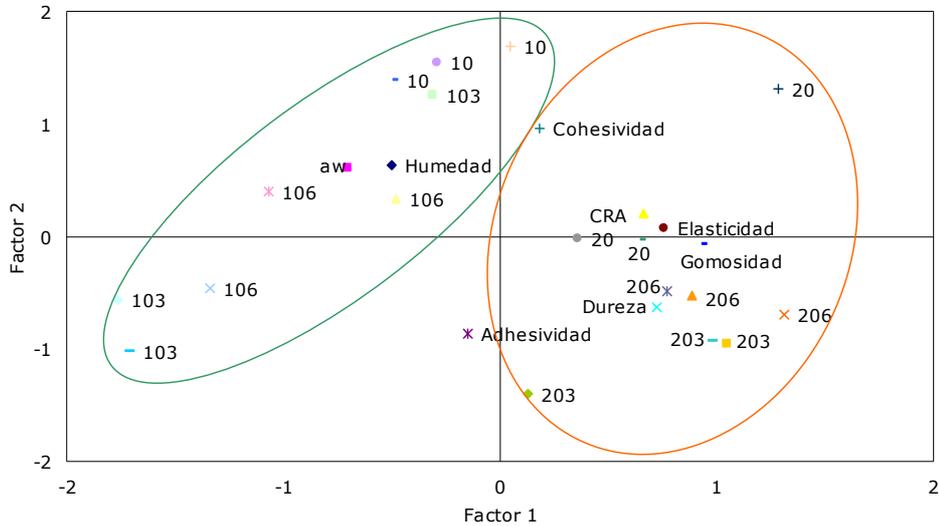


Figura IV.6. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas sin tratamiento térmico.

5.1.5.2. Análisis factorial de las muestras con NaCl y MTGasa con tratamiento térmico

En el caso de las muestras tratadas térmicamente el análisis factorial extrajo dos factores que son capaces de explicar el 71,819% de la variabilidad mostrada por los datos (Tabla IV.7.). En este caso el factor 1 está compuesto por las variables: dureza, gomosidad, elasticidad y cohesividad y explica el 49,322% de la variabilidad, mientras que, el factor 2 que explica el 22,497% de la variabilidad está formado por la adhesividad, a_w , humedad y la CRA (Tabla IV.8.).

Tabla IV.7. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.

Factor	% Explicado	% Acumulado
1	49,322	49,322
2	22,497	71,819

Tabla IV.8. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.

	Factor 1	Factor 2
Dureza	0,96	
Gomosidad	0,897	
Elasticidad	0,87	
Cohesividad	0,083	
Adhesividad		0,813
a_w		-0,865
Humedad		-0,71
CRA		0,846

En la Figura IV.7. se muestra como para el caso de las muestras tratadas térmicamente el análisis factorial presenta una distribución de las muestras similar a la observada para las muestras frescas. En este caso también se observa que las muestras se separan en función del nivel de NaCl empleado en la formulación mostrando un efecto determinante en las variables estudiadas. No obstante, para las muestras tratadas térmicamente la presencia de 1 ó 2% de NaCl afecta fundamentalmente a las variables correspondientes al Factor 2, es decir, a la dureza, gomosisidad, elasticidad y cohesividad.

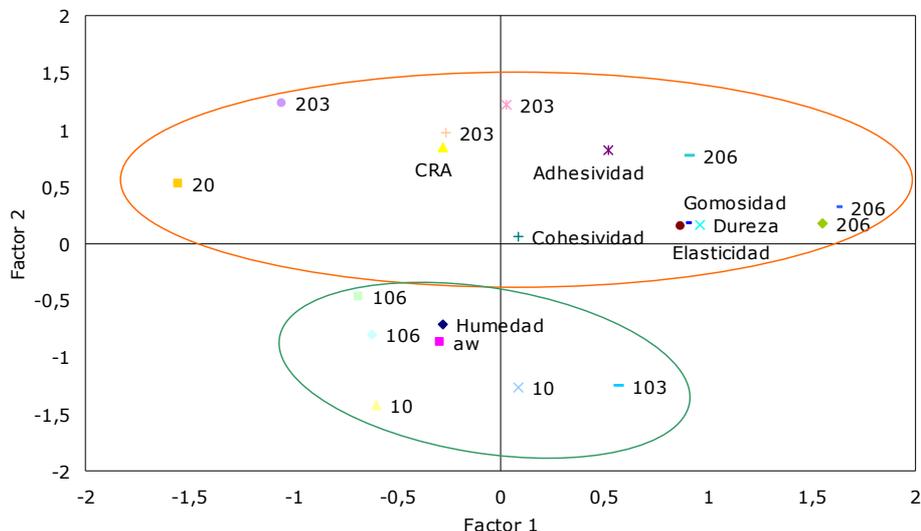


Figura IV.7. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas con tratamiento térmico.

5.1.6. Análisis sensorial

En este apartado se presentan los resultados obtenidos para dos análisis sensoriales. El objeto del primer análisis, tal y como se indica en el apartado 4.3. del presente capítulo, fue seleccionar el nivel de transglutaminasa óptimo para conseguir la dureza deseada en la formulación base. Para ello se fijó un nivel de sal (1% NaCl) y se probaron tres niveles de transglutaminasa (0, 0,3 y 0,6% MTGasa). El segundo análisis se llevó a cabo con el fin de obtener el nivel de sal óptimo en la formulación base.

5.1.6.1. Análisis sensorial para la determinación del nivel MTGasa

Las respuestas de los catadores se obtuvieron a partir del cuestionario (Anexo A) que se les repartió a cada catador, tal y

como se explica en el apartado 4.3 de materiales y métodos del presente capítulo. Para analizar las respuestas obtenidas por los catadores en relación a la comparación pareada múltiple llevada a cabo se elaboró la Tabla IV.9. donde en las columnas se encuentra el número de veces (frecuencia) que una determinada muestra fue seleccionada cuando se comparaba con todas y cada una del resto de muestras para un mismo atributo (filas).

Tabla IV.9. Frecuencia de las respuestas de los catadores en la comparación pareada múltiple de las formulaciones con diferentes niveles de transglutaminasa.

Atributos	0% MTGasa	0,3% MTGasa	0,6% MTGasa
Aspecto	32	21	28
Dureza	25	16	40
Gomosidad	24	30	27
Muestra preferida	32	22	27

Con el fin de comparar todas las muestras en conjunto, el análisis de los resultados se llevó a cabo a partir de la utilización del Test de Friedman (Meilgaard et al., 1999) y el análisis de correspondencias.

Test de Friedman y Suma de Rangos

La primera etapa del análisis fue obtener la suma de rangos de cada muestra. Este valor se obtuvo adicionando a la suma de las frecuencias de las filas, dos veces la suma de las frecuencias de las columnas para cada formulación. Una vez obtenida la suma de rangos para cada formulación se calculó la función estadística T de Friedman (ecuación IV.2.) para comprobar si las diferencias encontradas en la ordenación de las puntuaciones de los atributos y la preferencia fueron significativas.

$$T = \left(\frac{4}{pt} \right) \sum_{i=1}^t R^2 - (9p[t-1]^2) \quad \text{ecuación IV. 2.}$$

donde:

p = número de veces que el diseño básico se repite (p=27)

t = número de muestras (t=3)

R = suma de rangos para cada tratamiento

Los valores obtenidos con esta fórmula (Tabla IV.10.) se compararon con el valor estadístico tabulado de χ^2 con 2 grados de libertad (5,99 con un nivel de confianza de $\alpha=0,05$). En la Tabla IV.10. se aprecia que los catadores solo encontraron diferencias significativas para el atributo dureza, debido a que el valor de T calculado para dicho atributo fue mayor que el valor de χ^2 tabulado.

Tabla IV.10. Valores T de Friedman para los distintos atributos analizados.

Atributos	T de Friedman
Aspecto	3,1
Dureza	14,5*
Gomosidad	0,9
Muestra preferida	2,5

(*)Diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.

Con el fin de ver entre qué muestras existen diferencias significativas, se realizó una comparación múltiple entre las muestras, empleando el método HSD (Honestly Significance Difference) de Tukey (Meilgaard et al., 1999). Para calcular el valor HSD de Tukey se utilizó la ecuación IV.3.

$$\text{HSD} = q_{\alpha, t, \infty} \sqrt{\frac{pt}{4}} \quad \text{ecuación IV.3.}$$

donde:

$q_{\alpha, t, \infty}$ = valor tabulado

p = número de veces que el diseño ha sido repetido (p=27)

t = número de muestras (t=3)

En este caso el valor de q tabulado para 2 grados de libertad y un nivel de confianza de $\alpha=0,05$, es de 3,31. El valor HSD que se obtuvo fue de 14,90. Para comparar entre las distintas parejas que se ofrecieron a los jueces, se hizo la diferencia de suma de rangos (Tabla IV.11.), restando lo que dio la suma de rangos de una muestra a la suma de rangos de la muestra con la que se compara, siempre en valor absoluto. Las diferencias se compararon con el valor de HSD y fueron significativas cuando superó este valor.

Tabla IV.11. Diferencia entre la suma de rangos para las formulaciones estudiadas.

Atributos	0% MTGasa-0,3% MTGasa	0% MTGasa-0,6% MTGasa	0,3% MTGasa-0,6% MTGasa
Aspecto	11	4	7
Dureza	9	15*	24*
Gomosidad	6	3	3
Muestra Preferida	10	5	5

(*) Diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.

Se puede observar en la Tabla IV.11. que las diferencias significativas se establecieron, para el atributo dureza, entre la muestra que no contenía MTGasa en su formulación y la que contenía un 0,6% y entre la muestra con 0,3% de MTGasa y la de 0,6%. Los catadores no encontraron diferencias significativas entre las muestras que no llevaban MTGasa y las que llevaban un 0,3%.

El resto de atributos estudiados en el análisis sensorial no se vieron modificados por la presencia de MTGasa como se puede observar en los resultados obtenidos.

Análisis de correspondencias

Para determinar la preferencia y las relaciones que tenían los diferentes niveles de MTGasa con respecto a los atributos estudiados se prosiguió con el análisis de correspondencias. Los resultados obtenidos no fueron significativos y por tanto no se pudo extraer información adicional relevante para el análisis de los datos.

Los resultados obtenidos en este primer análisis sensorial indican que existen diferencias significativas para el atributo dureza en función del nivel de MTGasa empleado y estas diferencias se establecen entre aquellas muestras que no llevan MTGasa (0% MTGasa) y las que llevan 0,6% y entre las que llevan 0,3% y 0,6% de MTGasa. La formulación que más puntuación obtuvo en cuanto a la "muestra preferida" fue la de 0% de MTGasa, pero debido a que la presencia de 0,3% de MTGasa en la formulación reduce la adhesividad del producto reestructurado, y puesto que no aparecieron diferencias significativas para ningún atributo estudiado entre las muestras que no llevaban MTGasa (0%) y aquellas que llevaban 0,3%, se decidió fijar la cantidad de MTGasa en la fórmula base en un 0,3%.

5.1.6.2. Análisis sensorial para la determinación del nivel de NaCl

El objetivo del presente análisis, tal y como se ha especificado anteriormente, fue obtener el nivel óptimo de sal para elaborar la formulación base. El análisis de los resultados se llevó a cabo de la misma manera que en el apartado 5.1.6.1. En este caso se empleó la cantidad de MTGasa seleccionada en el primer análisis sensorial (0,3% de MTGasa) y se evaluaron tres niveles de NaCl (0%, 1% y 2%). Las respuestas de los catadores se obtuvieron a partir del cuestionario (Anexo B) que se repartió a cada catador, tal y como se explica en el apartado 4.3 de materiales y métodos del presente capítulo. En la Tabla IV.12. se muestran las frecuencias obtenidas para cada muestra en función del atributo evaluado.

Tabla IV.12. Frecuencia de las respuestas de los catadores en la comparación pareada múltiple de las formulaciones con diferentes niveles de NaCl.

Atributos	0% NaCl	1%NaCl	2%NaCl
Aspecto	25	32	33
Dureza	9	39	42
Nivel de sal	5	42	43
Muestra preferida	10	43	37

Al igual que en el apartado anterior (5.1.6.1.), el análisis de los datos obtenidos se efectuó mediante los análisis estadísticos que se comentan a continuación.

Test de Friedman y Suma de Rangos

En este caso la suma de rangos se calculó para las todas las formulaciones, tal y como se explica en el apartado 5.1.6.1. Una vez obtenida la suma de rangos para cada formulación se calculó la función estadística T de Friedman según la ecuación IV.2. para

comprobar si las diferencias encontradas en la ordenación de las puntuaciones de los atributos y la preferencia fueron significativas.

En la Tabla IV.13. se pueden observar los valores de T de Friedman obtenidos en este análisis sensorial. Dichos valores fueron comparados con el valor χ^2 tabulada con 2 grados de libertad (5,99 con un nivel de confianza de $\alpha=0,05$).

Tabla IV.13. Valores T de Friedman para los distintos atributos analizados.

Atributos	T de Friedman
Aspecto	1,7
Dureza	29,6*
Nivel de sal	41,7*
Muestra preferida	27,5*

(*)Diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.

Como puede observarse en la Tabla IV.13., en este análisis sensorial se establecieron diferencias significativas para todos los atributos analizados excepto para el aspecto, que no se vio modificado por el nivel de NaCl presente en la formulación.

Para evaluar entre qué muestras se establecían dichas diferencias significativas, se realizó una comparación múltiple entre las muestras empleando el método HSD (Honestly Significance Difference) de Tukey mediante la ecuación IV.3. En este caso el valor de q tabulado para 2 grados de libertad y un nivel de confianza de $\alpha=0,05$, es de 3,31. El valor HSD que se obtuvo fue de 15,70. Para comparar entre las distintas parejas que se ofrecieron a los jueces, se hizo la diferencia de suma de rangos (Tabla IV.14.) tal y como se explica en el apartado 5.1.6.1.

Tabla IV.14. Diferencia entre la suma de rangos para las formulaciones estudiadas.

Atributos	0% NaCl - 1% NaCl	0% NaCl - 2% NaCl	1% NaCl - 2% NaCl
Aspecto	7	8	1
Dureza	30*	33*	3
Nivel de sal	37*	38*	1
Muestra Preferida	33*	27*	6

(*) Diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.

El resultado de este análisis mostró diferencias significativas entre la muestra que no contenía NaCl en su formulación y las que contenían 1 ó 2%, para todos los atributos estudiados excepto para el aspecto. Los catadores apreciaban la presencia de NaCl pero no fueron capaces de diferenciar entre un 1% y un 2% de NaCl en la formulación.

Análisis de correspondencias

En este caso, con el objetivo de determinar la preferencia y las relaciones que tenían los diferentes niveles de NaCl con respecto a los atributos estudiados, se prosiguió con el análisis de correspondencias. De dicho análisis se obtuvieron dos factores que explican el 100% de la variabilidad de los datos (Tabla IV.15.), de esta forma se puede decir que los atributos y las diferentes formulaciones estuvieron bien representadas a lo largo del plano factorial.

Los datos presentados en las Tablas IV.16. y IV.17. muestran que las formulaciones y los atributos están bien representados a lo largo de los dos primeros factores, ya que las sumas de las contribuciones relativas de estos dos factores en relación a cada formulación fueron altas. Por lo tanto, los resultados más relevantes del análisis sensorial realizado pueden ser deducidos del

estudio de la proyección en el plano factorial representado en la Figura IV.8.

Tabla IV.15. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis de correspondencias.

Factor	% Explicado	% Acumulado
1	97,3	97,3
2	2,7	100

Tabla IV.16. Contribución de los factores a la inercia de las formulaciones.

Formulaciones	Factor 1	Factor 2	Suma de Factores
0% NaCl	1	0	1
1% NaCl	0,845	0,155	1
2% NaCl	0,819	0,181	1

Tabla IV.17. Contribución de los factores a la inercia de cada atributo.

Atributos	Factor 1	Factor 2	Suma de Factores
Aspecto	1	0	1
Dureza	0,870	0,130	1
Nivel sal	0,994	0,006	1
Muestra preferida	0,544	0,456	1

La Figura IV.8. muestra la proyección de los atributos y las formulaciones evaluadas en un plano factorial. Según la distribución de los atributos en el plano, se puede observar que la formulación preferida por los catadores fue la que tenía un 1% de NaCl. El nivel de NaCl afectó a la dureza de la muestra y los catadores identificaron la formulación con un 2% de NaCl como la más dura. En cuanto al nivel de sal, los catadores apreciaban la presencia de NaCl pero no eran capaces de diferenciar entre ambos niveles de NaCl (1 ó 2%). Finalmente, en la Figura IV.8. se puede

observar que el aspecto de las muestras no fue un atributo que consideraron importante a la hora de elegir la muestra preferida.

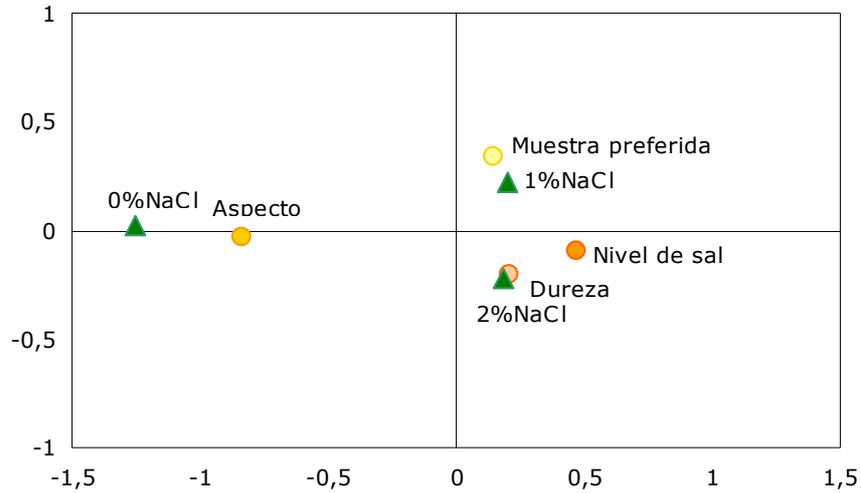


Figura IV.8. Análisis de correspondencias. Representación en el plano factorial, de los atributos elegidos (círculos) y las muestras evaluadas (triángulos).

En resumen, se puede decir que en el primer análisis sensorial los catadores no encontraron diferencias significativas entre la formulación que no contenía MTGasa y la que contenía 0,3% y, debido a que la presencia de 0,3% de MTGasa reduce la adhesividad del producto reestructurado, se decidió fijar el nivel de MTGasa en 0,3%. Por otra parte, en el segundo análisis sensorial los catadores eligieron aquella formulación que contenía 1% de NaCl y el atributo "aspecto" no tuvo un peso importante en la elección de la formulación preferida. Tras los resultados obtenidos, se decidió fijar la fórmula base con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa (F103). En posteriores apartados se procederá al estudio del almacenamiento de la misma con el fin de determinar su vida útil tanto en fresco como con tratamiento térmico.

5.1.7. Análisis estructural

Una de las formas de analizar las interacciones entre los diferentes ingredientes de una formulación es a través del análisis microestructural mediante microscopía electrónica de barrido. La microestructura de un alimento determina en gran medida sus características sensoriales y mecánicas. Ésta se define como una organización compleja de componentes químicos, sometidos a la influencia de fuerzas físicas internas y externas, visible únicamente a través de instrumentos específicos (Stanley y Tung, 1976). La estructura interna de los geles y reestructurados de pescado es una red tridimensional que se desarrolla como consecuencia de la solubilización proteica facilitada por la inclusión de una sal (NaCl principalmente) que eleva la fuerza iónica y un proceso de coagulación influenciado por la temperatura.

En este apartado se van a analizar los cambios estructurales del filete de dorada como consecuencia de su transformación de filete a pasta de pescado y de pasta de pescado a producto reestructurado de pescado. Al mismo tiempo se pretende analizar el efecto de la adición de los diferentes ingredientes (MTGasa y NaCl) sobre dichos cambios estructurales. En la Figura IV.9.a) se puede observar la estructura que muestra un corte transversal del filete de dorada fresco. En la micrografía se aprecian las miofibrillas rodeadas por una fina membrana del sarcolema, son estructuras reticulares formadas por los complejos proteicos de actina-miosina una vez sublimada el agua. En la micrografía correspondiente a la pasta de pescado (Figura IV.9.b) puede apreciarse que estas membranas han desaparecido quedando sólo la estructura proteica gelificada que forma un retículo poco compacto y que aparece mostrando un aspecto irregular. La regularidad, forma, grosor y tamaño de poros del retículo pueden dar una idea del grado de

agregación proteica que se produce. La pasta de pescado con 1% de NaCl y sin MTGasa (Figura IV.9.c) muestra un aspecto ligeramente diferente a la pasta de pescado sin NaCl, observándose una estructura más porosa con un mayor número de espacios vacíos presentes en la matriz, este aspecto podría ser debido a la solubilización proteica sufrida debido a la adición de NaCl. La presencia de 0,3% de MTGasa (Figura IV.9.d) redujo dichos espacios vacíos formando una estructura proteica más agregada dando lugar a una red con mayor densidad de entramado. En la Figura IV.9.e) se puede observar el efecto que tuvo el hecho de que la muestra fuera embutida y estuviera en refrigeración durante 24 horas. Si se compara la Figura IV.9.c) con la Figura IV.9.e) se observa un entramado más estructurado y compacto. Este resultado está en la línea del obtenido por Trespalacios y Pla (2007) que en sus estudios observaron que la red formada en geles de pollo con 1% de NaCl sin MTGasa mostró un mayor número de espacios vacíos dando un aspecto más poroso a la muestra y que dichos espacios fueron irregulares, mientras que en aquellas muestras a las cuales se les incorporó MTGasa en la formulación la estructura fue más compacta y homogénea.

Finalmente en la Figura IV.9.f) se puede observar el producto reestructurado con 0,3% de MTGasa y 1% de NaCl tras ser embutido en tripa de celulosa y después de un periodo de 24 horas de incubación. En dicha micrografía se puede observar que la matriz del gel muestra un aspecto más uniforme y compacto que las muestras analizadas hasta el momento, lo cual podría explicar la mayor dureza del gel que muestran las formulaciones con NaCl y MTGasa presente en la formulación respecto a las muestras control.

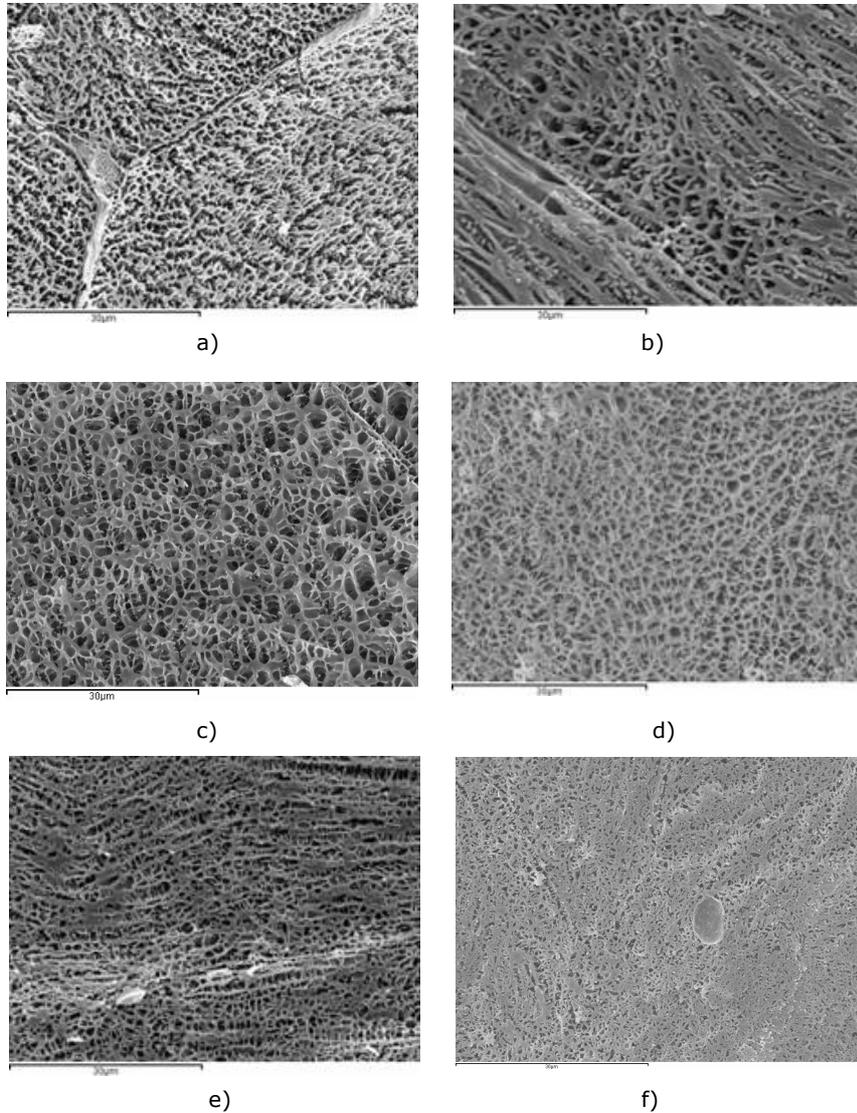


Figura IV.9. Micrografías de Cryo-SEM (x 2000) de: sección transversal del filete de dorada (*Sparus aurata*) (a), pasta de pescado fresca triturada sin nada (b), pasta de pescado fresca triturada con adición de 1% de NaCl (c), pasta de pescado fresca triturada con 0,3% de MTGasa (d), pasta de pescado fresca triturada con 1% de NaCl y embutida durante 24 h en refrigeración

(e) y finalmente pasta de pescado con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa embutida y tras 24 h de refrigeración (f).

5.2. Estudio de la evolución durante el almacenamiento con y sin tratamiento térmico de la formulación base seleccionada

En este estudio, tal y como se describe en el apartado 4.5 de materiales y métodos, se analizaron los cambios en la humedad, el pH, la a_w , la CRA, el color y las propiedades mecánicas durante el almacenamiento en refrigeración de la fórmula base seleccionada (F103), con y sin tratamiento térmico. Por último se realizó el estudio de vida útil microbiológica para la fórmula F103 con y sin tratamiento térmico.

5.2.1. Evolución durante el almacenamiento de la humedad, actividad de agua (a_w) y pH

En la Tabla IV.18. se muestra la evolución de los parámetros de humedad, a_w y pH durante el almacenamiento en refrigeración de la fórmula base con y sin tratamiento térmico. Los valores de humedad y de a_w de las muestras sin tratamiento térmico, tal y como se puede observar, experimentaron un ligero pero significativo ($p \leq 0,05$) descenso durante el almacenamiento, haciéndose más evidentes dichas diferencias al cuarto día de almacenamiento.

Tabla IV.18. Evolución de los parámetros de humedad, a_w y pH durante el almacenamiento de la fórmula base (F103). Valores promedio (SD).

	t (días)	% Humedad	a_w	pH
Sin tratamiento térmico	0	74,7 (0,9) ^(a)	0,986 (0,000) ^(a)	6,08 (0,03) ^(a)
	4	70,3 (0,4) ^(c)	0,983 (0,003) ^(bc)	6,2 (0,0) ^(c)
	6	73,5 (0,2) ^(b)	0,985 (0,002) ^(ab)	6,2 (0,01) ^(c)
	13	72,8 (0,1) ^(bc)	0,981 (0,001) ^(c)	6,0 (0,0) ^(b)
	20	72,7 (0,5) ^(c)	0,981 (0,001) ^(c)	6,10 (0,02) ^(a)
Con tratamiento térmico	0	73,5 (0,6) ^(a)	0,982 (0,004) ^(a)	6,14 (0,03) ^(a)
	4	70,6 (0,14) ^(b)	0,984 (0,002) ^(a)	6,423 (0,006) ^(d)
	7	72,83 (0,09) ^(a)	0,988 (0,000) ^(a)	6,267 (0,006) ^(c)
	15	72,8 (0,6) ^(a)	0,984 (0,001) ^(a)	6,2 (0,0) ^(b)
	27	67,3 (0,3) ^(c)	0,984 (0,005) ^(a)	6,41 (0,02) ^(d)
	56	66,9 (0,7) ^(c)	0,984 (0,001) ^(a)	6,413 (0,006) ^(d)

(a)(b)(c)(d) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) con el factor tiempo de almacenamiento.

El pH, sin embargo, no mostró diferencias significativas al comparar el día 0 y el día 20.

En las muestras tratadas térmicamente el descenso de humedad fue más acusado que en las muestras frescas oscilando entre 73,5(0,6)% a tiempo cero y 66,9(0,7)% transcurridos 56 días de almacenamiento. Dicha pérdida de humedad podría ser debida a la contracción experimentada por las muestras durante el almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, en este caso, la a_w aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) a los 56 días de almacenamiento y este aumento podría ir asociado con un posible deterioro microbiano de la muestra que posteriormente será discutido. Finalmente el pH de las muestras tratadas térmicamente aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) a los 56 días de almacenamiento.

5.2.2. Evolución durante el almacenamiento de la capacidad de retención de agua (CRA)

La Figura IV.10. muestra la evolución durante el almacenamiento de la capacidad de retención de agua de la fórmula base (F103) con y sin tratamiento térmico. Las muestras frescas (Figura IV.10. a) mostraron un ligero aumento de dicho parámetro durante los 13 primeros días de almacenamiento pero sin mostrar diferencias significativas ($p > 0,05$). La tendencia de la CRA a aumentar o a mantenerse constante a lo largo del tiempo según la enzima va actuando parece indicar que la formación de enlaces ϵ -(γ -glutamil) lisina debidos a la acción de la MTGasa influye, aunque moderadamente, sobre la CRA, tal como afirmaron Téllez-Luís et al. (2002), quienes además indicaron que el efecto de la concentración de NaCl en un reestructurado es más determinante que la cantidad de MTGasa añadida sobre la capacidad de retener agua. En este sentido, Han et al. (2009) afirmaron que, como consecuencia de la formación de la red proteica debida a la acción de la MTGasa, las moléculas de agua pierden movilidad quedando más retenidas en dicha red.

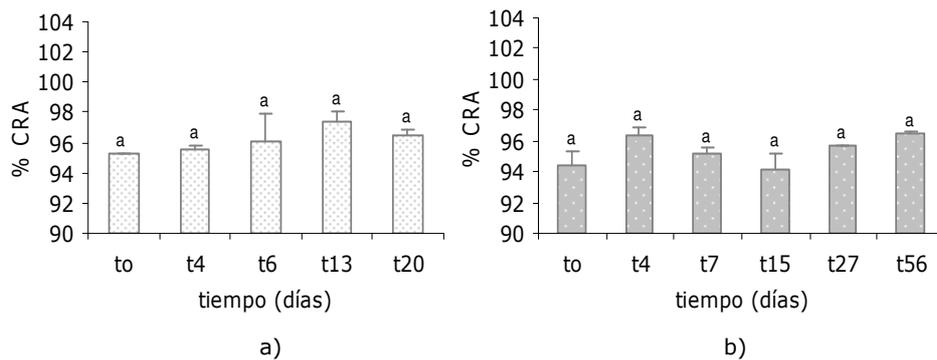


Figura IV.10. Evolución durante el almacenamiento de la capacidad de retención de agua de la fórmula base (F103) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmico (b).

Los valores de CRA para las muestras frescas variaron entre 95,24(0,07)% al inicio del almacenamiento y 96,41(0,44)% transcurridos 20 días de almacenamiento. Los valores de CRA de las muestras tratadas térmicamente (Figura IV.10. b) tampoco se vieron afectadas significativamente ($p > 0,05$) por el tiempo de almacenamiento, mostrando mayores oscilaciones que las muestras frescas. Las muestras tratadas térmicamente mostraron valores de 94,46(0,85)% al inicio del almacenamiento alcanzando valores de 96,50(0,06)% después de 56 días de almacenamiento.

5.2.3. Evolución durante el almacenamiento de las propiedades ópticas

La evolución de las coordenadas CIEL*a*b*, el tono (h_{ab}^*) y el croma (C_{ab}^*) durante el almacenamiento de la fórmula base (F103) se muestra en la Tabla IV.19.

La luminosidad (L^*) de los reestructurados se incrementó ligeramente a lo largo del periodo de conservación en refrigeración siendo significativo ($p \leq 0,05$) a los 20 días de almacenamiento en las muestras frescas. Dados los resultados que se muestran en la Tabla IV.19. cabría suponer que la MTGasa no produce cambios importantes sobre el color durante los periodos de conservación en refrigeración estudiados tanto para las muestras frescas como para las muestras tratadas térmicamente. Efectos similares fueron encontrados por Fagan et al. (2003) en porciones de distintas especies de pescado. Al someter estos reestructurados a tratamiento térmico de 80 °C durante 7 min, tanto la luminosidad como las tonalidades amarillas aumentan ligeramente ($p \leq 0,05$).

Tabla IV.19. Evolución de las coordenadas colorimétricas CIEL*a*b*, el tono (h_{ab}^*) y el croma (C_{ab}^*), durante el almacenamiento de la fórmula base (F103). Valores promedio (SD).

t (días)	L*	a*	b*	h_{ab}^*	C_{ab}^*
0	53,5 (1,7) ^(a)	-2,2 (0,2) ^(ab)	7,4 (1,5) ^(a)	107,4 (4,5) ^(ab)	7,7 (1,4) ^(a)
4	49,4 (0,7) ^(b)	-2,5 (0,3) ^(a)	4,9 (0,4) ^(b)	117,0 (2,3) ^(c)	5,4 (0,4) ^(b)
6	52,9 (0,4) ^(a)	-1,8 (0,1) ^(c)	5,2 (0,5) ^(b)	109,0 (1,4) ^(b)	5,5 (0,5) ^(b)
13	54,8 (1,0) ^(a)	-1,2 (0,2) ^(d)	6,0 (0,4) ^(ab)	101,7 (2,1) ^(a)	6,2 (0,4) ^(b)
20	57,1 (1,3) ^(c)	-2,1 (0,2) ^(bc)	5,5 (1,0) ^(b)	111,1 (4,9) ^(bc)	5,9 (0,9) ^(b)
0	65,0 (1,1) ^(a)	-2,2 (0,2) ^(a)	7,9 (0,8) ^(a)	105,5 (2,0) ^(a)	8,2 (0,7) ^(a)
4	67,2 (0,7) ^(a)	-2,1 (0,1) ^(a)	10,2 (0,1) ^(d)	101,9 (0,9) ^(d)	10,4 (0,1) ^(d)
7	70,2 (2,2) ^(c)	-2,4 (0,2) ^(a)	7,6 (0,6) ^(a)	107,6 (1,9) ^(a)	7,9 (0,5) ^(a)
15	69,9 (0,8) ^(c)	-2,1 (0,1) ^(a)	8,4 (0,4) ^(c)	104,0 (0,1) ^(c)	8,7 (0,3) ^(c)
27	62,6 (0,7) ^(b)	-2,2 (0,1) ^(a)	5,6 (0,3) ^(b)	111,8 (2,0) ^(b)	6,1 (0,3) ^(b)
56	66,7 (1,2) ^(a)	-2,3 (0,2) ^(a)	7,2 (0,2) ^(a)	107,7 (0,9) ^(a)	7,6 (0,2) ^(a)

(a)(b)(c)(d) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) con el factor tiempo de almacenamiento.

5.2.4. Evolución durante el almacenamiento de las propiedades mecánicas

Con el fin de analizar cómo afectó el tiempo de almacenamiento a las propiedades mecánicas del producto, se realizó un ensayo de TPA, tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.6 de materiales y métodos, a cada tiempo de almacenamiento estudiado. El efecto de la incorporación de MTGasa y otros ingredientes, como por ejemplo alginato sódico, sobre las propiedades físico-químicas ha sido estudiada por gran cantidad de autores (Ramírez et al., 2000; Suklim et al., 2004; Vachá et al., 2006; Montero y Pérez-Mateos, 2002). Por lo general todos estos autores coinciden al reseñar que con la incorporación de estos ingredientes se consiguen mejorar las propiedades mecánicas de los reestructurados.

Las propiedades mecánicas, tanto de las muestras frescas como de las muestras tratadas térmicamente, se vieron alteradas debido al tiempo de almacenamiento, tal y como se puede observar en la Figura IV.11. En las muestras frescas, la dureza fue incrementándose de forma lineal y significativa ($p \leq 0,05$) con el tiempo de almacenamiento alcanzando valores de 3494(480) g a los 13 días de almacenamiento y llegando hasta valores de 3638(181) g a los 20 días. Este incremento lineal de los valores de dureza en las muestras frescas podría ser debido por una parte a la actividad residual de la MTGasa y por otra a la capacidad de la transglutaminasa endógena de gelificar la proteína miofibrilar, parcialmente solubilizada a temperaturas inferiores a 40 °C, como consecuencia de la incorporación de sal (Benjakul y Visessanguan, 2003). Además debe tenerse en cuenta que, durante el periodo de conservación en refrigeración, se van a establecer enlaces de hidrógeno que van a ser en parte responsables de ese aumento en la firmeza del reestructurado en crudo (Kim et al., 2004). En la

Figura IV.11 a) puede observarse que, durante los primeros 13 días del periodo de conservación en refrigeración, las muestras frescas disminuyeron su adhesividad hasta alcanzar valores próximos a cero (-3,471 g·s) mientras que la cohesividad, la gomosidad y la elasticidad se incrementaron de forma significativa ($p \leq 0,05$). El aumento de la firmeza durante el almacenamiento en refrigeración cuando se incorpora MTGasa también ha sido descrito en músculo de ternera (Cofrades et al., 2006). Como consecuencia de la aplicación de un tratamiento térmico a 80 °C se observa que la firmeza de las muestras aumenta (Figura IV.11. b) debido principalmente al establecimiento de enlaces covalentes entre las proteínas (Sakamoto et al., 1994). El efecto del calor sobre dichas proteínas es el responsable de los cambios en textura de los productos cocinados como consecuencia de la desnaturalización proteica, disociación de las proteínas miofibrilares, agregación proteica y la formación de enlaces de tipo hidrofóbico (Tornberg, 2005; Kong et al., 2008). Además de la formación de enlaces, con el calor, las proteínas se desnaturalizan y se agregan debido a la destrucción de membranas celulares (Rowe, 1989) de tal forma que todo el sistema se desorganiza. Las muestras tratadas térmicamente mostraron un comportamiento, en cuanto a los parámetros de textura, más variable a lo largo del almacenamiento. La dureza de las muestras se incrementó de forma significativa a los 56 días de almacenamiento, lo cual puede ser también debido al establecimiento de enlaces hidrofóbicos (Tornberg, 2005). La adhesividad disminuyó mientras que la gomosidad y la elasticidad aumentaron significativamente ($p \leq 0,05$) a los 56 días de almacenamiento.

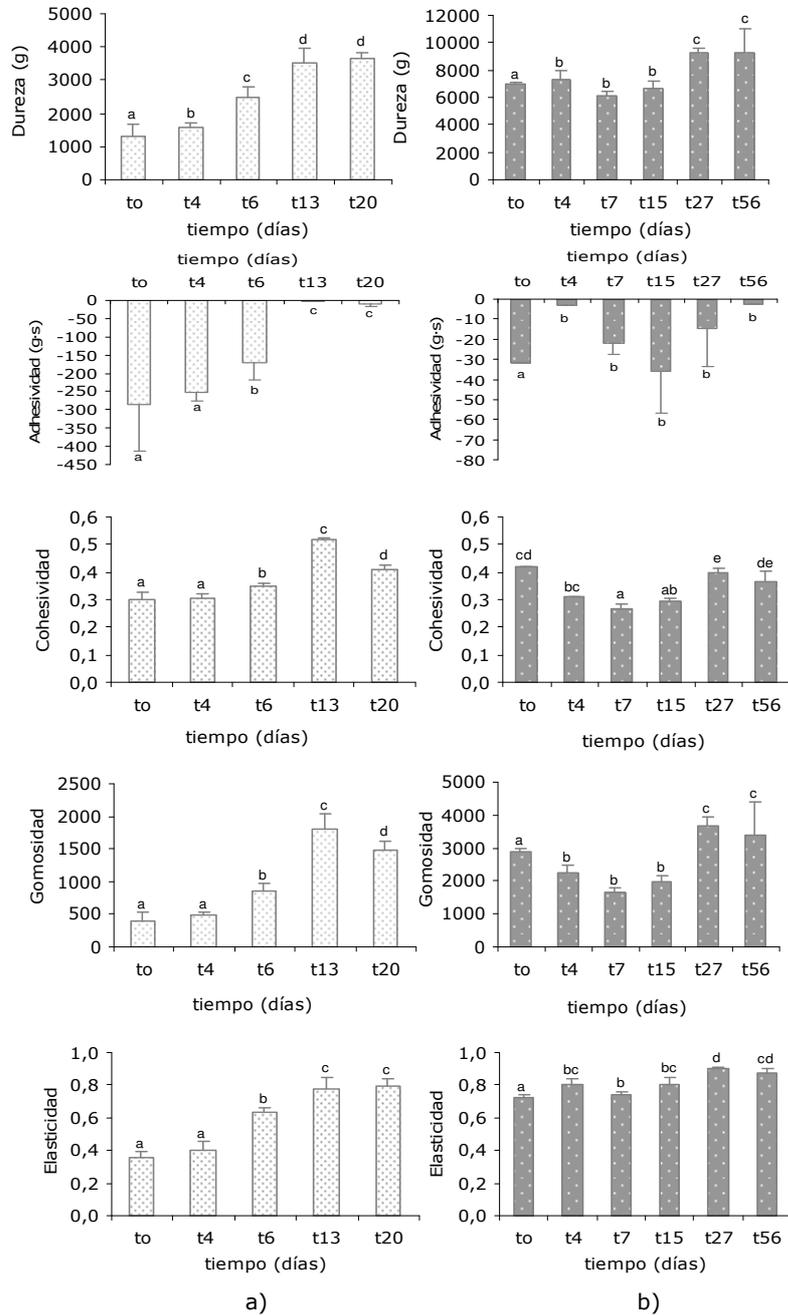


Figura IV.11. Evolución de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con

el ensayo de TPA durante el almacenamiento de la fórmula base (F103) sin tratamiento térmico (a) y muestras tratadas térmicamente (b).

Tras analizar los resultados correspondientes a los parámetros texturales se puede apreciar que para las muestras sin tratamiento térmico el almacenamiento supone básicamente un aumento de su dureza, gomosidad y pérdida de adhesividad, mientras que para las muestras con tratamiento térmico la evolución de estos parámetros resulta similar aunque se muestra con cierta variabilidad.

5.2.5. Estudio microbiológico

En este apartado se muestran los resultados de los análisis microbiológicos de la fórmula base (F103) tomada como referencia y que corresponde a la fórmula con un 1% de sal y 0,3% de transglutaminasa con el fin de establecer la vida útil del producto.

5.2.5.1. Evolución de la calidad microbiológica de la fórmula base (F103) sin tratamiento térmico durante el almacenamiento en refrigeración

Para conocer la calidad microbiológica del producto envasado a vacío durante 20 días de almacenamiento a 4 °C, se realizaron recuentos totales de aerobios mesófilos, enterobacterias, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* tal y como se describe en el apartado 4.4. de materiales y métodos.

En ninguna de las muestras analizadas se aislaron colonias de *Salmonella* ni de *Staphylococcus aureus* durante todo el estudio de almacenamiento. Para productos de la pesca frescos, la legislación española (MSC, 1991) establece que debe haber ausencia de *Salmonella*, por lo que, respecto a este microorganismo, las

muestras analizadas cumplían los requisitos legales durante todo el periodo de almacenamiento estudiado.

En la Figura IV.12. se muestra la evolución de los microorganismos mesófilos y enterobacterias en el producto reestructurado durante los 20 días de almacenamiento en refrigeración, así como los límites establecidos por la legislación española en productos de la pesca frescos para ambos microorganismos.

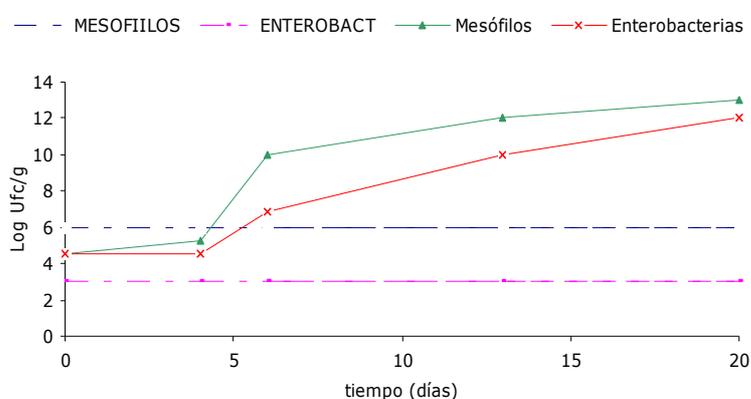


Figura IV.12. Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos y enterobacterias durante el almacenamiento de la fórmula base (F103) sin tratamiento térmico. Las líneas punteadas hacen referencia al valor marcado por la legislación española para cada microorganismo.

La legislación española (MSC, 1991), tal y como se ha expuesto en la Tabla IV.1. del apartado 4.4. de materiales y métodos, establece para productos de la pesca cocidos un límite máximo de 10^5 ufc/g para el caso de aerobios mesófilos, 10^3 ufc/g para enterobacterias, 10^2 ufc/g para *Staphylococcus aureus* y ausencia de *Salmonella*.

Tal y como se puede observar en la Figura IV.12., el recuento de microorganismos mesófilos sobrepasó el límite establecido por la legislación a los 7 días de almacenamiento mientras que el recuento de enterobacterias se mostró superior al límite establecido en la legislación el primer día de formulación debido, probablemente, a la contaminación producida durante la manipulación y formulación del producto, haciendo que el producto en fresco (sin tratamiento térmico) no sea viable comercialmente desde el punto de vista microbiológico. Sería conveniente realizar la manipulación y formulado del producto en condiciones de asepsia para rebajar la carga inicial.

5.2.5.2. Evolución de la calidad microbiológica de la fórmula base (F103) con tratamiento térmico durante el almacenamiento en refrigeración

Del mismo modo que se vio en el apartado anterior (5.2.5.1.), se llevó a cabo un estudio microbiológico de las muestras tratadas térmicamente. Las muestras fueron formuladas y, tras un periodo de 24 horas en refrigeración para obtener el producto reestructurado, se sometieron a tratamiento térmico a 80 °C durante 7 minutos. Posteriormente se envasaron a vacío y se almacenaron durante 56 días en refrigeración a 4 °C hasta el momento de los análisis. Se estudiaron los recuentos totales de aerobios mesófilos, enterobacterias, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.4. de materiales y métodos.

La Figura IV.13. muestra los recuentos totales de aerobios mesófilos y se puede observar como a los 7 días de almacenamiento comenzaron a aparecer colonias de aerobios mesófilos que no sobrepasaron los límites establecidos por la

legislación (10^5 ufc/g) hasta los 28 días de almacenamiento. Las muestras presentaron ausencia de enterobacterias, *St. aureus* y *Salmonella* durante todo el periodo de almacenamiento cumpliendo con los límites marcados por la legislación para dichos microorganismos.

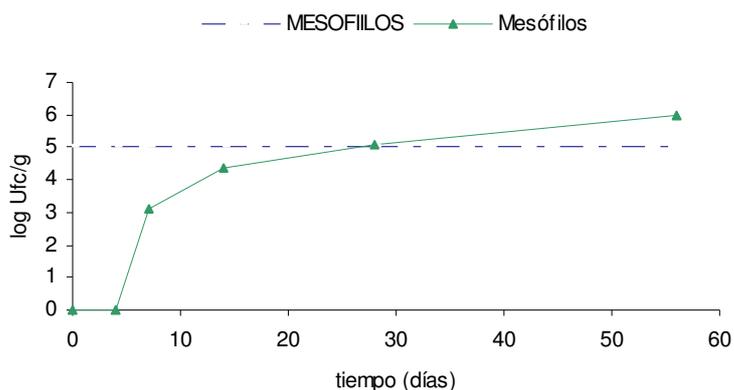


Figura IV.13. Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos durante el almacenamiento de la fórmula base (F103) con tratamiento térmico. La línea punteada hace referencia al valor marcado por la legislación española para aerobios mesófilos.

Por lo tanto, se puede decir que la formulación base (F103) podría ser viable desde el punto de vista microbiológico durante un periodo de 27 días, siendo los microorganismos aerobios mesófilos los limitantes de la vida útil del producto. En este punto, cabe recordar que el producto es formulado con sal (NaCl) como único agente conservante, así que se podría estudiar la incorporación de otros agentes conservantes para prolongar la vida útil del producto con tratamiento térmico.

5.3. Obtención de reestructurados de dorada (*Sparus aurata*) con adición de fibra (KGM, CMC y goma xantana)

Los productos reestructurados, tal y como se puede observar en los resultados obtenidos en el apartado 5.1 y 5.2 del presente capítulo, son una alternativa real y viable al consumo de pescado en fresco o congelado. Una de las mayores ventajas que nos ofrece reestructurar músculo de pescado es la posibilidad de modificar la composición del producto inicial añadiendo nuevos ingredientes o aditivos que nos van a dar como resultado un producto final con unas características y propiedades diferentes al producto de partida. En este sentido, la adición de fibra se presenta como una alternativa muy interesante no solo desde el punto de vista tecnológico y nutricional sino como una herramienta apropiada desde el punto de vista del marketing. Hay dos maneras de introducir la fibra en los productos de la pesca, una es inyectando una dispersión de fibra en el interior del filete y la otra, que es la manera más efectiva, es introduciendo la fibra en la formulación del producto reestructurado de pescado (Sánchez-Alonso et al., 2007). Desde un punto de vista tecnológico, la fibra alimentaria mejora la capacidad de retención de agua, mejora el poder de gelificación, reduce la pérdida de rendimiento después del cocinado y mantiene la forma del producto después del cocinado (Ang y Crosby, 2005). En este apartado se va a tratar de evaluar el efecto que tiene la incorporación de diferentes fibras (konjac glucomanano, carboximetilcelulosa y xantana) en las propiedades físico-químicas, ópticas, mecánicas, capacidad de retención de agua, aceptación y vida útil del producto final.

5.3.1. Adición de Konjac Glucomanano (KGM) y Carboximetilcelulosa (CMC)

El Konjac glucomanano (KGM), tal y como se ha explicado en la introducción y en el apartado 4.1.2. de materiales y métodos del presente capítulo, es una fibra dietética soluble en agua, se obtiene de los tubérculos de la planta originaria del este asiático *Amorphophallus konjac*, la cual pertenece a la familia Araceae. La estructura química del glucomanano incluye D-manosa y D-glucosa (en una proporción 8:5, respectivamente), unidas por enlace β (1 \rightarrow 4). Esta fibra se caracteriza por una excepcional capacidad de captar agua, según indican Maekaji (1974) y Kishida et al. (1978), proporcionando una elevada viscosidad a las soluciones que forma (González, 2004). Existen estudios realizados sobre la aplicación de konjac para mejorar la calidad de salchichas tipo frankfurt bajas en calorías (Lin y Huang, 2003), mejorar las propiedades texturales y la capacidad de retención de agua de geles hechos con carne de cerdo (Chin et al., 2009) y otras aplicaciones.

La carboximetilcelulosa (CMC) es un derivado aniónico de la celulosa y difiere de ésta por su solubilidad en agua la cual determina algunas de sus propiedades físicas como la viscosidad, la capacidad de absorción y su capacidad como agente "ligante" (Emerton y Choi, 2008; Jianu et al., 2008). El CMC se ha empleado como sustituto del almidón y otros aditivos, como los fosfatos, carbonatos o citratos, en carnes procesadas y también como modificador de textura en formulaciones de surimi (Zdzislaw, 1994).

Tanto el KGM como el CMC son fibras blancas, no aportan sabor ni olor y prácticamente no aportan calorías al producto final, por tanto se consideran muy apropiadas para introducirlas en productos elaborados a base de pescado blanco.

En el presente apartado se analiza el efecto de la adición de KGM y CMC en las propiedades físico-químicas, capacidad de retención de agua, propiedades ópticas y mecánicas de reestructurados de dorada (*Sparus aurata*) obtenidos con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa. En la Tabla IV.20. se pueden observar las diferentes formulaciones analizadas.

Tabla IV. 20. Formulaciones estudiadas con konjac glucomanano y carboximetilcelulosa.

Formulación	Dorada (<i>Sparus aurata</i>) %	Agua %	Sal %	MTGasa %	Konjac %	CMC %
Control	88,7	10	1	0,3	0	0
F1	88,2	10	1	0,3	0,5	0
F2	87,7	10	1	0,3	1	0
F3	87,7	10	1	0,3	0	1

5.3.1.1. Humedad, actividad de agua y pH

En la Tabla IV.21. se muestran los valores de humedad, a_w y pH obtenidos para las diferentes formulaciones estudiadas. El contenido final de humedad, en las muestras sin tratamiento térmico, solo se vio significativamente ($p \leq 0,05$) afectado por la presencia de 1% de KGM (F2) produciendo una disminución del 1% respecto a la muestra control. La a_w y el pH también se vieron modificados por la adición de fibras siendo la formulación con 1% de KGM (F2) la que mostró el valor más bajo de a_w y un ligero descenso en los valores de pH que en ambos casos fueron significativos comparados con la muestra control.

Las muestras tratadas térmicamente también mostraron comportamientos diferentes debido a la presencia de fibras (Tabla IV.21). En este caso, la formulación con un contenido más bajo de humedad fue la que contenía 0,5% de KGM (F1), la a_w fue

significativamente menor respecto a la muestra control para todos los casos y el pH fue ligeramente menor.

La presencia de fibras en la matriz proteica del gel de pescado formado con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa modifica las propiedades físico-químicas comentadas en este apartado. Concretamente, para las muestras sin tratamiento térmico la adición de 1% de KGM produjo un descenso significativo ($p \leq 0,05$) de los valores de humedad, a_w y pH respecto la muestra control mostrando los valores más bajos para los tres parámetros.

Tabla IV.21. Valores de humedad, a_w y pH obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y carboximetilcelulosa así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).

	Control				
	F1	F2	F3		
Sin tratamiento térmico	%Humedad	73,7 (0,2) ^(b)	73,8 (0,2) ^(b)	72,7 (0,1) ^(a)	73,5 (0,3) ^(b)
	a_w	0,981 (0,002) ^(a)	0,982 (0,002) ^(a)	0,975 (0,003) ^(b)	0,985 (0,002) ^(c)
	pH	6,247 (0,006) ^(a)	6,257 (0,006) ^(b)	6,2 (0,0) ^(b)	6,173 (0,006) ^(c)
Con tratamiento térmico	%Humedad	70,9 (0,1) ^(a)	70,6 (0,2) ^(b)	71,0 (0,1) ^(a)	70,94 (0,08) ^(a)
	a_w	0,984 (0,001) ^(a)	0,982 (0,002) ^(b)	0,982 (0,002) ^(b)	0,982 (0,002) ^(b)
	pH	6,3 (0,0) ^(a)	6,237 (0,006) ^(c)	6,3 (0,0) ^(b)	6,2 (0,0) ^(c)

(a)(b)(c) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) utilizando como factor la formulación.

5.3.1.2. Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Como se ha comentado anteriormente, el konjac glucomanano (KGM) es un polisacárido de alto peso molecular, soluble en agua y no-iónico (Li et al., 2006; Pang, 2003). De modo que, el KGM puede ser utilizado como aditivo en diversos tipos de alimentos debido a su gran capacidad de absorción, su habilidad para formar geles, su estabilidad, sus propiedades espesantes o de formar films (Dave et al., 1998; Pang, 2003; Zhang et al., 2005). El konjac ha sido introducido en surimi (Alaska Pollock y Pacific Whiting) para investigar la habilidad de dicho compuesto frente a las propiedades de fractura de los geles de surimi a diferentes temperaturas (5, 25, 55, ó 75 °C) (Park, 1996). La carboximetilcelulosa (CMC), sin embargo, es una molécula aniónica y bastante soluble en agua. La estructura de cualquier gel, de acuerdo con Ross-Murphy (1995), consiste en una red formada por cadenas de macromoléculas de gran tamaño, con cadenas laterales y con infinitos puntos de unión como consecuencia del balance entre las interacciones de los diferentes componentes. Los puntos de unión entre cadenas pueden variar entre las pequeñas regiones de contacto y las grandes regiones entre algunas cadenas dependiendo de la estructura química del polímero. En el caso de los geles de músculo de pescado también dependerá de la calidad funcional de la proteína miofibrilar, los aditivos empleados, las condiciones de procesado, así como de otros factores inherentes al medio como la fuerza iónica, el pH, etc. Por otra parte, la sal incrementa la solubilidad de las proteínas miofibrilares durante el homogeneizado y esto trae consigo la subsecuente formación de fuertes uniones entre cadenas de miosina en la pasta de pescado (Niwa et al., 1986; Wan et al., 1992). La relación proteína-hidrocoloide puede ser de distinta naturaleza. Pueden darse pequeñas interacciones

entre las proteínas y los hidrocoloides no-iónicos (Ambjerg-Pedersen y Jørgensen, 1991; Bernal et al., 1987; Imeson et al., 1977) y además se producen interacciones de naturaleza electroestática entre los grupos cargados positivamente de la proteína y los grupos aniónicos del hidrocoloide. En sistemas heterogéneos como el músculo de pescado, dichas interacciones dependerán del tipo de aminoácidos e hidrocoloides presentes, del pH del medio y de la presencia de otros componentes como las sales. Otro aspecto a tener presente es que aunque el contenido de agua en el producto sea alto, ésta está muy unida a la proteína miofibrilar y por tanto la disponibilidad para hidratar el hidrocoloide es baja. Todo lo comentado va a influir en diversas propiedades del producto reestructurado como la capacidad de retención de agua que dependerá de la estructura del gel que se forme. En la Figura IV.14. se pueden observar los resultados obtenidos para la capacidad de retención de agua en función de la formulación estudiada para las muestras frescas y las muestras tratadas térmicamente.

El mayor valor de CRA se obtuvo para las muestras con 1% de KGM (F2) mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a la muestra control, tanto en las muestras frescas como tratadas térmicamente. A mayor cantidad de KGM añadido, mayor fue el incremento en dicho parámetro mostrando diferencias significativas entre ambos niveles (F1 y F2) tanto en fresco como con tratamiento térmico.

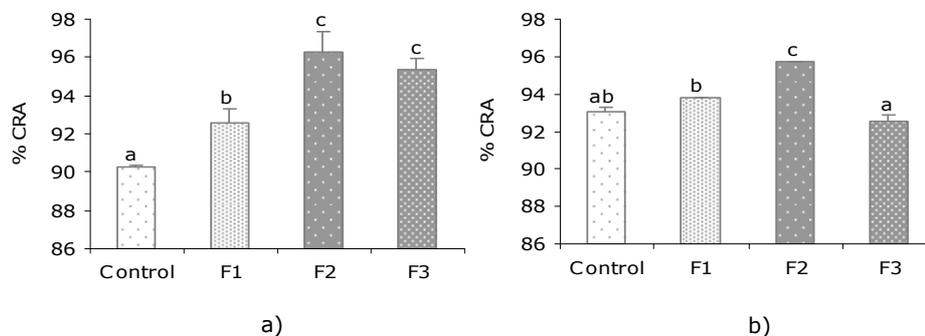


Figura IV.14. Valores de capacidad de retención de agua (CRA) obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y carboximetilcelulosa empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).

La adición de CMC produjo también un aumento significativo de dicho parámetro en las muestras frescas pero menor que el obtenido con F2. Esto podría ser debido a la gran capacidad de absorber agua que presenta el konjac glucomanano. Altos niveles de KGM (F2) pueden mejorar significativamente ($p \leq 0,05$) la capacidad de retención de agua de los productos reestructurados de pescado, comparado con la muestra control y el CMC. En las muestras tratadas térmicamente, la adición de CMC produjo un ligero descenso de la capacidad de retención de agua respecto a la muestra control y las muestras con KGM. Barbut y Mittal (1996) en sus estudios obtuvieron el mismo resultado para salchichas de frankfurt y dichos autores sugieren la posibilidad de que este hecho se deba a que el CMC envuelva en mayor o menor medida a la proteína miofibrilar impidiéndole la retención de agua.

En resumen se puede concluir que la adición de hidrocoloides (KGM y CMC) incrementó la capacidad de retención de agua para las muestras frescas en todos los casos y en las muestras tratadas

térmicamente excepto para el caso del CMC. La formulación que presentó un mayor porcentaje de CRA tanto en las muestras frescas como tratadas térmicamente fue la F2.

5.3.1.3. Propiedades ópticas

La adición de diferentes niveles de KGM afectó a los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) tal y como se puede observar en la Tabla IV.22. A mayor nivel de KGM (F2), mayores valores de L^* y de b^* y menores de a^* se obtuvieron para las muestras frescas. Por otra parte, la adición de CMC también produjo variaciones en el color de las muestras con respecto al control, mostrando mayores valores de L^* , a^* y b^* , siendo significativas dichas diferencias ($p \leq 0,05$) en el caso de L^* y b^* .

Tabla IV.22. Coordenadas de color CIEL*a*b*, tono (h_{ab}^*) y croma (C_{ab}^*) de las diferentes formulaciones estudiadas en función del nivel de konjac glucomanano y carboximetilcelulosa, así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).

		Control	F1	F2	F3
Sin tratamiento térmico	L^*	50,8 (0,6) ^(a)	52,7 (0,4) ^(b)	52,6 (0,5) ^(b)	52,7 (0,4) ^(b)
	a^*	-2,2 (0,1) ^(a)	-2,2 (0,1) ^(a)	-1,9 (0,2) ^(b)	-2,27 (0,07) ^(a)
	b^*	5,4 (0,5) ^(a)	7,4 (0,4) ^(b)	9,4 (0,3) ^(c)	8,9 (0,3) ^(d)
	h_{ab}^*	112,1 (2,4) ^(a)	106,2 (0,5) ^(b)	101,1 (0,8) ^(c)	104,4 (0,5) ^(b)
	C_{ab}^*	5,8 (0,5) ^(a)	7,7 (0,4) ^(b)	9,6 (0,4) ^(c)	9,2 (0,2) ^(d)
Con tratamiento térmico	L^*	67,1 (0,9) ^(a)	66,1 (1,1) ^(ab)	64,8 (1,1) ^(bc)	67,5 (0,7) ^(c)
	a^*	-2,9 (0,1) ^(a)	-2,7 (0,1) ^(ab)	-2,6 (0,1) ^(bc)	-2,29 (0,07) ^(c)
	b^*	8,6 (0,5) ^(a)	9,4 (0,7) ^(b)	8,6 (0,3) ^(a)	10,0 (0,1) ^(c)
	h_{ab}^*	108,4 (1,7) ^(a)	106,0 (1,2) ^(b)	106,6 (1,1) ^(b)	102,9 (0,5) ^(c)
	C_{ab}^*	9,1 (0,5) ^(a)	9,8 (0,6) ^(b)	8,9 (0,3) ^(a)	10,2 (0,1) ^(b)

(a)(b)(c)(d) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) utilizando como factor la formulación.

En las muestras frescas, un aumento en la cantidad de KGM adicionada a la formulación, así como la adición de 1% de CMC (F3) se tradujo en un aumento de los valores de "blancura" de las muestras. En las muestras tratadas térmicamente, a mayor cantidad de KGM adicionada (F2) se obtuvieron menores valores de L^* , a^* y de b^* . El CMC, sin embargo, mantuvo valores similares de las coordenadas de color a los obtenidos para la muestra control, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la luminosidad (L^*) y b^* .

5.3.1.4. Propiedades mecánicas

En la Figura IV.15. se muestra la variación en los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con el ensayo de TPA (apartado 4.2.6. de materiales y métodos del presente capítulo) para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano (KGM) y de carboximetilcelulosa (CMC) empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b). La adición de KGM y CMC produjo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los parámetros mecánicos tanto en las muestras frescas como en las muestras tratadas térmicamente, sin embargo los efectos producidos fueron diferentes para el KGM y el CMC. En las muestras frescas (Figura IV.15. a), la presencia de KGM produjo un aumento en la dureza del gel que fue significativa ($p \leq 0,05$) para el 1% de KGM (F2). A mayor cantidad de KGM adicionada, mayor dureza del gel aunque en este caso las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). Sin embargo, la presencia de CMC produjo un descenso significativo en la dureza del gel con respecto a la muestra control y respecto a las formulaciones F1 y F2. En cuanto al parámetro adhesividad, se puede decir que aumenta en todos los casos (F1, F2 y F3) de forma

significativa ($p \leq 0,05$) con respecto a la muestra control, no obstante, en el caso del CMC este aumento se produce en menor medida ($p \leq 0,05$) que con la adición de 1% de KGM (F2). Los parámetros gomosidad, cohesividad y elasticidad aumentan también de manera lineal y significativa y se puede observar en la Figura IV.15. que a mayor cantidad de KGM adicionado a la formulación se obtienen geles más gomosos, más cohesivos y más elásticos. El CMC produjo incrementos significativos en estos parámetros pero menores que con la adición de 1% de KGM. En las muestras tratadas térmicamente se puede observar en la Figura IV.15.b) que el efecto es exactamente el contrario al observado para las muestras frescas. En este caso, la adición de hidrocoloides junto con el tratamiento térmico produjo un descenso significativo en los valores de dureza de forma que, a mayor cantidad de KGM adicionado el descenso fue más acusado, obteniéndose valores similares de dureza para el CMC (F3) y el 1% de KGM (F2). La adhesividad de las muestras tratadas térmicamente se mantuvo constante excepto para la formulación F2, en la que se obtuvieron mayores valores que para el resto de formulaciones. En cuanto a la gomosidad, la cohesividad y la elasticidad, al igual que para la dureza, se observa el efecto contrario que en las muestras frescas y la adición de hidrocoloides produjo un descenso significativo en estos parámetros. Sin embargo, en este caso la formulación F3 dio muestras más gomosas, más cohesivas y más elásticas que la fórmula con el mismo porcentaje de KGM (F2).

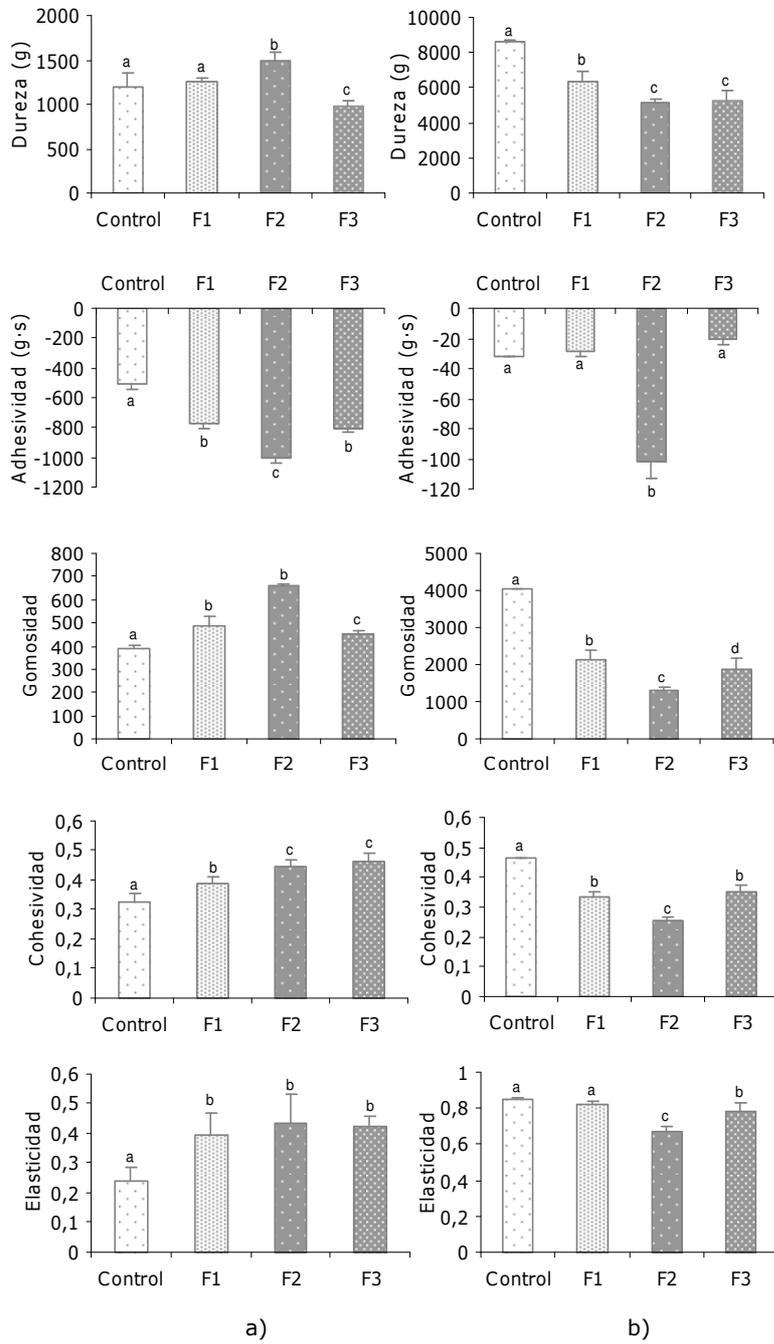


Figura IV.15. Valores de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con

el ensayo de TPA para las diferentes formulaciones en función del nivel konjac glucomanano (KGM) y de carboximetilcelulosa (CMC) empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).

Los resultados obtenidos están en la línea de los mostrados por Yoo y Lee (1993) que en sus estudios afirman que las propiedades reológicas dependen del tipo y de la concentración de hidrocoloides adicionados a la formulación. Estos aditivos alteran las características gelificantes del producto de diferentes maneras dependiendo de la calidad de la proteína miofibrilar entre otros factores (Gómez-Guillén y Montero, 1996; Foeding y Ramsey, 1987). Numerosos estudios han analizado la interacción de diferentes hidrocoloides con las proteínas en sistemas modelo (Tolstoguzov, 1986; De Freitas et al., 1997a), pero solo unos pocos estudios han sido publicados sobre el efecto de los hidrocoloides dentro del miosistema y referidos al uso de pocos hidrocoloides como el almidón, los carragenatos y alginatos (Gómez-Guillén y Montero, 1996; De Freitas et al., 1997a) y apenas existe bibliografía sobre la adición de carboximetilcelulosa o goma xantana en productos reestructurados de pescado o surimi. Estos aditivos no tienen capacidad gelificante por sí mismos, pero a bajas concentraciones pueden reforzar las áreas débiles de la red proteica y a altas concentraciones, por otra parte, pueden llegar a interferir en la red formada por la proteína miofibrilar produciendo geles frágiles (Lee et al., 1992). Es muy importante recordar y tener presente que los hidrocoloides y la proteína miofibrilar compiten por el agua disponible hasta el punto de que pueden llegar incluso a impedir la formación adecuada del gel (Dexter et al., 1993). En el caso de la carboximetilcelulosa sódica en surimi de

caballa (*Theragra chalcogramma*), Niwa et al. (1992) atribuyen a la presencia de CMC que con porcentajes altos de hidrocoloide (0-6%) se retiene mayor cantidad de agua produciendo geles más deformables. Pérez-Mateos y Montero (2000) en sus estudios realizados con diferentes gelificantes en reestructurados de músculo de bacaladilla tratados térmicamente, muestran un descenso significativo en la dureza del gel conforme incrementaban la concentración de hidrocoloide adicionada a la formulación particularmente para el caso de la carboximetilcelulosa sódica y de la goma xantana. La razón de este descenso podría atribuirse a que ambos hidroclóides posiblemente provoquen la desestabilización de la red proteica o a que el gel sea más blando debido a una menor concentración proteica. La pérdida de cohesividad de las muestras tratadas térmicamente podría ser debida fundamentalmente a la presencia de hidrocoloide más que a la pérdida de concentración proteica debido a la adición de éstos.

Los resultados muestran que el KGM afecta a las propiedades texturales de los productos reestructurados incrementando la capacidad de gelificación y mejorando la capacidad de retención de agua. Guangquan Xiong et al. (2009) sugieren en sus estudios que la adición de KGM mejora las propiedades de los geles de surimi, sin embargo reportan que más del 2% de KGM podría causar un endurecimiento muy elevado de los geles debido a la elevada higroscopicidad del KGM y una reducción significativa de la blancura del gel y concluyen que la cantidad de KGM óptima es el 1%. El 1% de KGM mejora las propiedades de los productos reestructurados de dorada elaborados con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa aumentando la CRA y disminuyendo la a_w y mostrando productos con una apariencia y textura adecuada. Por este motivo,

se decidió optar por la formulación F2 (1% de KGM) a la que se le adicionó goma xantana.

5.3.1.5. Análisis factorial de las muestras formuladas con adición de fibra

Para intentar comprender mejor las relaciones entre los parámetros analizados se realizó un análisis factorial de los datos experimentales.

5.3.1.5.1. Análisis factorial de las muestras con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa con KGM y CMC sin tratamiento térmico

El análisis factorial llevado a cabo es capaz de explicar el 90,867% de la variabilidad mostrada por los datos (Tabla IV.23.) mediante dos factores. El primer factor explica el 62,689% de la variabilidad y recoge las variables: cohesividad, elasticidad, CRA y adhesividad mientras que el factor 2 explica el 28,178% de la variabilidad y recoge las variables: dureza, a_w , gomosidad y humedad, tal y como se observa en la Tabla IV.24.

Tabla IV.23. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.

Factor	%Explicado	%Acumulado
1	62,689	62,689
2	28,178	90,867

Tabla IV.24. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.

	Factor 1	Factor 2
Cohesividad	0,974	
Elasticidad	0,919	
CRA	0,911	
Adhesividad	-0,87	
Dureza		-0,96
a_w		-0,96
Gomosidad		-0,76
Humedad		0,708

La Figura IV.16. muestra como tanto la presencia de hidrocoloide como el tipo de hidrocoloide adicionado a la formulación afecta de manera significativa a las propiedades de la matriz proteica.

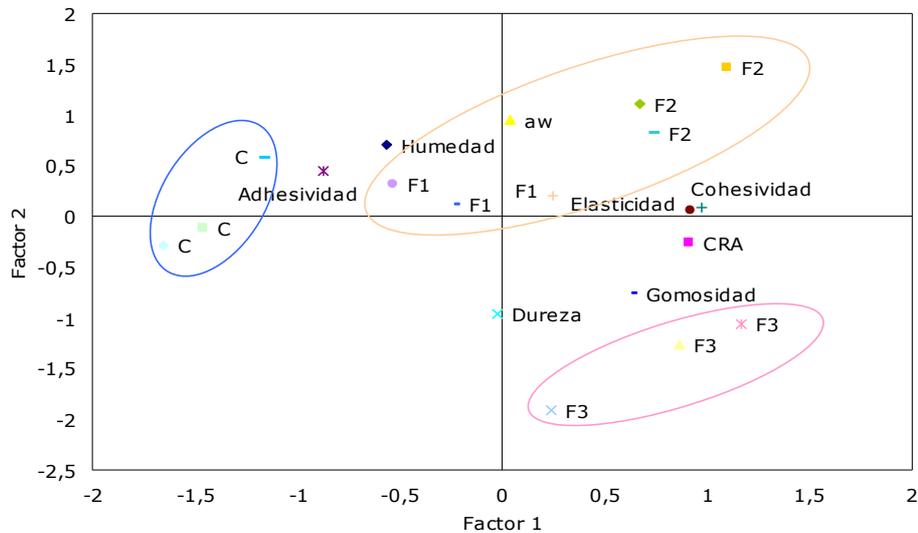


Figura IV.16. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas sin tratamiento térmico.

La presencia de fibra afecta en mayor medida a las propiedades de cohesividad, elasticidad, CRA y adhesividad, mientras que el tipo de fibra adicionada afecta más a las propiedades de dureza, a_w , gomosidad y humedad.

5.3.1.5.2. Análisis factorial de las muestras con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa con KGM y CMC con tratamiento térmico

El análisis factorial llevado a cabo puso de manifiesto, al igual que para las muestras sin tratamiento térmico, que tanto la presencia de hidrocoloide como el tipo de hidrocoloide adicionado condicionan las propiedades finales del gel proteico. En este caso el análisis factorial es capaz de explicar el 91,399% de la variabilidad experimentada por los datos (Tabla IV.25.) mediante dos factores (Tabla IV.26.). La presencia de hidrocoloide en las muestras tratadas térmicamente afecta a la cohesividad, elasticidad, CRA y adhesividad de la matriz proteica, mientras que el tipo de fibra afecta en mayor medida a la dureza, a_w , gomosidad y humedad de la muestra (Figura IV.17.).

Tabla IV.25. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.

Factor	%Explicado	%Acumulado
1	71,352	71,352
2	20,047	91,399

Tabla IV.26. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.

	Factor 1	Factor 2
Cohesividad	0,974	
Elasticidad	0,919	
CRA	0,911	
Adhesividad	-0,87	
Dureza		-0,96
a_w		0,947
Gomosidad		-0,76
Humedad		0,708

Tal y como se puede observar en la Figura IV.17. las muestras con KGM y con CMC mostraron una mayor capacidad de retención de agua y una menor dureza y elasticidad que la fórmula base debido, como se ha comentado anteriormente, al tipo de gel que se forma con el tratamiento térmico y a la presencia de hidrocoloide en la matriz que forman redes más estructuradas y compactas.

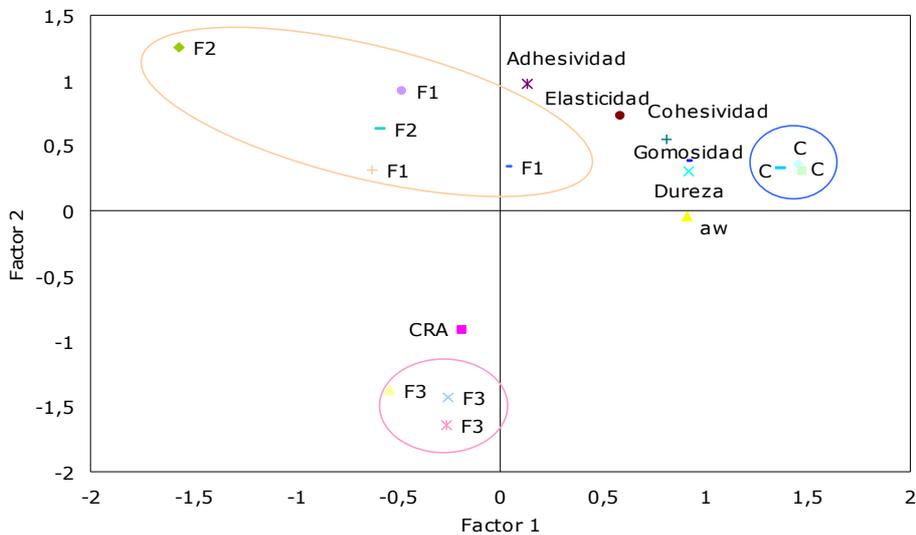


Figura IV.17. Análisis Factorial. Representación, en el plano factorial, de las variables estudiadas y las muestras evaluadas con tratamiento térmico.

5.3.1.6. Análisis estructural

La observación de la microestructura y los cambios producidos en ésta ofrece información relacionada directamente con los parámetros de textura (Stanley y Tung, 1976; Sato y Tsuchiya, 1992) y sobre la interacción entre los diferentes ingredientes. De esta forma los geles de elevada elasticidad tienen una microestructura uniforme con predominio de regiones densas. Por el contrario, en geles poco elásticos y de baja resistencia de gel se observan gran número de oquedades de tamaños diversos que transmiten una imagen de conjunto poco homogénea (Sato y Tsuchiya, 1992).

5.3.1.6.1. Análisis estructural de muestras sin tratamiento térmico

En la Figura IV.18. se pueden observar las micrografías correspondientes a las formulaciones estudiadas en el presente capítulo. Cabe recordar que todas las formulaciones están elaboradas con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa y el componente que difiere es el hidrocoloide adicionado a la formulación (en este caso, KGM o CMC).

Las propiedades estructurales de la matriz del gel y el tipo de interacciones intermoleculares, como se ha ido comentado a lo largo de la discusión de los datos, dependen de muchos factores como las condiciones de procesado o los ingredientes adicionados a dicha matriz y determinan tanto propiedades funcionales como la textura final del gel proteico. Las características de la red proteica varían de acuerdo con el grado de desnaturalización y de agregación de las proteínas. Un rápido desdoblamiento de las proteínas seguido de una lenta agregación favorece la formación de redes con un entramado muy estructurado, mientras que cuando

dicha agregación se produce rápidamente, la matriz del gel tiende a ser desordenada.

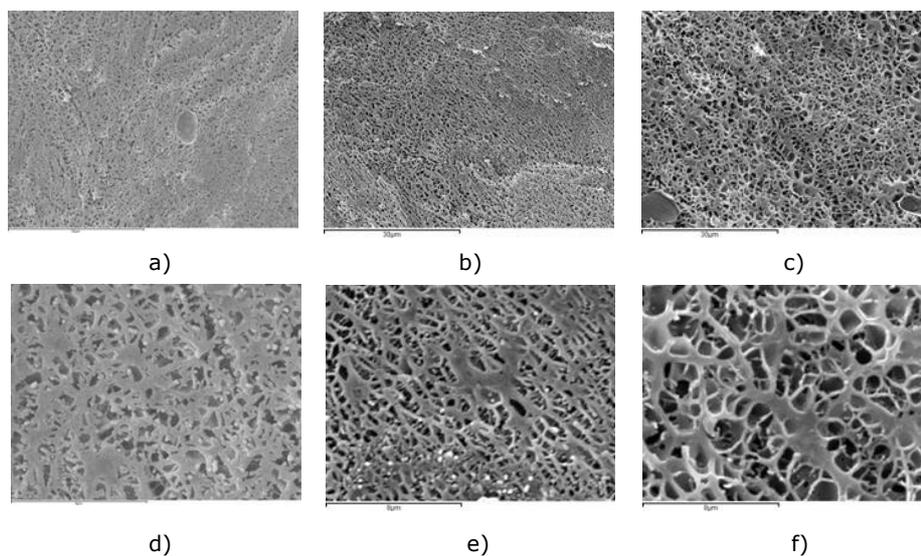


Figura IV.18. Micrografías de Cryo-SEM (x 2000 a, b y c y x 7500 d, e y f) para muestras sin tratamiento térmico de: fórmula base (a y d), fórmula base con adición de konjac glucomanano (b y e) y fórmula base con adición de carboximetilcelulosa sódica (c y f).

A bajos aumentos (x 2000) se observan pocas diferencias entre los distintos geles (Figura IV.18. a, b y c); la micrografía de todos ellos muestra una matriz continua y más o menos compacta con características similares. Conforme subimos los aumentos (x 7500, Figura IV.18. d, e y f) se pueden observar estructuras compuestas por elementos globulares muy juntas sin ninguna orientación definida pero, sin embargo, el aspecto que muestran las distintas matrices es bastante diferente en función del hidocoloide adicionado. Así pues, se observa un menor grado de compactación en las muestras con KGM o CMC con respecto a la muestra control (solo MTGasa y NaCl). La presencia de CMC produjo una matriz

más porosa y con un mayor tamaño de poro, con una estructura peculiar que da como resultado un producto con menor CRA y menor dureza y gomosidad que las muestras formuladas con KGM.

La apariencia tan diferente que muestran las micrografías (Figura IV.18.) realizadas con cryo-SEM en función del tipo de hidrocoloide adicionado a la formulación, pueden relacionarse con las diferencias encontradas en el análisis de los resultados obtenidos para los diferentes parámetros físico-químicos y mecánicos estudiados.

5.3.1.6.2. Análisis estructural de muestras con tratamiento térmico

Las proteínas miofibrilares del pescado son altamente inestables al calor y por tanto la aplicación de tratamientos térmicos en la elaboración de geles termo-irreversibles puede tener efectos considerables en las características finales del gel tal y como puede observarse en la Figura IV.19. El tratamiento térmico cambia el aspecto que mostraban las micrografías de las muestras frescas y se observa como el grado de agregación-compactación así como el aspecto de la red proteica formada difiere sustancialmente en función del hidrocoloide adicionado.

Desde el trabajo de Ferry (1948) ha sido generalmente aceptado que la formación de geles inducidos por calor requiere la desnaturalización proteica, la cual va acompañada de un cambio conformacional y la exposición de los grupos reactivos, seguido de un segundo paso en el cual las proteínas previamente desnaturalizadas establecen uniones proteína-proteína. Este hecho conlleva la agregación y formación de la red tridimensional en la cual debe existir un balance entre las fuerzas de atracción y de repulsión.

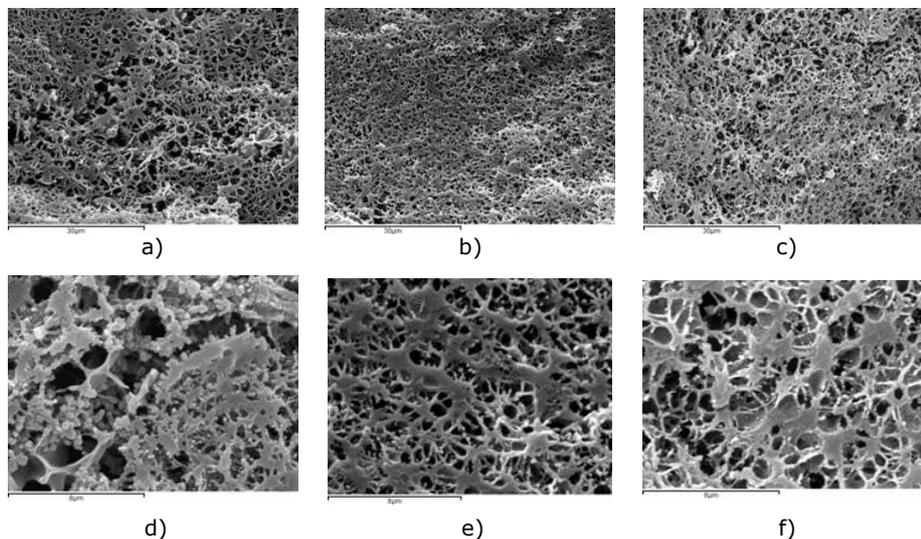


Figura IV.19. Micrografías de Cryo-SEM ($\times 2000$ a, b y c y $\times 7500$ d, e y f) para muestras con tratamiento térmico de: fórmula base (a y d), fórmula base con adición de konjac glucomanano (b y e) y fórmula base con adición de carboximetilcelulosa sódica (c y f).

El proceso por el cual se forman geles termo-irreversibles normalmente consiste en dos etapas. En la primera etapa, debido a la adición de sal y el triturado, las proteínas se desnaturalizan, solubilizan y se orientan asegurando una transición sol-gel de forma gradual lo que favorecerá la formación de una red proteica ordenada y estructurada. En la segunda etapa, la alta temperatura de cocción (≥ 80 °C) forma la red proteica definitiva. A altas temperaturas se cree que hay una mayor formación de uniones disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Careche et al., 1995; Álvarez y Tejada, 1997; Niwa et al., 1992; Tejada, 1994). En la Figura IV.19 se puede observar que los geles tratados térmicamente con KGM y con CMC (Figura IV.19. b y e; c y f) muestran una red más estructurada y con mayor grado de compactación que la fórmula

base (a y d). Estos geles, de acuerdo con los resultados obtenidos por Álvarez et al. (1999), mostraron una menor dureza y menor elasticidad que la fórmula base poniendo de manifiesto que aquellos geles con una estructura fibrilar más compacta son los que presentan menor resistencia a la compresión, contrariamente a lo esperado.

El tratamiento térmico aplicado al gel produjo una agregación adicional de la red proteica formada. Los resultados sugieren que la estructura formada fue el resultado de la desnaturalización-agregación durante la formación del gel, y que esto determina la forma en la cual las moléculas se reorganizan para formar la red final. Si la desnaturalización ocurre durante el periodo de incubación, pero las uniones intermoleculares que se producen son predominantemente inestables al calor (predominan las uniones de hidrógeno), la desnaturalización proteica asociada al tratamiento térmico podría causar una rápida agregación de moléculas poco orientadas ya que existen pocas uniones estables al tratamiento térmico para asegurar una correcta estructura del gel. Si las moléculas se agregan formando principalmente uniones estables al calor, con el tratamiento térmico la reorganización molecular estará limitada a las posibles uniones con fibras adyacentes y la estructura formada será más compacta (Álvarez et al., 1999).

La presencia de CMC no supone una mejora del producto por lo que para desarrollar un producto que pueda ser considerado como fuente de fibra y debido a la limitación legal en el uso de KGM se evaluó la adición de goma xantana a la formulación. En el siguiente apartado se presentan los resultados obtenidos tras la adición de esta goma a la formulación.

5.3.2. Adición de Konjac glucomanano y goma xantana

El KGM presenta sinergias con otras gomas como la goma xantana, el k-carragenato, el almidón o la goma gellan, mejorando su capacidad gelificante (Shinsaku et al., 2002). Con el fin de obtener un producto con elevado contenido en fibra se decidió evaluar la posibilidad de obtener un producto reestructurado fuente de fibra mediante la adición de goma konjac junto con goma xantana. La Tabla IV.27. muestra las formulaciones estudiadas. La cantidad de KGM a adicionar se fijó según el estudio previo con dos niveles de KGM y con CMC y teniendo en cuenta que según la directiva 98/72/CE del Parlamento Europeo la cantidad máxima que se permite adicionar en productos alimenticios es del 1%. La cantidad de xantana se calculó para alcanzar la cantidad de fibra en el producto final que se corresponde con la alegación "fuente de fibra" siguiendo el Reglamento CE N° 1924/2006 y teniendo en cuenta que la xantana se puede adicionar "*quantum satis*" según la directiva 98/72/CE.

Tabla IV.27. Formulaciones estudiadas con konjac glucomanano y goma xantana.

Formulación	Dorada (<i>Sparus aurata</i>) %	Agua %	Sal %	MTGasa %	Konjac %	Xantana %
Control	88,7	10	1	0,3	0	0
F1	87,7	10	1	0,3	1	0
F2	87,2	10	1	0,3	1	1,5

Como se ha comentado anteriormente, algunos aditivos han sido estudiados para mejorar las propiedades mecánicas y funcionales de los productos de pescado reestructurados. En el proceso de gelificación, durante la formación de la pasta o durante la formación de la matriz continua del gel inducida térmicamente,

algunos aditivos pueden interactuar con la matriz proteica de la pasta de pescado (principalmente agua y proteínas) para formar un sistema más estructurado, mientras que otros actúan como "rellenadores" (traducción literal de "fillers") ligando agua y modificando la viscosidad del sistema pero sin interactuar con él (Lee et al., 1992). La goma xantana es un polisacárido no lineal aniónico producido por la fermentación de *Xanthomonas campestris*. No tiene carácter gelificante, es soluble y capaz de formar soluciones altamente viscosas a bajas concentraciones cuya estabilidad no se ve afectada por la temperatura o el pH. Además, la goma xantana tiene una gran aceptación en la industria de los alimentos (Rodríguez-Hernández y Tecante, 1999) y presenta sinergias con otros polisacáridos no gelificantes de la familia de los galactomananos produciendo un incremento de la viscosidad (Casas y García-Ochoa, 1999) y de la formación del gel (Rodríguez-Hernández y Tecante, 1999). Las interacciones que han sido más estudiadas entre hidrocoloides y proteínas miofibrilares son las de los carragenatos y los alginatos en productos cárnicos debido al interés surgido en los últimos años por desarrollar productos bajos en grasa (De Freitas et al., 1997a,b). Hay pocos estudios realizados sobre el efecto de la adición de xantana en una matriz proteica de pescado, no obstante, algunos autores indican un efecto adverso sobre las propiedades gelificantes de la proteína miofibrilar al adicionar goma xantana. La goma xantana afecta a las propiedades texturales de frankfurt bajos en grasa (Mittal y Barbut, 1994), embutidos bajos en grasa (Solheim y Ellekjaer, 1994), rollitos de ternera reestructurados (Shand et al., 1993) o productos de pavo bajos en grasa (Hachmeister y Herald, 1998). Ramirez et al. (2002) estudian el efecto de la adición de goma xantana y goma de garrofín sobre las propiedades gelificantes de la

proteína miofibrilar pero no hay bibliografía disponible sobre el efecto de la adición de xantana junto con konjac glucomanano sobre las propiedades de la matriz proteica de un gel de pescado.

En el presente apartado se analiza el efecto de la adición de konjac glucomanano y mezcla de konjac glucomanano con goma xantana en las propiedades físico-químicas, capacidad de retención de agua, propiedades ópticas y mecánicas de reestructurados de dorada (*Sparus aurata*) como "fuente de fibra" obtenidos con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa.

5.3.2.1. Humedad, actividad de agua (a_w) y pH

En la Tabla IV.28. se muestran los valores de humedad, a_w y pH obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana así como del tratamiento térmico. En las muestras frescas la adición de fibra produjo un ligero incremento en los valores de humedad pero sin cambios significativos ($p > 0,05$). Sin embargo, los valores de actividad de agua experimentaron un significativo descenso ($p \leq 0,05$) debido a la presencia de fibra obteniéndose el menor valor para la formulación F2 (KGM+xantana).

El pH también experimentó variaciones aumentando de forma significativa con respecto a la muestra sin fibra (Tabla IV.28.). En las muestras tratadas térmicamente, los menores valores de humedad y actividad de agua se obtuvieron para la formulación fuente de fibra (F2), mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la muestra control y a la muestra con 1% de KGM (F1). El pH, en el caso de las muestras tratadas térmicamente, sufrió un ligero pero significativo descenso debido a la presencia de fibra respecto a la muestra control.

Tabla IV.28. Valores de humedad, a_w y pH obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).

		Control	F1	F2
Sin tratamiento térmico	%Humedad	72,2 (0,5) ^(a)	73,3 (0,2) ^(a)	73,6 (0,2) ^(a)
	a_w	0,983 (0,001) ^(a)	0,977 (0,001) ^(b)	0,976 (0,001) ^(b)
	pH	6,13 (0,01) ^(a)	6,14 (0,01) ^(b)	6,17 (0,01) ^(c)
Con tratamiento térmico	%Humedad	72,4 (0,5) ^(a)	73,0 (0,2) ^(a)	71,3 (0,5) ^(b)
	a_w	0,9838 (0,0004) ^(a)	0,977 (0,001) ^(b)	0,974 (0,001) ^(c)
	pH	6,407 (0,006) ^(a)	6,363 (0,006) ^(b)	6,37 (0,02) ^(b)

(a)(b)(c)(d) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) empleando como factor la formulación.

5.3.2.2. Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Los valores obtenidos en este estudio para la capacidad de retención de agua mostraron que la adición de fibra mejora dicha propiedad incrementándola de forma significativa ($p \leq 0,05$) a medida que se incrementa la cantidad de fibra, tal y como se observa en la Figura IV.20.b). Este resultado está acorde con los obtenidos por otros autores como Pérez-Mateos y Montero (2000) que, en un estudio realizado para evaluar las propiedades funcionales de músculo de pescado adicionando diferentes hidrocoloides a distintas concentraciones, determinaron que las muestras con hidrocoloides adicionados a la matriz presentaron mayores valores de capacidad de retención de agua que aquellos geles sin hidrocoloides poniendo de manifiesto la habilidad para ligar agua que muestran dichas sustancias. Otros autores como Foegeding y Ramsey (1987) encontraron que la adición de iota-

carragenato mejoraba la capacidad de retención de agua en geles de carne de ternera y Gómez-Guillén y Montero (1996) en sus estudios realizados con geles de sardina concluyeron que la adición de hidrocoloides a la formulación puede resultar crucial para mejorar la capacidad de retención de agua ya que aumenta un 95% dicha propiedad independientemente de la cantidad de sal adicionada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio y que mostraron que la adición de konjac glucomanano junto con goma xantana produjo elevados valores de capacidad de retención de agua (97%) en las muestras tratadas térmicamente (Figura IV.20 b). Este incremento debido a la adición de KGM+goma xantana no solo puede ser debido a la enorme habilidad que muestran los hidrocoloides por captar agua si no que también podría deberse a la naturaleza aniónica de la goma xantana ($-\text{COO}^-$) que podría interactuar con las proteínas miofibrilares mediante la unión de los grupos carboxilo cargados negativamente con los aminoácidos cargados positivamente de la cadena proteica (Morin et al., 2004; Ramírez et al., 2002a). La goma xantana tiene una estructura muy ramificada (Nussinovitch, 1997) y esta propiedad junto con la naturaleza aniónica de la molécula hacen que tenga una mayor actividad en el producto.

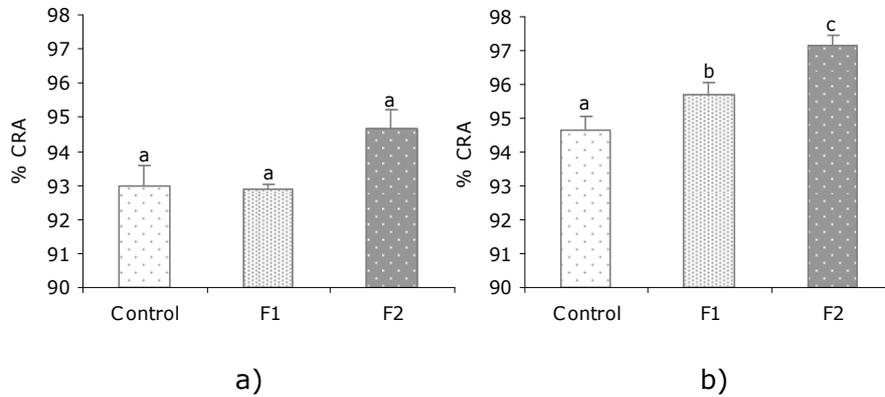


Figura IV.20. Valores de capacidad de retención de agua (CRA) obtenidos para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).

5.3.2.3. Propiedades ópticas

La adición de KGM y KGM+goma xantana a las muestras frescas en las proporciones estudiadas produjo cambios en las coordenadas colorimétricas tal y como se puede observar en la Tabla IV.29. Los valores de L^* , a^* y b^* fueron significativamente más bajos ($p \leq 0,05$) en las formulaciones con fibra. Entre la fórmula F1 y F2 no se apreciaron diferencias significativas. De acuerdo con Pérez-Mateos y Montero (2000) no se apreciaron cambios en la luminosidad (L^*) de las muestras tratadas térmicamente debido a la presencia de hidrocoloides ni tampoco se apreciaron cambios significativos ($p > 0,05$) en las coordenadas a^* y b^* . En las muestras sin tratamiento térmico la adición de fibra supuso una disminución tanto del tono (h_{ab}^*) como del croma (C_{ab}^*) siendo más significativas estas últimas. En las muestras tratadas térmicamente estos cambios de tono y croma debidos a la adición de fibras no fueron significativos.

Tabla IV.29. Coordenadas de color CIEL*a*b*, tono (h_{ab}^*) y croma (C_{ab}^*) de las diferentes formulaciones estudiadas en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana, así como del tratamiento térmico. Valores promedio (SD).

		Control	F1	F2
Sin tratamiento térmico	L*	51,4 (1,3) ^(a)	48,3 (2,1) ^(b)	48,4 (1,1) ^(b)
	a*	-2,0 (0,2) ^(a)	-1,2 (0,4) ^(b)	-1,2 (0,2) ^(b)
	b*	6,7 (0,7) ^(a)	4,8 (0,6) ^(b)	5,7 (0,4) ^(b)
	h_{ab}^*	106,6 (0,8) ^(a)	104,3 (5,3) ^(ab)	101,5 (1,7) ^(b)
	C_{ab}^*	7,0 (0,8) ^(a)	5,0 (0,5) ^(b)	5,9 (0,4) ^(c)
Con tratamiento térmico	L*	65,0 (1,1) ^(a)	67,4 (1,7) ^(a)	66,7 (1,4) ^(a)
	a*	-2,2 (0,2) ^(a)	-2,3 (0,3) ^(a)	-2,4 (0,3) ^(a)
	b*	7,9 (0,8) ^(a)	7,2 (0,6) ^(a)	6,6 (1,4) ^(a)
	h_{ab}^*	105,5 (2,0) ^(a)	107,6 (3,2) ^(a)	110,5 (3,8) ^(a)
	C_{ab}^*	8,2 (0,7) ^(a)	7,5 (0,5) ^(a)	7,0 (1,3) ^(a)

(a)(b)(c) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) empleando como factor la formulación.

5.3.2.4. Propiedades mecánicas

El efecto de la adición de KGM y KGM+goma xantana a productos reestructurados de dorada (*Sparus aurata*) sobre las propiedades mecánicas se puede observar en la Figura IV.21. En las muestras frescas (Figura IV.21. a) se observa que la adición de KGM y KGM+xantana en las proporciones estudiadas provocó un aumento lineal y significativo ($p \leq 0,05$) en la dureza, la adhesividad y la gomosidad de las muestras, mientras que la cohesividad no mostró variaciones. La elasticidad, aunque se vio incrementada, el efecto no fue significativo ($p > 0,05$).

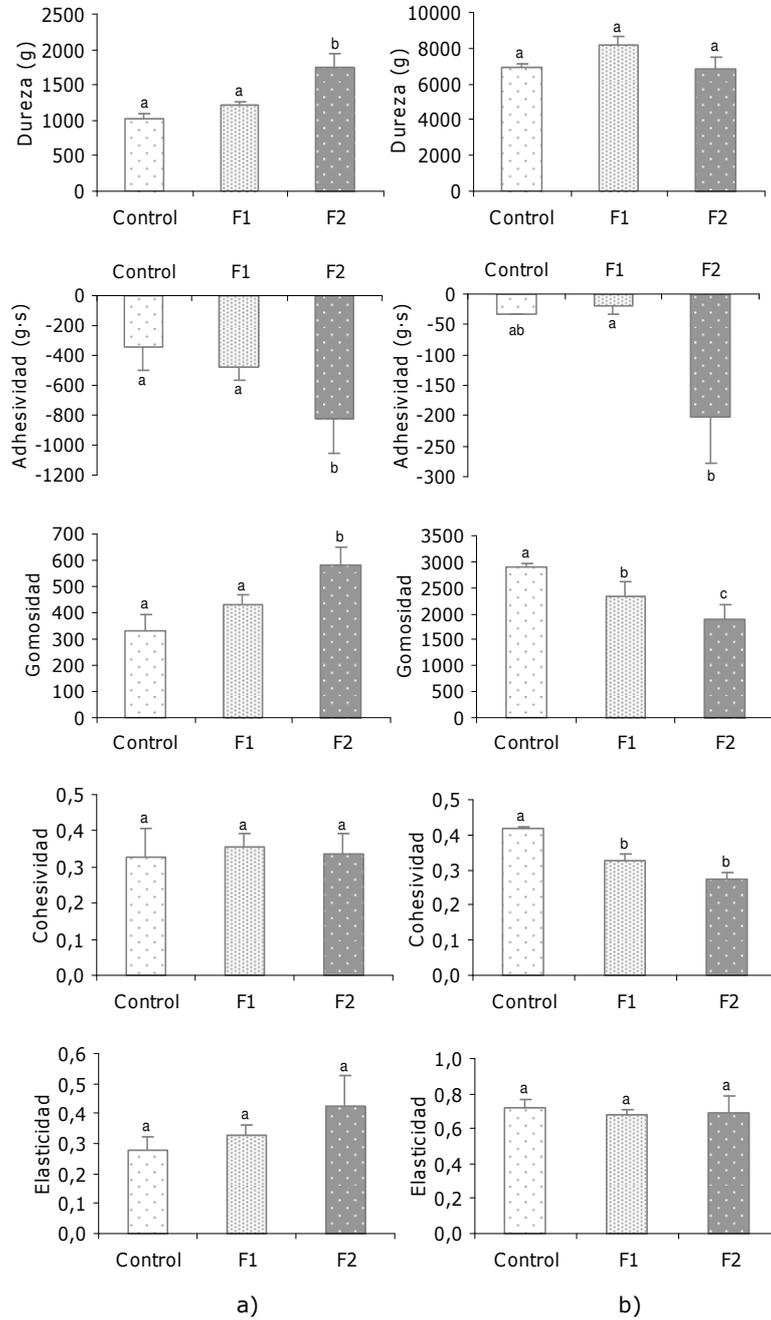


Figura IV.21. Valores de los parámetros mecánicos dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad obtenidos con el

ensayo de TPA para las diferentes formulaciones en función del nivel de konjac glucomanano y goma xantana empleado para las muestras frescas (a) y las muestras tratadas térmicamente (b).

En las muestras tratadas térmicamente (Figura IV.21.b), tal y como se observó debido a la adición de KGM y CMC (apartado 5.3.1.4.), se mostró el efecto contrario al de las muestras frescas produciéndose un pérdida de cohesividad y de gomosidad debido a la adición de KGM más acusada en el caso de KGM+goma xantana. Esta pérdida de cohesividad puede ser debida a la presencia de hidrocoloides más que a la reducción de la concentración proteica presente en el gel por la adición de dichos ingredientes. La elasticidad de las muestras tratadas térmicamente fue independiente de la presencia de KGM y KGM+xantana en la formulación no apreciándose diferencias significativas ($p>0,05$) en este parámetro. La adición de KGM+xantana dio como resultado geles más blandos ($p>0,05$) y más adhesivos con respecto a la muestras que solo contenían KGM.

5.3.2.5. Análisis factorial de las muestras con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa con KGM y KGM+goma xantana sin tratamiento térmico

Al igual que en otros apartados para intentar comprender mejor las interrelaciones entre los parámetros analizados se realizó un análisis factorial de los datos experimentales.

El análisis factorial realizado para estas muestras explica un 91,973% de la variabilidad de los datos (Tabla IV.30.) con dos factores. El mayor peso del análisis lo tiene el factor 1 que recoge las variables: gomosidad, adhesividad, elasticidad, dureza y

actividad de agua; mientras que el factor 1 solo recoge la variable cohesividad (Tabla IV.31.).

Tabla IV.30. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis factorial.

Factor	%Explicado	%Acumulado
1	71,155	71,155
2	20,818	91,973

Tabla IV.31. Distribución de las diferentes variables y sus pesos sobre cada uno de los factores.

	Factor 1	Factor 2
Gomosidad	0,976	
Adhesividad	-0,954	
Elasticidad	0,935	
Dureza	0,923	
a_w	-0,812	
Cohesividad		0,994

En la Figura IV.22. se puede observar la representación en el plano factorial de las variables y muestras estudiadas y, al igual que se ha visto en apartados anteriores, pone de manifiesto que la adición del hidrocoloide afecta a las propiedades del gel proteico de manera significativa.

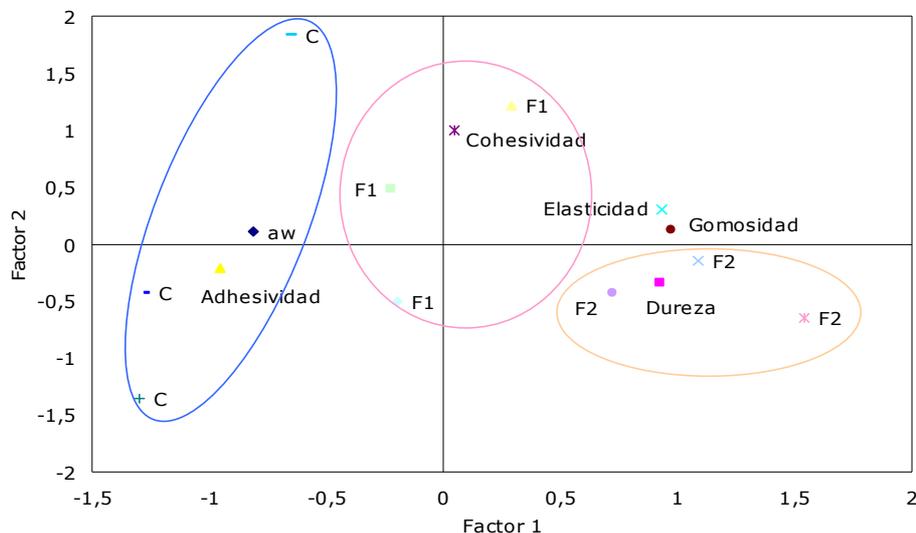


Figura IV.22. Análisis Factorial. Representación en el plano factorial de las variables estudiadas y las muestras evaluadas sin tratamiento térmico.

La formulación fuente de fibra (konjac+xantana) presenta propiedades diferentes a la muestra control y a la muestra con konjac (Figura IV.22.), siendo más dura y elástica y también más gomosa y adhesiva. Estos resultados ya se observaron en el análisis de los parámetros físico-químicos y de las propiedades mecánicas y los catadores fueron capaces de identificar tal y como se explica en el apartado 5.3.2.6. Se puede decir que la presencia de fibra permite modificar la textura del producto y sería conveniente hacer otros análisis adicionales para tratar de identificar de qué modo interacciona la fibra con la matriz proteica del gel. El konjac glucomanano modifica las propiedades del gel, posiblemente debido a un aumento de la viscosidad del espacio intersticial actuando como "rellenador" (siguiendo los modelos propuestos por Ziegler y Foegeding (1991) pero debido a su

carácter no-iónico es poco probable que se creen interacciones con la propia matriz proteica, aunque la técnica de Cryo-SEM no nos permite afirmar dicha hipótesis. Por otra parte, la sinergia entre el konjac glucomanano y la goma xantana (agente no gelificante) permite formar un gel que es capaz de retener agua en su matriz disminuyendo la actividad de agua del producto final y aumentando su capacidad de retención de agua. Este gel formado no solo forma una matriz "en paralelo" a la red proteica si no que, es posible que debido al carácter aniónico de la molécula de xantana también interaccionen con la matriz proteica como se desprende del aspecto que muestran las micrografías correspondientes a estas muestras (apartado 5.3.2.7.).

En este caso, el análisis factorial de las muestras con KGM+goma xantana con tratamiento térmico no salió estadísticamente significativo y por tanto no aportó información relevante para el estudio.

5.3.2.6. Análisis sensorial

Una vez establecida la fórmula base se procedió a un tercer análisis sensorial con el objetivo de evaluar la aceptación de la fórmula fuente de fibra. Para este último análisis se utilizó la norma que se encontraba en vigor en ese momento: Normas AENOR, 2009 (UNE-EN ISO 5495), dicha norma anula y sustituye a la anteriormente citada Norma UNE 87005:1992. Esta nueva norma no permite preguntar por la muestra preferida a la vez que se evalúan los atributos y por tanto en este caso se tuvieron que hacer cuestionarios separados.

El objetivo del presente análisis, tal y como se ha especificado en el apartado 4.3 de materiales y métodos, fue obtener una

formulación fuente de fibra aceptable por los consumidores. El análisis de los resultados se llevó a cabo de la misma manera que en el apartado 5.1.6.1. y 5.1.6.2. Se evaluaron tres muestras diferentes: una muestra control con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa (fórmula base seleccionada tras los dos primeros análisis sensoriales que en este apartado será la muestra 0% de fibra), la segunda muestra con 1% de NaCl, 0,3% de MTGasa y 1% de KGM y finalmente la tercera muestra con 1% de NaCl, 0,3% de MTGasa, 1% de KGM y 1,5% de goma xantana. Las respuestas de los catadores se obtuvieron a partir de los dos cuestionarios que se les repartieron a cada catador durante el análisis sensorial (Anexos C y D). Aunque debido a la normativa vigente se tuvieron que pasar dos cuestionarios, uno para evaluar la preferencia de los catadores y otro para evaluar los diferentes atributos, los resultados se presentan de forma conjunta. En la Tabla IV.32. se muestran las frecuencias obtenidas para cada muestra en función del atributo evaluado.

Tabla IV.32. Frecuencia de las respuestas de los catadores en la comparación pareada múltiple de las formulaciones estudiadas.

Atributos	0% fibra	1%KGM	1% KGM+1,5% Xantana
Aspecto	70	44	45
Dureza	73	61	25
Gomosidad	69	47	43
Sabor a dorada	67	50	42
Jugosidad	30	55	74
Muestra preferida	55	47	57

Para poder evaluar y comparar todas las muestras en conjunto se llevaron a cabo los análisis estadísticos que se comentan a continuación.

Test de Friedman y Suma de Rangos

En este caso la suma de rangos se calculó para las todas las formulaciones tal y como se explica en el apartado 5.1.5.1. Una vez obtenida la suma de rangos para cada formulación se calculó la función estadística T de Friedman, según la ecuación IV.2., para comprobar si las diferencias encontradas en la ordenación de las puntuaciones de los atributos y la preferencia fueron significativas.

En la Tabla IV.33. se pueden observar los valores de T de Friedman obtenidos en este análisis sensorial. Dichos valores fueron comparados con el valor χ^2 tabulada con 2 grados de libertad (5,99 con un nivel de confianza de $\alpha=0,05$).

Tabla IV.33. Valores T de Friedman para los distintos atributos analizados.

Atributos	T de Friedman
Aspecto	10,9*
Dureza	31,4*
Gomosidad	9,9*
Sabor a dorada	8,2*
Jugosidad	24,5*
Muestra preferida	1,4

(*)Diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.

Como se puede observar en la Tabla IV.33. en este análisis sensorial se establecieron diferencias significativas para todos los atributos analizados excepto para la muestra preferida cuya elección no se vio afectada por la presencia de fibra en la formulación. Cabe recordar que, en este caso, el test de los atributos y de la muestra preferida se hizo por separado ya que así lo exige la nueva norma. Este hecho pudo influir de alguna manera en el resultado al ser otros motivos distintos del conjunto de atributos los que influyeron en la decisión de los encuestados.

Para evaluar entre qué muestras se establecían dichas diferencias significativas se realizó una comparación múltiple entre las muestras empleando el método HSD (Honestly Significance Difference) de Tukey mediante la ecuación IV.3. En este caso el valor de q tabulado para 2 grados de libertad y un nivel de confianza de $\alpha=0,05$ es de 3,31. El valor HSD que se obtuvo fue de 20,87. Para comparar entre las distintas parejas que se ofrecieron a los jueces se hizo la diferencia de suma de rangos (Tabla IV.34.) tal y como se explica en el apartado 5.1.6.1.

Tabla IV.34. Diferencia entre la suma de rangos para las formulaciones estudiadas.

Atributos	0%fibra- 1%KGM	0%fibra- 1%KGM+1,5%xantana	1%KGM- 1%KGM+1,5%xantana
Aspecto	26*	25*	1
Dureza	12	48*	36*
Gomosidad	22*	26*	4
Sabor a Dorada	17	25*	8
Jugosidad	25*	44*	19
Muestra Preferida	8	2	10

(*) Diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.

El resultado de este análisis mostró diferencias significativas entre la muestra sin fibra y la muestra con 1% de KGM para los atributos: aspecto, gomosidad y jugosidad, y entre la muestra sin fibra y la muestra fuente de fibra con 1% de KGM y 1,5% de goma xantana para todos los atributos estudiados excepto para la muestra preferida. Sin embargo, entre la formulación con 1% de KGM y la formulación con 1% de KGM+1,5% de xantana los catadores solo encontraron diferencias significativas para el atributo dureza. Los catadores detectaban la presencia de fibra pero no fueron capaces de diferenciar entre la fórmula con 1% de

KGM y la fórmula con 1% de KGM+1,5% de xantana, excepto en el atributo dureza.

Análisis de correspondencias

Para determinar la preferencia y las relaciones que tenían los diferentes niveles de NaCl con respecto a los atributos estudiados se prosiguió con el análisis de correspondencias tal y como se describe en el apartado 4.7. Del análisis de correspondencias realizado se obtuvieron dos factores que explican el 100% de la variabilidad de los datos (Tabla IV.35.). De esta forma se puede decir que los atributos y las diferentes formulaciones estuvieron bien representadas a lo largo del plano factorial.

Los datos presentados en las Tablas IV.36. y IV.37. muestran que las formulaciones y los atributos están bien representados a lo largo de los dos primeros factores, ya que las sumas de las contribuciones relativas de estos dos factores en relación a cada formulación fueron altas. Por lo tanto, los resultados más relevantes del análisis sensorial realizado pueden ser deducidos del estudio de la proyección en el plano factorial representado en la Figura IV.23.

Tabla IV.35. Porcentaje de variabilidad explicado por los factores del análisis de correspondencias.

Factor	% Explicado	% Acumulado
1	89,5	89,5
2	10,5	100

Tabla IV.36. Contribución de los factores a la inercia de las formulaciones.

Formulaciones	Factor 1	Factor 2	Suma de Factores
0% fibra	0,950	0,050	1
1% KGM	0,004	0,996	1
1% KGM+1,5% Xantana	0,974	0,026	1

Tabla IV.37. Contribución de los factores a la inercia de cada atributo.

Atributos	Factor 1	Factor 2	Suma de Factores
Aspecto	0,455	0,545	1
Dureza	0,817	0,183	1
Gomosidad	0,773	0,227	1
Sabor a dorada	0,986	0,014	1
Jugosidad	0,976	0,024	1
Muestra preferida	0,867	0,133	1

La Figura IV.23. muestra la proyección de los atributos y las formulaciones evaluadas en un plano factorial. Según la distribución de los atributos en el plano se puede observar que la formulación preferida por los catadores fue la que tenía un 1% de KGM+1,5% de xantana. La presencia de fibra modifica el sabor a dorada de las muestras ya que los catadores identificaron las muestras sin fibra (0% fibra) como aquellas con más sabor a dorada así como las que mejor aspecto presentaban. Por otra parte, tal y como se muestra en los resultados obtenidos mediante técnicas instrumentales, la adición de fibra modifica los parámetros texturales disminuyendo la gomosidad de las muestras y variando su dureza y así lo identifican los catadores mediante el análisis sensorial. Finalmente, en la Figura IV.23 se puede observar que al realizar el test para seleccionar la muestra preferida por separado, y antes del test para evaluar los atributos, los resultados obtenidos no nos permiten analizar a qué parámetros los catadores le

concedieron más importancia a la hora de elegir su muestra preferida y por tanto, se pierde información relevante a la hora de optimizar o modificar una formulación.

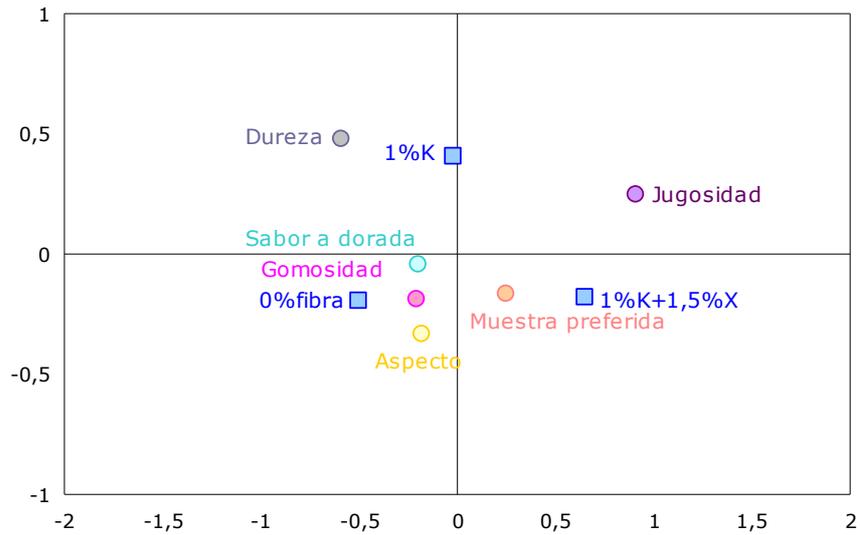


Figura IV.23. Análisis de correspondencias. Representación en el plano factorial, de los atributos elegidos (círculos) y las muestras evaluadas (cuadrados).

En resumen, se puede decir que, la adición de fibra a la formulación supone cambios en algunos parámetros relevantes del producto como la textura, a su vez incrementa la capacidad de retención de agua y disminuye su a_w . Estos cambios pueden ser muy interesantes desde el punto de vista tecnológico y no suponen un impedimento para la aceptación del producto por parte del consumidor, lo cual podría suponer una ventaja nutricional y de marketing.

5.3.2.7. Análisis estructural

Tal y como se expone en el apartado 5.1.7. y el apartado 5.3.1.6. del presente capítulo, la técnica de Cryo-SEM se utilizó para tratar de confirmar, mediante la observación de la microestructura de los geles proteicos obtenidos mediante la adición de diferentes hidrocoloides, las diferencias encontradas en el análisis de los datos para los parámetros estudiados.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el análisis estructural de las muestras correspondientes a texturizados de dorada con fibra sin tratamiento térmico y con tratamiento térmico.

5.3.2.7.1. Análisis estructural de muestras sin tratamiento térmico

En la elaboración de productos basados en la gelificación de la proteína miofibrilar, los aditivos son comúnmente utilizados para modificar la textura, las propiedades ligantes y mantener el producto estable durante el almacenamiento. Estos aditivos actúan física y/o químicamente produciendo cambios estructurales en la matriz proteica. Dichos cambios en la matriz dependerán de la composición, distribución y estado en el que se adicione el aditivo, así como de las interacciones que existan entre éste y la matriz (Filipi y Lee, 1998; Lanier, 1990; Mills, 1990; Okada, 1974). Como se ha comentado en los anteriores apartados referentes a la estructura de los productos reestructurados, algunos trabajos muestran el efecto que tiene la adición de goma xantana en las propiedades texturales de frankfurters bajas en grasa (Mittal y Barbut, 1994), en salchichas bajas en grasa (Solheim y Ellekjaer, 1994), en rollos de carne de ternera reestructurada (Shand et al., 1993) o productos de pavo bajos en grasa (Hachmeister y Herald,

1998) pero, como se comentó, no existe información disponible sobre el uso de la goma xantana junto con goma konjac y su efecto sobre las propiedades físico-químicas y estructurales en los productos reestructurados de pescado (*Sparus aurata*). Chattong et al. (2007) en su estudio llevado a cabo en un producto comercial de carne de avestruz concluyen que la adición de hidrocoloides (concretamente goma xantana y carboximetilcelulosa) no parece contribuir a la formación de una red proteica con una estructura física definida pero sí tienen un papel importante como surfactantes modificando el tamaño de los glóbulos de grasa presentes en la matriz. Existen varios modelos que tratan de explicar las estructuras que pueden formarse debido a la adición de hidrocoloides y cómo éstos pueden interaccionar con la proteína muscular (Aguilera y Kessler, 1989; Ring y Stainsby, 1982; Tolstoguzov y Braudo, 1983; Ziegler y Foegeding, 1991). El modelo de Ziegler y Foegeding (1991) explica la posible distribución espacial de la proteína gelificada con agentes gelificantes y no-gelificantes presentes en la matriz. Al primer modelo lo denomina "modelo simple" y en él los hidrocoloides actúan como "simples agentes rellenos" (habla de agentes gelificantes) de la matriz proteica, en este caso son solubles en el fluido intersticial de la matriz del gel proteico. En el caso de agentes no-gelificantes éstos están como partículas dispersas. En ambos casos la fase dispersa no se asocia con la matriz del gel y por este motivo Ziegler y Foegeding (1991) los denominan "ingredientes pasivos". En el segundo modelo que proponen, los hidrocoloides se asocian directamente con los componentes gelificantes primarios mediante interacciones no específicas. Las interacciones proteína-hidrocoloide son principalmente electroestáticas, entre grupos aniónicos del hidrocoloide y grupos cargados positivamente de la

proteína los cuales son dependientes de la concentración y de la proporción de hidrocoloide utilizado (Tolstoguzov, 1986) (hay que recordar que la xantana es de naturaleza aniónica ($-\text{COO}^-$), y por tanto pueden interaccionar los grupos carboxilo cargados negativamente con los extremos de las cadenas de aminoácidos de las proteínas cargados positivamente (Morin et al., 2004; Ramírez et al., 2002a)). Algunos estudios previos se han llevado a cabo sobre las interacciones entre hidrocoloide-hidrocoloide en sistemas acuosos o en músculo de carne pero muy pocos trabajos se han realizado en pescado.

En la Figura IV.24. se muestra la microestructura de los geles formulados con NaCl y MTGasa (a y d), NaCl-MTGasa y KGM (b y e) y con NaCl-MTGasa-KGM y goma xantana (c y f) sin tratamiento térmico. Como se puede apreciar en la Figura IV.24. las mayores diferencias en la estructura de los geles se presentan en las muestras fuente de fibra (c y f) que muestran un aspecto muy diferente a la fórmula base (a y d) y a las fórmulas con KGM (b y e). La muestra sin adición de hidrocoloides (Figura IV.24 a y d) presenta un aspecto homogéneo con una estructura ligeramente porosa. Sin embargo, la fórmula con konjac glucomanano y goma xantana (Figura IV.24 c y f) muestra una matriz con una distribución de poros muy diferente y éstos presentan un mayor tamaño. Esta fórmula mostró una mayor CRA y una mayor dureza y elasticidad. Tanto la goma xantana como el KGM presentan una ligera tendencia a gelificar dependiendo de la temperatura y de la concentración (Paradossi et al., 2002). La goma xantana por sí sola es capaz de formar geles blandos a concentraciones superiores al 1% (w/v) impartiendo a la solución un comportamiento viscoelástico (Oviatt y Brant, 1993) y el konjac glucomanano puede formar geles termoestables en un medio alcalino (Dave y

McCarthy, 1997; Nishinari et al., 1992; Yoshimura y Nishinari, 1999). Sin embargo, debido a la sinergia existente entre la goma xantana y el KGM se mejoran las capacidades gelificantes de ambos y la habilidad de este sistema para captar agua es importante (Paradossi et al., 2002) lo que justificaría la mayor capacidad de retención de agua obtenida con la formulación fuente de fibra (KGM+xantana).

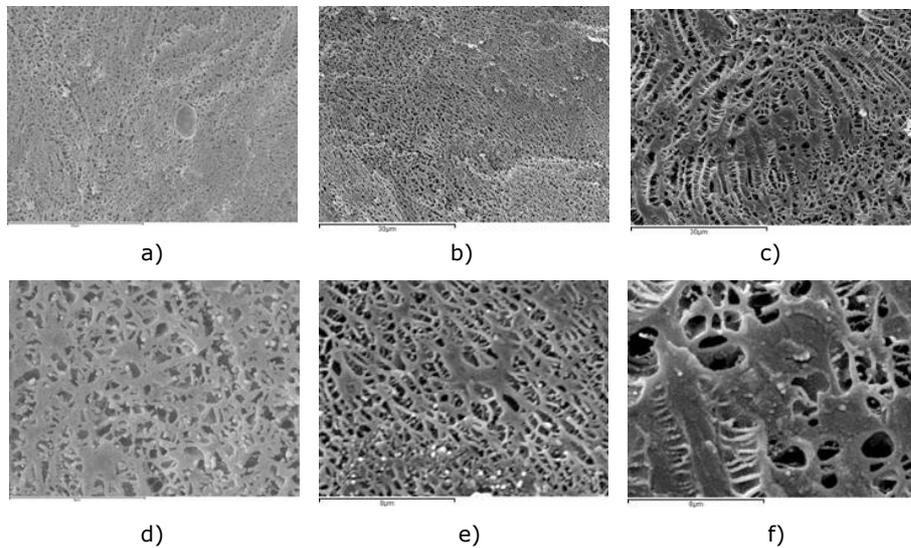


Figura IV.24. Micrografías de Cryo-SEM (x 2000 a, b y c; x 7500 d, e y f) para muestras sin tratamiento térmico de: fórmula base (a y d), fórmula base con adición de konjac glucomanano (b y e) y fórmula base con adición de konjac glucomanano y goma xantana (c y f).

Las Figuras IV.24. (b y e) muestran un aspecto muy similar a la muestra control que podría indicar que el KGM, debido a su naturaleza no-iónica, no está interaccionando con la matriz proteica y su presencia aumenta la viscosidad del medio captando agua y aumentando así la capacidad de retención de agua a la vez que

refuerza la red aumentando la dureza y la elasticidad del gel. Sin embargo, la estructura que aparece en la imagen correspondiente a la micrografía de la muestra con adición de konjac y goma xantana (Figura IV.24. c y f) podría indicar que el konjac y la goma xantana podrían interaccionar con la matriz proteica debido a la naturaleza aniónica de la xantana mostrando un aspecto más compacto y continuo que da como resultado una mayor dureza y elasticidad.

5.3.2.7.2. Análisis estructural de muestras con tratamiento térmico

En la Figura IV.25. se muestra la microestructura de los geles formulados con NaCl y MTGasa (a y d), NaCl-MTGasa y KGM (b y e) y con NaCl-MTGasa-KGM y goma xantana (c y f) con tratamiento térmico a 2000 y 7500 aumentos. Al igual que se observaba en el caso de las muestras sin tratamiento térmico (Figura IV.23.) lo primero que destaca es el diferente aspecto que muestran las formulaciones estudiadas. A 2000 aumentos (Figura IV.25 a, b y c) el aspecto que ofrecen las tres muestras es muy similar siendo la muestra control la que mayor porosidad presenta en su matriz así como una menor homogeneidad, sin embargo entre la muestra con KGM y la muestra con KGM+xantana las diferencias son poco apreciables. Cuando observamos las micrografías tomadas a 7500 aumentos (Figura IV.25 d, e y f), ya se empiezan a percibir más cambios entre las tres muestras. El tratamiento térmico ocasiona la desnaturalización proteica y eso se puede comprobar comparando las micrografías de muestras sin tratamiento térmico (Figura IV.24) con las tratadas térmicamente (Figura IV.25.).

La desnaturalización proteica, como ya se ha ido comentando a lo largo del presente capítulo, induce la exposición de residuos hidrofóbicos y permite la agregación ordenada de macromoléculas

para formar estructura tridimensional de los geles (Ramírez et al., 2002a). Esta reordenación estructural da lugar al aspecto que observamos en las micrografías de las muestras tratadas térmicamente (Figura IV.25.) en las que se puede intuir que la adición de fibra modifica la estructura del gel pero es el tratamiento térmico el factor relevante.

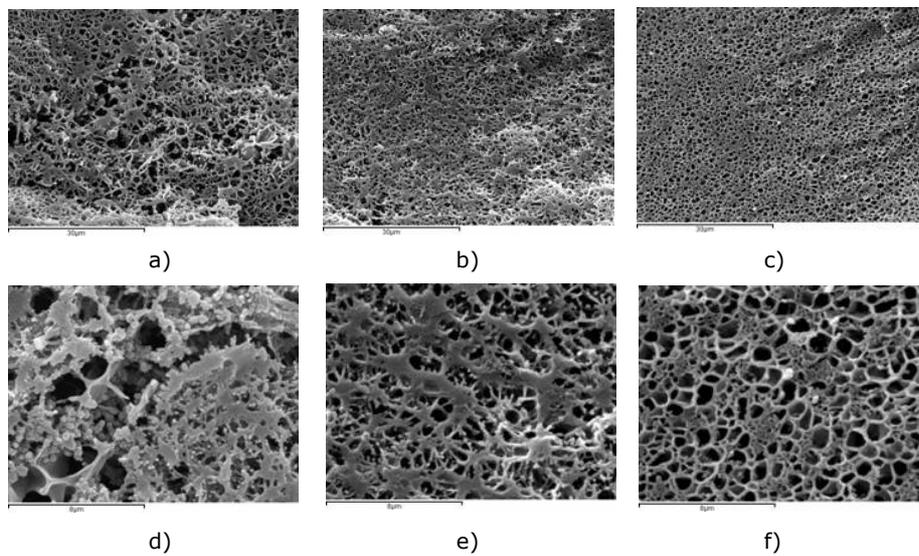


Figura IV.25. Micrografías de Cryo-SEM (x 2000 a, b y c; x 7500 d, e y f) para muestras con tratamiento térmico de: fórmula base (a y d), fórmula base con adición de konjac glucomanano (b y e) y fórmula base con adición de konjac glucomanano y goma xantana (c y f).

En las muestras tratadas térmicamente la presencia de fibra produjo un descenso en la cohesividad y gomosidad del gel con respecto a la muestra control o fórmula base, mientras que la capacidad de retención de agua fue mayor en aquellas formulaciones con fibra. Las muestras con KGM (Figura IV.25. b y e) muestran una especie de estructura radial que se repite.

Siguiendo con la hipótesis planteada en el apartado anterior, dicha estructura podría deberse a la gelificación de la matriz con la presencia de konjac en los espacios intersticiales dando lugar a esa apariencia más densa en el centro de dichos "radios". Sin embargo, las muestras con KGM+xantana (Figura IV.25. c y f) presentan una estructura bastante definida en forma de esponja o de panal, con un mayor tamaño de poro debido a la mayor cantidad de agua que estaba retenida en la matriz.

Hay diferentes teorías al respecto de cómo interaccionan los hidrocoloides con la matriz proteica. Ziegler y Foegeding (1991), como ya se ha comentado, proponen diferentes modelos en los que plantean varias posibilidades de relación entre el hidrocoloide y la matriz proteica; Chattong et al. (2007) afirman que la adición de hidrocoloides produce una disminución en las interacciones de la matriz proteica lo que implica una disminución de la elasticidad del gel. Montero et al. (2000) concluyen que la adición de hidrocoloides interfiere con la matriz proteica modificando su capacidad para gelificar. Los geles que elaboraron con hidrocoloides aniónicos dieron mejores resultados en el estudio de compresión debido probablemente a las interacciones químicas con la proteína miofibrilar. Doerscher et al. (2003) sugieren que la incorporación de hidrocoloides no tiene ningún efecto en las propiedades gelificantes de las proteínas. Regenstein (1989) sugiere que los hidrocoloides pueden actuar suplementando la matriz proteica participando de una manera directa en la formación de dicha matriz mediante interacciones químicas mejorando así la capacidad de retención de agua y/o actuando como agente surfactante en la interfaz aceite/agua. En el presente estudio se observa como la adición de hidrocoloides sí que interfiere de manera significativa en la matriz proteica del gel, para los hidrocoloides y las condiciones

estudiadas, modificando tanto la capacidad de retención de agua como las propiedades mecánicas del mismo. De acuerdo con los modelos propuestos por Ziegler y Foegeding (1991) cada hidrocoloide, y dependiendo de las diferentes condiciones de procesado, actúa en la matriz proteica de una manera diferente y la forma en la que interacciona depende, entre otros factores, de la naturaleza química del hidrocoloide.

5.4. Estudio de la evolución durante el almacenamiento con y sin tratamiento térmico de la formulación fuente de fibra

Por último, y tras los estudios fisicoquímicos, sensoriales y estructurales y con una formulación definida (F2) se estudiaron la evolución de los parámetros físico-químicos y microbiológicos del reestructurado de dorada fuente de fibra para determinar su vida útil y así contribuir a evaluar su viabilidad desde un punto de vista comercial.

En este apartado se muestran los cambios de humedad, pH, a_w , CRA, color y las propiedades mecánicas durante el almacenamiento en refrigeración de la fórmula fuente de fibra (F2) así como el estudio microbiológico realizado para determinar la vida útil de dicha formulación con y sin tratamiento térmico. El almacenamiento en refrigeración se realizó durante 21 días para las muestras sin tratamiento térmico y 77 días para las muestras con tratamiento térmico a una temperatura de 4 °C tal y como se describe en el apartado 4.5 de materiales y métodos.

5.4.1. Evolución durante el almacenamiento de la humedad, actividad de agua (a_w) y pH

En la Tabla IV.38. se muestra la evolución de los parámetros de humedad, actividad de agua (a_w) y pH durante el almacenamiento en refrigeración de la fórmula fuente de fibra (1% KGM + 1,5% xantana) tanto en fresco como tratada térmicamente. En las muestras frescas, la humedad y la actividad de agua mostraron un ligero pero significativo ($p \leq 0,05$) descenso a los 14 días de almacenamiento respecto al día 0. El pH, sin embargo, aumentó ligeramente al séptimo día de almacenamiento mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$). En las muestras tratadas térmicamente el almacenamiento en refrigeración afectó a los valores de humedad, actividad de agua y pH que experimentaron ligeras variaciones durante los 77 días de almacenamiento, apareciendo diferencias significativas al séptimo día para los tres parámetros estudiados. En la Tabla IV.38. se puede observar que las variaciones experimentadas por las muestras tanto en la humedad como en el pH resultaron significativas pero fueron muy pequeñas teniendo en cuenta el largo periodo de almacenamiento al que fueron sometidas. En el caso de la actividad de agua, aunque mostraron oscilaciones durante el almacenamiento, no se apreciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) a los 77 días de almacenamiento respecto al día inicial.

Tabla IV.38. Evolución de los parámetros de humedad, a_w y pH durante el almacenamiento de la fórmula fuente de fibra (F2). Valores promedio (SD).

	t (días)	% Humedad	a_w	pH
Sin tratamiento térmico	0	74,64 (0,07) ^(a)	0,986 (0,001) ^(a)	6,1 (0,0) ^(a)
	7	74,64 (0,07) ^(a)	0,985 (0,001) ^(a)	6,1 (0,0) ^(b)
	14	74,25 (0,03) ^(b)	0,978 (0,001) ^(b)	6,15 (0,02) ^(c)
	21	74,8 (0,1) ^(a)	0,984 (0,001) ^(a)	6,13 (0,01) ^(c)
Con tratamiento térmico	0	70,8 (0,2) ^(a)	0,990 (0,002) ^(a)	6,25 (0,01) ^(a)
	7	71,17 (0,04) ^(b)	0,982 (0,001) ^(d)	6,31 (0,01) ^(b)
	14	71,2 (0,1) ^(b)	0,987 (0,001) ^(b)	6,30 (0,02) ^(b)
	21	69,8 (0,1) ^(c)	0,990 (0,001) ^(a)	6,32 (0,01) ^(b)
	28	70,3 (0,1) ^(d)	0,985 (0,002) ^(c)	6,31 (0,01) ^(b)
	35	69,9 (0,1) ^(c)	0,991 (0,001) ^(a)	6,16 (0,01) ^(d)
	77	70,5 (0,1) ^(e)	0,990 (0,001) ^(a)	6,21 (0,01) ^(c)

(a)(b)(c)(d) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) con el factor tiempo de almacenamiento.

5.4.2. Evolución durante el almacenamiento de la capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua de la formulación fuente de fibra sin tratamiento térmico aumentó ligeramente ($p > 0,05$) a los 7 días de almacenamiento en refrigeración manteniéndose constante este incremento a lo largo de todo el periodo de almacenamiento (21 días), tal y como puede observarse en la Figura IV.26. a).

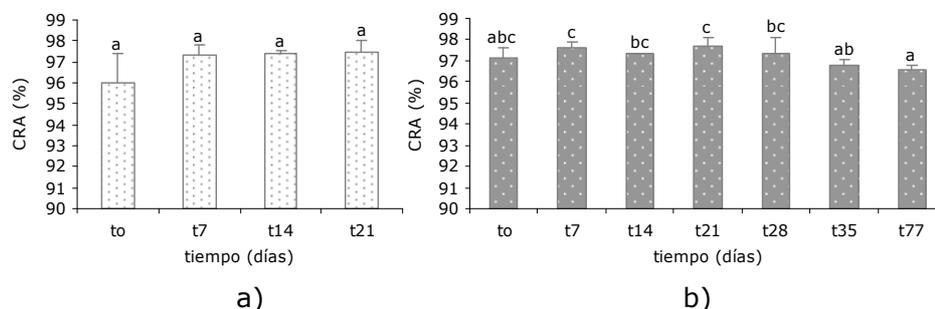


Figura IV.26. Evolución durante el almacenamiento de la capacidad de retención de agua de la fórmula fuente de fibra (F2) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmico (b).

Las muestras tratadas térmicamente (Figura IV.26.b), sin embargo, mostraron mayores variaciones a lo largo del almacenamiento, tal y como ocurría con los parámetros humedad, a_w y pH. Dichas variaciones no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) a los 77 días de almacenamiento con respecto al día inicial y probablemente este hecho fuera debido a la variabilidad de la muestra más que al efecto de la fibra o la MTGasa en la matriz.

5.4.3. Evolución durante el almacenamiento de las propiedades ópticas

En la Tabla IV.39. se muestra la evolución de las coordenadas colorimétricas L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^* durante el almacenamiento de la fórmula fuente de fibra (F2). Se puede observar que durante el almacenamiento de las muestras sin tratamiento térmico los valores de luminosidad (L^*) fueron incrementándose paulatinamente durante los 21 días de almacenamiento mientras que los valores de a^* y b^* sufrieron un descenso, haciéndose significativos dichos cambios a partir del séptimo día de almacenamiento. Las muestras tratadas térmicamente no sufrieron

cambios significativos ($p > 0,05$) en los valores de luminosidad a lo largo de todo el periodo de almacenamiento (77 días), mientras que los valores de a^* y b^* fueron oscilando reflejando un significativo descenso ($p \leq 0,05$) a los 77 días de almacenamiento en refrigeración. En lo que hace referencia al tono, como se observa en la Tabla IV.39, existe un comportamiento diferente en las muestras con o sin tratamiento térmico. Durante el periodo de almacenamiento el tono de las muestras sin tratamiento térmico experimenta un ligero aumento mientras que las que tienen tratamiento térmico desciende ligeramente. El croma en las muestras sin tratamiento térmico disminuye durante el almacenamiento mientras que en las que fueron tratadas térmicamente no existe una variación que permita definir una tendencia.

En conclusión, podemos decir que, los cambios en las propiedades ópticas de las muestras durante el almacenamiento indican que éste no es un parámetro que pueda ser determinante a la hora de definir la vida útil del producto ya que las variaciones en las coordenadas colorimétricas de las muestras no implican cambios de color que den como resultado un producto que tenga un aspecto diferente al de partida.

Tabla IV.39. Evolución de las coordenadas colorimétricas CIEL*a*b*, el tono (h_{ab}^*) y el croma (C_{ab}^*), durante el almacenamiento de la fórmula fuente de fibra (F2). Valores promedio (SD).

t (días)	L*	a*	b*	hab*	Cab*	
Sin tratamiento térmico	0	55,3 (0,4) ^(a)	-1,46 (0,08) ^(a)	9,3 (0,7) ^(a)	99,0 (0,8) ^(a)	9,4 (0,7) ^(a)
	7	56,6 (0,9) ^(b)	-1,70 (0,09) ^(b)	7,2 (0,4) ^(b)	103,3 (0,8) ^(c)	7,4 (0,4) ^(b)
	14	58 (1) ^(c)	-1,3 (0,2) ^(a)	7,1 (0,5) ^(b)	101 (2) ^(b)	7,2 (0,5) ^(bc)
	21	60 (1) ^(d)	-1,3 (0,2) ^(a)	6,8 (0,4) ^(b)	101 (2) ^(b)	7,0 (0,3) ^(c)
Con tratamiento térmico	0	70 (1) ^(a)	-2,5 (0,1) ^(a)	7,5 (0,8) ^(a)	109 (2) ^(ab)	7,9 (0,8) ^(a)
	7	70 (1) ^(a)	-2,29 (0,09) ^(bc)	6,5 (0,4) ^(d)	109 (2) ^(a)	6,9 (0,4) ^(d)
	14	70,0 (0,8) ^(a)	-2,20 (0,09) ^(cd)	6,6 (0,5) ^(d)	108 (1) ^(abc)	7,0 (0,4) ^(d)
	21	68,6 (0,9) ^(a)	-2,14 (0,07) ^(d)	7,0 (0,2) ^(bc)	107,1 (0,9) ^(d)	7,3 (0,2) ^(c)
	28	69,1 (0,8) ^(a)	-2,1 (0,1) ^(d)	6,8 (0,2) ^(cd)	107,5 (1,1) ^(cd)	7,1 (0,1) ^(cd)
	35	69 (1) ^(a)	-2,18 (0,09) ^(cd)	7,3 (0,3) ^(a)	106,7 (1,0) ^(d)	7,6 (0,3) ^(b)
77	69 (1) ^(a)	-2,4 (0,8) ^(b)	7 (1) ^(ab)	108 (6) ^(bc)	8 (1) ^(b)	

(a)(b)(c)(d) Grupos homogéneos establecidos por el ANOVA ($\alpha < 0,05$) con el factor tiempo de almacenamiento.

5.4.4. Evolución durante el almacenamiento de las propiedades mecánicas

La evolución de los parámetros mecánicos experimentada por la muestra fuente de fibra (F2) durante el almacenamiento en refrigeración se muestra en la Figura IV.27. Las muestras sin tratamiento térmico (Figura IV.27.a) experimentaron un incremento lineal y significativo ($p \leq 0,05$) de la dureza a lo largo del almacenamiento alcanzando valores de 3474(22) (g) a los 21 días. La adhesividad, tal y como ocurría durante el almacenamiento de la fórmula base, se redujo significativamente mientras que la cohesividad no experimentó cambios significativos a lo largo de todo el almacenamiento. La elasticidad y la gomosidad se vieron incrementadas significativamente ($p \leq 0,05$) obteniéndose muestras más duras, gomosas y elásticas y menos adhesivas a los 21 días de almacenamiento. En las muestras tratadas térmicamente (Figura IV.27.b) la dureza aumentó significativamente a los 21 días de almacenamiento y posteriormente fue cayendo hasta alcanzar los valores obtenidos en el día 0 (6343(195) g) no mostrando diferencias significativas entre el día 77 y el día 0 de almacenamiento. Los valores de adhesividad oscilaron a lo largo del almacenamiento mostrando un ligero incremento no significativo ($p > 0,05$) al final del almacenamiento. La cohesividad y la gomosidad sufrieron un descenso significativo mientras que la elasticidad aumentó mostrando diferencias significativas a los 7 días y dicho aumento se mantuvo a lo largo del almacenamiento.

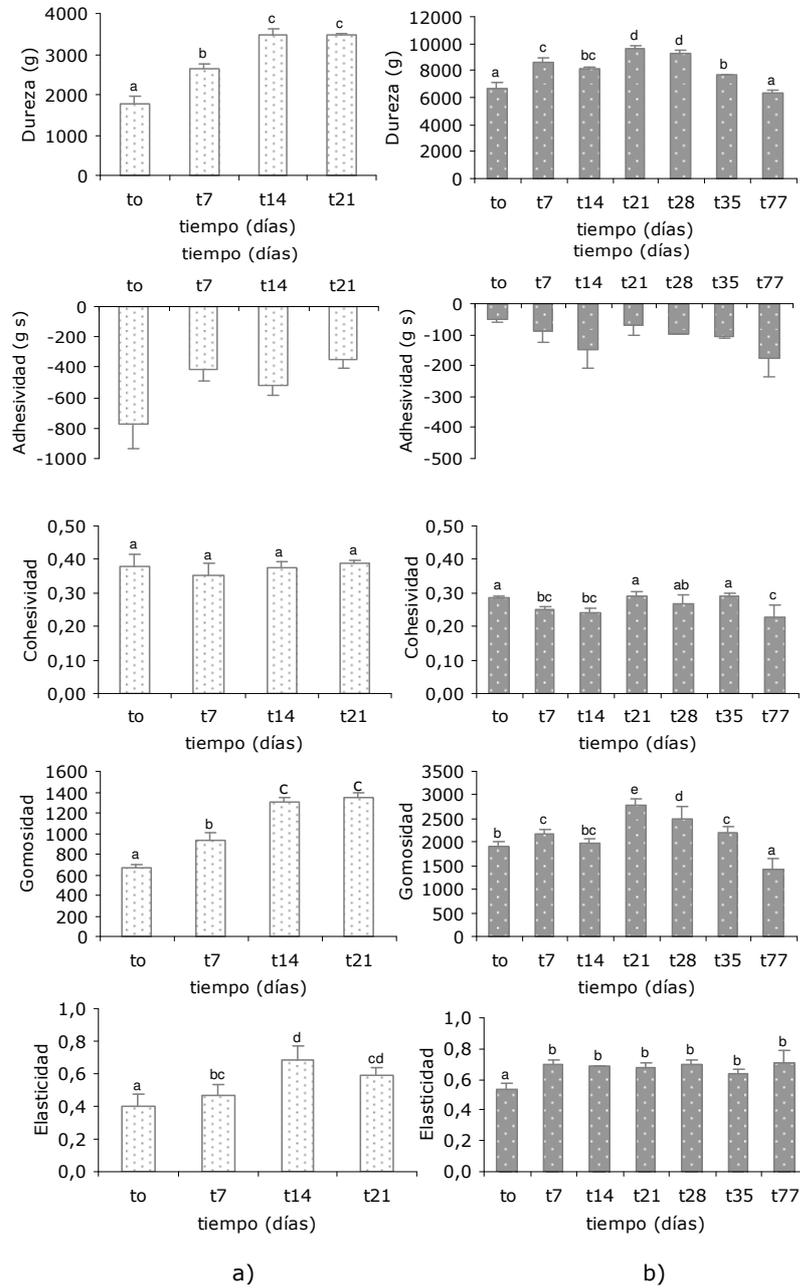


Figura IV.27. Evolución de los parámetros mecánicos (dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad y elasticidad) obtenidos con el ensayo de TPA durante el almacenamiento de la fórmula fuente

de fibra (F2) sin tratamiento térmico (a) y con tratamiento térmico (b).

Tras analizar los resultados correspondientes a los parámetros texturales y al igual que se comenta en el apartado 5.2.4. se puede apreciar que para las muestras sin tratamiento térmico el almacenamiento supone básicamente un aumento de su dureza, gomosidad y pérdida de adhesividad, mientras que para las muestras con tratamiento térmico estos parámetros no presentan cambios que supongan variaciones texturales destacables, ya que éstos son debidos en su mayoría al tratamiento térmico.

5.4.5. Estudio microbiológico

El estudio microbiológico durante el almacenamiento de las muestras con fibra con o sin tratamiento térmico se realizó tal y como se describe en el apartado 4.4. de materiales y métodos.

5.4.5.1. Evolución de la calidad microbiológica de la fórmula fuente de fibra (F2) sin tratamiento térmico durante el almacenamiento en refrigeración

Del mismo modo que se hizo para la fórmula base (F103) se realizó un estudio microbiológico de la fórmula fuente de fibra (F2) envasada a vacío durante 21 días de almacenamiento a 4 °C y se evaluaron los recuentos totales de aerobios mesófilos, enterobacterias, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* tal y como se describe en el apartado 4.4. de materiales y métodos.

Los resultados obtenidos mostraron ausencia de *Salmonella* y de *Staphylococcus aureus* durante todo el estudio de almacenamiento, igual que ocurría en el caso de la fórmula base. Por tanto, siguiendo la legislación española para estos

microorganismos (MSC, 1991), las muestras analizadas cumplían los requisitos legales durante todo el periodo de almacenamiento estudiado.

En la Figura IV.28. se muestra la evolución de los microorganismos mesófilos y enterobacterias de la fórmula fuente de fibra (F2) durante los 21 días de almacenamiento en refrigeración así como los límites establecidos por la legislación española en productos de la pesca frescos para ambos microorganismos.

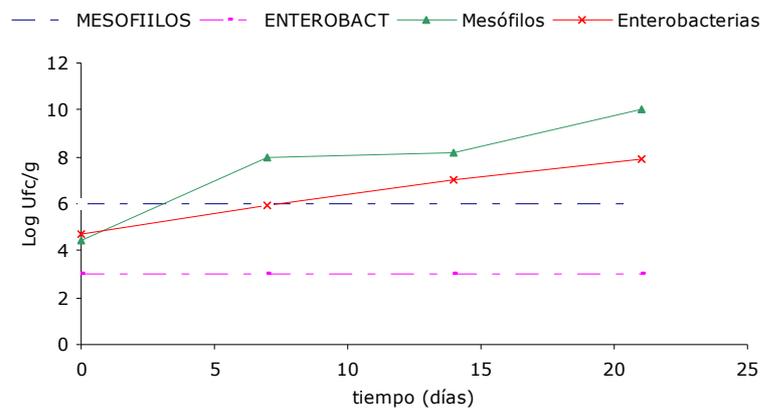


Figura IV.28. Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos y enterobacterias durante el almacenamiento de la fórmula fuente de fibra (F2) sin tratamiento térmico. Las líneas punteadas hacen referencia al valor marcado por la legislación española para cada microorganismo.

Al igual que ocurría en el estudio de almacenamiento de la fórmula base y como se puede observar en la Figura IV.28. el recuento de enterobacterias sobrepasó el límite marcado por la legislación a t0 haciendo inviable, desde un punto de vista microbiológico, la comercialización de éste producto en fresco (sin

tratamiento térmico) en las condiciones de procesado llevadas a cabo. El recuento de microorganismos mesófilos sobrepasó el límite establecido por la legislación a los 4 días de almacenamiento.

A pesar de que, tal y como se vio en el apartado 5.3.2.1. y 5.3.2.2., la adición de fibra provoca un descenso de la actividad de agua (a_w) y un aumento de la capacidad de retención de agua (CRA), los resultados mostraron que el factor limitante en el caso de las muestras frescas es la contaminación inicial que se produce durante la manipulación y formulación del producto por lo que, tal y como se comentó para el caso de la fórmula base (F103), sería conveniente modificar y controlar las condiciones iniciales de procesado para rebajar la carga inicial y que el producto sea viable desde un punto de vista microbiológico. No obstante, hay que hacer constar que el objetivo del estudio de las muestras sin tratamiento térmico se centra en el análisis de las interacciones de los ingredientes y su efecto sobre las características físico-químicas, texturales y sensoriales del producto, más que en obtener un producto comercializable.

5.4.5.2. Evolución de la calidad microbiológica de la fórmula fuente de fibra (F2) con tratamiento térmico durante el almacenamiento en refrigeración

Puesto que las muestras frescas presentaron una carga microbiológica inicial que superaba los límites establecidos por la legislación española para el caso de las enterobacterias, se procedió a realizar el estudio microbiológico durante el almacenamiento en las muestras tratadas térmicamente con el fin de establecer la vida útil microbiológica de la fórmula fuente de fibra (F2) y obtener un producto comercialmente viable desde el punto de vista microbiológico.

En este caso, las muestras fueron sometidas a tratamiento térmico a 80 °C durante 7 minutos y posteriormente fueron envasadas a vacío y almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta el momento de los análisis. El tiempo de almacenamiento en este caso fue de 77 días. Se realizaron recuentos totales de aerobios mesófilos, enterobacterias, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* tal y como se describe en el apartado 4.4. de materiales y métodos.

Recordemos que la legislación española (MSC, 1991) establece para productos de la pesca cocidos un límite máximo de 10^5 ufc/g para el caso de aerobios mesófilos, 10^3 ufc/g para enterobacterias, 10^2 ufc/g para *Staphylococcus aureus* y ausencia de *Salmonella*. Siguiendo la legislación establecida, los resultados obtenidos mostraron una vida útil de al menos 77 días, puesto que, durante dicho periodo de almacenamiento las muestras permanecieron estables y dentro de los límites marcados, no habiendo crecimiento de ninguno de los microorganismos estudiados.

Estos resultados ponen de manifiesto que es posible el desarrollo de un reestructurado precocinado fuente de fibra a base de dorada con unas adecuadas características sensoriales, físico-químicas y microbiológicas.

Cabe decir que los productos de pescado existentes en el mercado de características similares presentan una vida útil de 35 días.

IV.6. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha estudiado y analizado el papel de la transglutaminasa microbiana (MTGasa) y la sal (NaCl) en las características de un producto reestructurado a base de dorada (*Sparus aurata*). Por otra parte se ha analizado el efecto de la adición de diferentes hidrocoloides (konjac glucomanano (KGM), carboximetilcelulosa sódica (CMC) y goma xantana) sobre la matriz proteica del gel de pescado. Para ello se han evaluado los aspectos físico-químicos, texturales, sensoriales y microbiológicos de diferentes formulaciones con y sin tratamiento térmico.

Las conclusiones han sido estructuradas en función de los apartados en los que se dividen los resultados del presente capítulo para una mejor comprensión del estudio.

1. Efecto de la incorporación de cloruro sódico (NaCl) y transglutaminasa microbiana (MTGasa) en las propiedades físico-químicas, ópticas, mecánicas, así como en la capacidad de retención de agua y en la aceptación y vida útil de un producto reestructurado a partir de dorada (*Sparus aurata*)

1.1. Los resultados obtenidos para los parámetros físico-químicos y las propiedades ópticas y mecánicas mostraron que, es necesaria la incorporación de NaCl para la obtención de productos reestructurados con propiedades aceptables utilizando transglutaminasa microbiana como agente "ligante".

1.2. El nivel de NaCl afectó en mayor medida a las propiedades estudiadas que el nivel de MTGasa, produciendo cambios en la dureza, gomosidad, elasticidad, a_w y CRA de las muestras y

separando claramente a las muestras con 1% de NaCl de aquellas que fueron formuladas con 2% de NaCl. La adición de MTGasa produjo una estructura proteica más agregada dando lugar a una red con mayor entramado.

1.3. Las diferencias de color encontradas para las formulaciones estudiadas no suponen en este caso un factor limitante a la hora de escoger una u otra formulación ya que, aunque dichas diferencias en algunos casos fueron significativas, no mostraron ninguna tendencia en función de la cantidad de NaCl o MTGasa añadida.

1.4. La aplicación de tratamiento térmico aumentó la CRA, y la dureza, la gomosidad y la elasticidad del producto reestructurado y redujo la adhesividad con respecto a las muestras sin tratamiento térmico. Por otra parte, el tratamiento térmico produjo un aumento de los valores de L^* , debido a la coagulación proteica, sin apreciarse diferencias significativas por la adición de NaCl ni MTGasa. En las muestras con tratamiento térmico, también se observó que el nivel de NaCl es el factor que tuvo más relevancia en la formulación del producto, afectando en este caso fundamentalmente a la dureza, gomosidad, elasticidad y cohesividad del producto.

1.5. Los resultados obtenidos en el análisis sensorial indicaron que los catadores no encontraron diferencias significativas entre la formulación que no contenía MTGasa y la que contenía 0,3%. Al no aparecer diferencias significativas para ningún atributo estudiado entre las muestras que no llevaban MTGasa (0%) y aquellas que llevaban 0,3%, se decidió fijar la cantidad de MTGasa en la fórmula base en un 0,3%. Al evaluar el contenido en sal por parte

de los catadores, éstos eligieron aquella formulación que contenía 1% de NaCl. En respuesta a estos resultados, se fijó la fórmula base con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa.

1.6. La aplicación de 1% de NaCl junto con 0,3% de MTGasa permite obtener productos reestructurados con buenas propiedades texturales y atributos funcionales y sensoriales aceptables.

2. Cambios en la humedad, el pH, la a_w , la CRA, el color, las propiedades mecánicas y microbiología de la fórmula base (F103), durante 20 días de almacenamiento en refrigeración sin tratamiento térmico y 56 días para las muestras con tratamiento térmico

2.1. En las muestras sin tratamiento térmico el almacenamiento supuso un ligero pero significativo descenso de la humedad y la a_w y un aumento de la CRA, así como un aumento de la dureza, gomosidad y pérdida de adhesividad. La luminosidad (L^*) de los reestructurados se incrementó ligeramente a lo largo del periodo de conservación. En las muestras con tratamiento térmico el almacenamiento produjo un descenso de humedad y un aumento significativo del pH y de la a_w mientras que la CRA no se vió afectada en este caso. Los parámetros de textura se vieron afectados por el almacenamiento de la misma manera que las muestras sin tratamiento térmico.

2.2. En las muestras sin tratamiento térmico el recuento de enterobacterias se mostró superior al límite establecido en la legislación el primer día de formulación debido, probablemente, a la contaminación producida durante la manipulación y formulación del

producto, haciendo que el producto sin tratamiento térmico no sea viable comercialmente desde el punto de vista microbiológico. Las muestras tratadas térmicamente podrían ser viables desde el punto de vista microbiológico durante un periodo de 27 días, siendo los microorganismos aerobios mesófilos los limitantes de la vida útil del producto.

3. Efecto de la incorporación de konjac glucomanano y carboximetilcelulosa en las propiedades físico-químicas, ópticas, mecánicas, así como en la capacidad de retención de agua y en la aceptación y vida útil de un producto reestructurado a partir de dorada con un 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa con y sin tratamiento térmico

3.1. Tanto la presencia de fibra como el tipo de fibra adicionado a la formulación afectó de manera significativa a las propiedades físico-químicas y mecánicas del gel de pescado formado con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa.

3.2. La presencia de fibra (KGM o CMC) afectó en mayor medida a las propiedades de cohesividad, elasticidad, CRA y adhesividad, mientras que el tipo de fibra adicionada afectó más a las propiedades de dureza, a_w , gomosidad y humedad.

3.3. La adición de 1% de KGM produjo un descenso significativo de los valores de humedad, a_w y pH y un mayor porcentaje de CRA tanto en las muestras frescas como tratadas térmicamente respecto a la muestra control, mostrando productos con una apariencia y textura adecuada.

3.4. La presencia de CMC no supuso una mejora del producto por lo que para desarrollar un producto que pueda ser considerado como fuente de fibra y debido a la limitación legal en el uso de KGM se adicionó goma xantana a la formulación.

3.5. En las muestras sin tratamiento térmico, un aumento en la cantidad de KGM adicionada a la formulación, así como la adición de 1% de CMC se tradujo en un aumento de los valores de "blancura" de las muestras. En las muestras tratadas térmicamente, a mayor cantidad de KGM adicionada se obtuvieron menores valores de L^* , a^* y de b^* . El CMC, sin embargo, mantuvo valores similares de las coordenadas de color a los obtenidos para la muestra control.

4. Desarrollo de una formulación de dorada con 1% de NaCl y 0,3% de MTGasa y la adición de 1% de KGM y 1,5% de goma xantana que puede ser considerada como un producto "fuente de fibra"

4.1. La formulación fuente de fibra (konjac+xantana) presentó propiedades diferentes a la muestra control y a la muestra con KGM. La sinergia entre el konjac glucomanano y la goma xantana permitió formar un gel con menor actividad de agua y mayor capacidad de retención de agua

4.2. La presencia de KGM y xantana provocó una reducción de los valores de L^* , a^* y b^* en las formulaciones sin tratamiento térmico. En las muestras tratadas térmicamente no se apreciaron cambios significativos en las coordenadas colorimétricas respecto a la muestra control.

4.3. La adición de KGM y goma xantana provocó un aumento significativo en la dureza, la adhesividad y la gomosidad de las muestras sin tratamiento térmico, mientras que la cohesividad no mostró variaciones. En las muestras tratadas térmicamente se produjo una pérdida de cohesividad y de gomosidad.

4.4. El análisis sensorial puso de manifiesto que entre la formulación con 1% de KGM y la formulación con 1% de KGM+1,5% de xantana los catadores sólo encontraron diferencias significativas para el atributo dureza. Los catadores apreciaron la presencia de fibra pero no fueron capaces de diferenciar entre la fórmula con 1% de KGM y la fórmula fuente de fibra (1% de KGM+1,5% de xantana), excepto en el atributo dureza.

4.5. En resumen, se puede decir que, la adición de fibra a la formulación supone cambios en algunos parámetros relevantes del producto como la textura, a su vez incrementa la capacidad de retención de agua y disminuye su a_w . Estos cambios pueden ser muy interesantes desde el punto de vista tecnológico y no suponen un impedimento para la aceptación del producto por parte del consumidor, lo cual podría suponer una ventaja nutricional y de marketing.

5. Cambios en la humedad, el pH, la a_w , la CRA, el color, las propiedades mecánicas y microbiología de la fórmula fuente de fibra, durante 21 días de almacenamiento en refrigeración sin tratamiento térmico y 77 días para las muestras con tratamiento térmico

5.1. En las muestras sin tratamiento térmico el almacenamiento supuso un ligero pero significativo descenso de la humedad y la actividad de agua y un ligero aumento del pH y la CRA. Los valores de luminosidad (L^*) también se incrementaron paulatinamente, mientras que los valores de a^* y b^* sufrieron un descenso. En cuanto a las propiedades mecánicas, el almacenamiento produjo un aumento de la dureza y la gomosidad y pérdida de adhesividad.

5.2. En las muestras tratadas térmicamente el almacenamiento en refrigeración afectó a los valores de humedad, actividad de agua y pH que experimentaron ligeras variaciones durante los 77 días de almacenamiento. No se apreciaron variaciones significativas en la capacidad de retención de agua ni en la luminosidad de las muestras a lo largo del periodo de almacenamiento, mientras que los valores de a^* y b^* reflejaron un significativo descenso a los 77 días. Los parámetros texturales no experimentaron cambios destacables.

5.3. Por lo que respecta al estudio microbiológico de las muestras sin tratamiento térmico, el recuento de enterobacterias sobrepasó el límite marcado por la legislación a t_0 haciendo inviable, desde un punto de vista microbiológico la comercialización de este producto sin tratamiento térmico. Para las muestras con tratamiento térmico la vida útil fue, al menos, de 77 días, puesto que durante dicho

periodo de almacenamiento las muestras permanecieron estables y dentro de los límites marcados por la legislación, no habiendo crecimiento de ninguno de los microorganismos estudiados.

5.4. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que es posible el desarrollo de un reestructurado precocinado fuente de fibra a base de dorada (*Sparus aurata*) con unas adecuadas características sensoriales, físico-químicas y microbiológicas.

CAPÍTULO V.
APLICACIÓN DE BIOCONSERVANTES PARA
PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DEL FILETE DE
DORADA (*Sparus aurata*)

V. APLICACIÓN DE BIOCONSERVANTES PARA PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DEL FILETE DE DORADA (*Sparus aurata*)

V.1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microbiología del pescado

Como consecuencia de su composición química y de la reacción poco ácida de su carne, el pescado constituye un alimento altamente perecedero, debido a que sufre procesos autolíticos de degradación rápida y un acelerado crecimiento microbiano. El pescado se puede deteriorar por la acción de enzimas endógenas y el desarrollo de una microbiota de contaminación variada. El descenso del pH después de la muerte es escaso y depende de las condiciones de la captura, ya que las reservas de glucógeno disminuyen en mayor o menor grado como consecuencia, por ejemplo, de la resistencia que pone el pez a ser capturado. Por lo general, el pH del pescado, inmediatamente después de su captura, es 7 luego desciende a 6,2-6,5, para volver a subir a 6,6-6,7. Esto contribuye a la inestabilidad del pescado después de la muerte, ya que en estos valores de pH no se inhibe el desarrollo microbiano (Pascual y Calderón, 2000).

1.1.1. Microbiología del tratamiento primario

El músculo y los órganos internos del pescado sano recién capturado suelen ser estériles, pero la piel, las agallas y el tracto alimentario contienen un número importante de bacterias. Por eso, cualquier daño causado al pescado por las redes, anzuelos, etc. que desgarran la piel protectora del pescado, supondrá un foco de infección, ya que la microbiota se extenderá y se multiplicará en otros tejidos donde existen sustancias nutritivas adecuadas y un pH

relativamente elevado que favorece el desarrollo de dicha flora. Las operaciones como el fileteado y el troceado, aumentan la extensión de la superficie con respecto al volumen del producto, por tanto, aumentan la rapidez de la alteración. La refrigeración retarda un poco la aparición del desarrollo microbiano pero no la suprime, la biota contaminante es psicrófila (*Pseudomonas*) y continúa desarrollándose incluso a -5 °C. La alteración del pescado depende de distintos factores:

- Especie: se alteran más rápidamente aquellas especies cuyo cuerpo tiene forma aplanada que aquellas que tienen el cuerpo cilíndrico. Debido a que en las primeras la rigidez cadavérica transcurre con mayor rapidez.
- Condiciones del pescado en el momento de su captura: una larga agonía provoca un mayor consumo de glucógeno, cuya falta acelera la aparición de fenómenos de alteración. Los pescados que han sido capturados repletos de alimentos, se alteran con mayor facilidad que aquellos cuyo tubo intestinal está vacío.
- Tipo de biota contaminante: si la contaminación corporal e intestinal del pescado es alta y la que se instaura después de su captura también es elevada, la alteración será mayor y más rápida.
- Temperatura: La refrigeración impide o retarda la multiplicación de las bacterias. El pescado se debe refrigerar lo más rápidamente posible hasta una temperatura comprendida entre 0 y -1 °C.

1.1.2. Microbiología del pescado fresco

Varios son los factores que coadyuvan en la caducidad del tejido muscular de los pescados. La microbiota del pescado vivo depende de la del ambiente natural en el que vive, las especies microbianas aisladas en el intestino serán las mismas del ambiente de donde se ha criado. Por norma general las zonas de litoral son

las más contaminadas al contener restos de desechos humanos y animales dándose el riesgo de que puedan contener biota patógena de transmisión fecal. La contaminación posterior a la captura del pescado se produce en las distintas fases de captura y almacenamiento o transformación debido principalmente a una mala higiene (Pascual y Calderón, 2000). La biota contaminante habitual de pescado pertenece a varios géneros, sobre todo psicrótrofos: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Sarcina*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Vibrio*, *Clostridium*, mohos y levaduras (Chouliara et al., 2004). El mecanismo de penetración de la biota microbiana en el músculo es distinto para peces planos y redondos. En los primeros se realiza a través de la piel y se favorece por las heridas que se pueden producir durante la captura; en los segundos el acceso se produce a través del intestino.

Como gérmenes de origen no marino y que pueden contaminar el pescado se encuentran: *S. Aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*. En la calidad microbiológica del pescado hay que tener en cuenta dos aspectos importantes: el sanitario y el económico. Por un lado los pescados presentan riesgos de distinta consideración para el consumidor de acuerdo con su naturaleza, hábitat y transformaciones, por lo que es evidente que el hombre debe estar protegido mediante el control de la presencia de microorganismos patógenos. Respecto al aspecto económico, es claro que los pescados son productos perecederos y que se alteran fácilmente. Su alteración se debe a una flora no patógena pero que sí produce pérdidas económicas (Pascual y Calderón, 2000; González- Fandos et al., 2005).

1.2. Conservación de alimentos

1.2.1. Fundamentos de conservación de alimentos

La causa principal del deterioro de los alimentos es el desarrollo y proliferación de microorganismos, que generalmente no se encuentran en el interior de los tejidos de las plantas y de los animales sanos pero siempre están presentes y dispuestos a invadirlos si hay una rotura en la piel, o si ha sido debilitada por enfermedad o muerte. Así mismo, hasta el momento de la cosecha o del sacrificio, las reacciones enzimáticas, producidas por las enzimas naturales de los alimentos, son controladas y equilibradas en la planta o en el animal que vive normalmente pero a partir de ese momento dicho equilibrio se pierde. Si los alimentos deben conservarse solo durante un corto periodo de tiempo se dispone de dos posibilidades:

- Mantener el alimento vivo el mayor tiempo posible.
- Cuando no es posible mantener vivo el alimento, hay que cubrirlo y enfriarlo, con lo cual se retardan los factores de descomposición pero solo durante un tiempo muy breve.

Para la conservación durante un periodo más largo, que requieren la mayoría de nuestros alimentos, hace falta otras precauciones cuya finalidad es, generalmente, la inactivación o control de los microorganismos. El alimento, o sustrato, determina los microorganismos que pueden desarrollarse. Si se conocen las características del alimento se puede predecir la microbiota que es posible que crezca en él (Casp y Abril, 1999).

1.2.2. Curva de crecimiento microbiano

Si analizamos el crecimiento microbiano en el tiempo, éste describe una típica curva que, tal como se muestra en la Figura V.1., puede dividirse en diversas fases: fase de latencia, fase de

crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase logarítmica de muerte (Zúñiga, 2002).

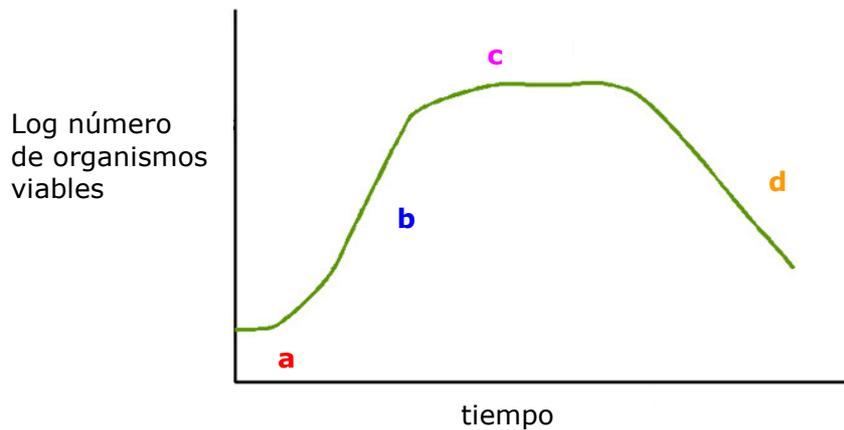


Figura V.1. Esquema de la curva de crecimiento microbiano.

a) Fase de latencia.

Se produce inmediatamente después de inoculado el cultivo, las células se adaptan a las nuevas condiciones del medio, por lo que su duración dependerá del estado fisiológico de las células vivas y de la calidad del cultivo, es decir, de las condiciones que presente el medio en el que se van a desarrollar los microorganismos como temperatura, pH y composición óptima para su crecimiento (Zúñiga, 2002). Si un cultivo que crece exponencialmente es inoculado al mismo medio bajo las mismas condiciones de crecimiento no se observa la fase de latencia y el crecimiento exponencial continúa a la misma velocidad. Sin embargo, si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase de latencia, aún cuando las células del inóculo estén vivas. Esto se debe a que las células generalmente agotan diferentes coenzimas esenciales u

otros constituyentes celulares y se requiere de cierto tiempo para su resíntesis. También se presenta un retraso en el crecimiento cuando el inóculo está formado por células dañadas (pero no muertas) por tratamientos con calor, radiación o sustancias químicas, debido al tiempo necesario para que las células puedan reparar dicho daño. La fase de latencia también se observa cuando una población se transfiere de un medio de cultivo rico a uno pobre. Esto sucede debido a que para que continúe el crecimiento en un medio de cultivo en particular es necesario que las células tengan un complemento íntegro de enzimas para la síntesis de los metabolitos esenciales que no están presentes en dicho medio. Cuando se les transfiere a un medio diferente, se requiere cierto tiempo para la síntesis de nuevas enzimas.

Durante esta fase sólo se produce aumento del tamaño celular, y no del número de células.

b) Fase de crecimiento exponencial o logarítmico.

Es una fase en la que las células se encuentran en plena multiplicación a una velocidad que es la máxima para el juego de condiciones existentes por no existir limitación de nutrientes (Zúñiga, 2002). La mayor parte de los organismos unicelulares crecen exponencialmente. La velocidad de crecimiento exponencial varía mucho de un organismo a otro. Las condiciones ambientales, tiempo, composición del medio de cultivo, afectan a la velocidad de crecimiento exponencial así como las características del microorganismo.

c) Fase estacionaria.

El crecimiento celular se detiene, porque los nutrientes indispensables se agotan o algún producto de desecho fabricado en

el medio llega a un nivel en el que es inhibitor y cesa el crecimiento exponencial. Esta fase se caracteriza porque no hay incremento o decremento en el número de células o masa, es decir, la concentración de microorganismos vivos es constante, el número de los microorganismos producidos es igual al número de microorganismos muertos. La duración de la fase estacionaria está condicionada por la resistencia de los microorganismos a estos factores externos (Zúñiga, 2002). En la fase estacionaria los microorganismos son fisiológicamente activos y viables.

d) Fase logarítmica de muerte.

Si la incubación continúa después que una población alcanza la fase estacionaria, las células no pueden mantener la actividad fisiológica y se produce autólisis (Zúñiga, 2002). La fase logarítmica de muerte sigue un trazado similar a la fase de crecimiento exponencial, pero de signo inverso, caracterizado porque para cada intervalo de tiempo mueren la mitad de los microorganismos presentes. Es más lenta que la fase de crecimiento exponencial. La velocidad de muerte depende de la resistencia de los microorganismos. Aunque se produzca la muerte de muchos microorganismos nunca se llega a la muerte total ya que sobreviven los más resistentes.

1.2.3. Factores que influyen en la actividad microbiana

Los principales factores de la composición de todo alimento que influyen en la actividad microbiana son (Casp y Abril, 1999):

- El pH. La acción del pH sobre el crecimiento de los microorganismos tiene lugar a tres niveles: el medio, puesto que la disponibilidad de ciertos nutrientes en el medio de cultivo sufre modificaciones en función del equilibrio iónico; la permeabilidad de

la membrana, que se ve afectada por las variaciones en la concentración de iones H^+ y OH^- y la actividad metabólica, las reacciones enzimáticas presentan un óptimo de actividad por encima o por debajo del cual su cinética sufre cambios, por lo tanto toda variación del pH citoplasmático implica una variación de la actividad enzimática, y en consecuencia, del crecimiento del microorganismo.

Cada microorganismo tiene un pH mínimo, un pH óptimo y un pH máximo de crecimiento. En general, las levaduras y los mohos toleran mejor la acidez que las bacterias. Por lo tanto, los alimentos cuyo pH es bajo (valores inferiores a 4,5) no son alterados fácilmente por las bacterias, siendo más sensibles a la alteración por levaduras y mohos. El pH de los alimentos depende no solo de la cantidad de sustancias ácidas y básicas que contenga, sino también de la capacidad tampón del producto, que generalmente está asociada a la concentración de proteínas (Mossel et al., 2003; Frazier y Westhoff, 1993; Casp y Abril, 1999).

- La humedad. Los microorganismos necesitan agua para su crecimiento, que utilizan de dos formas, como solvente de nutrientes para permitir su transporte y disponibilidad en el citoplasma, y como agente químico que interviene en las reacciones hidrolíticas que dan lugar a monómeros, necesarios para la síntesis microbiana y para las reacciones energéticas.

- La actividad de agua (a_w). Indica la disponibilidad de agua, de un medio determinado, para las reacciones químicas, bioquímicas y para las transferencias a través de membranas semipermeables. Toda disminución de la actividad de agua afecta al crecimiento bacteriano, la mayor parte de las bacterias presentan un

crecimiento óptimo alrededor de 0,990-0,995. En alimentos con a_w baja (0,61-0,85) las alteraciones microbianas más frecuentes son producidas por mohos (Mossel et al., 2003; Frazier y Westhoff, 1993; Casp y Abril, 1999).

- El potencial de óxido-reducción. El potencial de óxido-reducción, o poder oxidante y reductor, del propio alimento, influye en el tipo de microorganismo que se desarrollará en él y, por lo tanto, en las modificaciones que se producirán. En función de sus exigencias en oxígeno y/o en su toxicidad, los microorganismos se clasifican en:

- Aerobios estrictos (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, etc.) cuando necesitan oxígeno libre, es decir, necesitan oxígeno como aceptor final de electrones, no tienen la posibilidad de utilizar una vía fermentativa.

- Anaerobios estrictos (*Clostridium*, *Bacteroides*, *Peptococcus*, etc.) cuando crecen mejor en ausencia de oxígeno libre, presentan obligatoriamente un metabolismo fermentativo.

- Aerobios facultativos (Enterobacterias, *Staphylococcus*, etc.), que pueden desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno.

La disminución del contenido de oxígeno en la atmósfera tiene como consecuencia la ralentización de la respiración y por tanto aumenta la vida útil de los productos siempre que se elija convenientemente (Mossel et al., 2003; Frazier y Westhoff, 1993; Casp y Abril, 1999).

- La temperatura. La temperatura a la que se encuentre el alimento es uno de los factores más importantes por su influencia en el crecimiento de los microorganismos, determina el estado físico del agua en un determinado medio y, por tanto, su mayor o menor disponibilidad para el crecimiento de los microorganismos, la

temperatura actúa, además, sobre la velocidad de las reacciones químicas y bioquímicas. Los microorganismos se clasifican en tres grandes grupos en función de la temperatura:

- Psicrótrofos y psicrófilos: Los psicrófilos son gérmenes adaptados al frío, se desarrollan a 0 °C con un óptimo de crecimiento comprendido entre 15 y 20 °C. Los psicrótrofos son capaces de adaptarse y desarrollarse a temperaturas próximas a 0 °C, pero tienen un óptimo de crecimiento entre 25 y 35 °C, lo que les aproxima a los mesófilos. Su metabolismo es lento y son poco competitivos con otros cuando aumenta la temperatura. Los psicrótrofos son los microorganismos dominantes en todos los alimentos refrigerados. La mayor parte de las levaduras y de los mohos son psicrótrofos. Estos microorganismos raramente son patógenos.

- Mesófilos: Se multiplican a temperaturas entre 20 y 45 °C, con un óptimo de crecimiento a 37 °C, sus tasas de crecimiento son elevadas y la duración de su proliferación es relativamente corta. Las principales especies de bacterias se incluyen en este grupo. Se pueden encontrar en alimentos almacenados a temperatura ambiente o en alimentos refrigerados cuando se ha roto la cadena del frío.

- Termófilos: Son capaces de desarrollarse a temperaturas elevadas, entre 45 y 65 °C, con un óptimo a 55 °C. Presentan una tasa de crecimiento muy elevada pero con una duración corta. Pueden encontrarse en el agua, aire y suelo. El descenso de la temperatura tiene como efecto esencial la reducción global de la actividad metabólica de los órganos vegetales y animales. Este efecto del frío se traduce en una menor degradación de las reservas y en una menor producción de calor, por lo tanto aumentará la longevidad de los productos (Casp y Abril, 1999).

- La presencia de sustancias inhibidoras. Son moléculas que poseen un poder bacteriostático y/o bactericida. Existe una amplia gama de sustancias, que desarrollan una acción inhibidora, tanto por su composición química como por los mecanismos de actuación. Se encuentran en estado natural en los tejidos animales y vegetales y se pueden producir también por fermentación. Pueden ser, además, añadidas por el hombre para la conservación de los alimentos (Frazier y Westhoff, 1993; Casp y Abril, 1999).

1.2.4. Procedimientos utilizados en la conservación de alimentos

La descomposición microbiana de los alimentos se evitará si se destruyen, o se eliminan, todos los microorganismos que producen alteraciones y se evita que se vuelvan a contaminar. Ahora bien, los microorganismos son la principal causa del deterioro de los alimentos pero no la única, por lo tanto, el hecho de detener la multiplicación de los microorganismos no necesariamente evita su descomposición. Algunos de los procedimientos utilizados para regular la actividad de los microorganismos son eficaces tanto frente a la actividad enzimática existente en el alimento como frente a las reacciones químicas. Pero otros procedimientos como la desecación o el empleo de temperaturas bajas, permiten que continúe la descomposición natural del alimento si no se adoptan precauciones especiales (Casp y Abril, 1999).

Por lo tanto en los procedimientos de conservación de los alimentos se deberá:

- Prevenir o retrasar la actividad microbiana
- Prevenir o retardar la descomposición de los alimentos destruyendo o inactivando sus enzimas y previniendo o retardando las reacciones puramente químicas.

- Prevenir las lesiones debidas a insectos, roedores, causas mecánicas, etc.

Los procedimientos utilizados para la conservación de alimentos se dirigen fundamentalmente al control de los microorganismos, por lo tanto se basan en la intervención sobre los factores que afectan a su actividad: pH, necesidad de agua, potencial de óxido-reducción, sustancias inhibidoras y temperatura. Pero en todos los casos hay que tener en cuenta que cuando en el alimento existe un número inicial de microorganismos reducido, su conservación es más fácil que cuando su número inicial es elevado (Casp y Abril, 1999).

1.2.5. Principales técnicas de conservación de alimentos

En la Tabla V.1. se resumen los principales métodos de conservación de los alimentos así como su acción sobre los microorganismos y su forma de actuación (Frazier y Westhoff, 1993; Casp y Abril, 1999).

Tabla V.1. Principales métodos de conservación de los alimentos.

ACCIÓN SOBRE LOS MICROORGANISMOS	FORMA DE ACTUACIÓN	MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS
DESTRUCCIÓN	Por acción del calor	Pasteurización Esterilización
	Por radiaciones ionizantes	Irradiación
	Por acción de antisépticos	Alcohol Ácidos Conservadores químicos
	Por acción mecánica	Altas presiones
	Por acción mixta: calor-mecánica	Cocción-extrusión
	Por utilización de bajas temperaturas	Refrigeración Congelación
EFFECTO BARRERA	Por utilización de atmósferas pobres en O ₂	Vacío Gases inertes Atmósferas controladas
	Por reducción del contenido de agua	Deshidratación Liofilización Concentración
	Protección por incorporación y recubrimiento con inhibidores	Salazón Inmersión en salmuera Recubrimientos con materias grasas (confits...) Recubrimientos con azúcar (frutas escarchadas) Inmersión en ácidos (vinagre) Fermentación (autoinhibición)
ELIMINACIÓN	Por separación física	Filtración esterilizante Ultrafiltración

1.2.6. Necesidad de nuevas técnicas de conservación

Actualmente la investigación en industria alimentaria se dirige a reemplazar las técnicas de preservación de alimentos tradicionales (tratamientos térmicos intensos, salado, acidificación, desecación y conservación química) por nuevas técnicas que se adapten mejor al tipo de alimentos demandados ahora por el consumidor: de alta calidad, nutritivos, naturales, seguros pero poco procesados, libres de conservantes, de gran vida útil y fáciles de preparar. Además, y

cada vez más, el consumidor percibe los alimentos frescos como más saludables que los procesados térmicamente (Ahvenainen, 1996).

Un método de conservación "ideal" debería poseer las siguientes características (Morata, 2008):

- Incrementar la seguridad y durabilidad del producto inactivando microorganismos patógenos y alterantes.
- No debe modificar los atributos organolépticos y nutricionales del alimento.
- No debe dejar residuos.
- Debe ser barato y de fácil aplicación.
- No debe tener nada objetable por consumidores y legisladores.

La mayoría de los procedimientos de conservación inhiben agentes o procesos de deterioro. Algunas tecnologías (refrigeración) mantienen la frescura del producto, sin embargo otras como la reducción de la a_w (deseccación) o la modificación del pH, la cambian notablemente. Ninguna técnica es capaz de garantizar la completa seguridad del alimento, ya que variaciones en las condiciones de preservación (rotura de la cadena del frío, rehidratación, etc.) pueden suponer el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes. Actualmente, los tratamientos térmicos por calor (pasterización, esterilización, etc.) son los únicos que operan por inactivación y que se usan de forma mayoritaria en la industria alimentaria. La inactivación de microorganismos y enzimas permite la obtención de alimentos estables y seguros. Los tratamientos térmicos poseen la mayoría de las características de un método ideal de preservación de alimentos. Sin embargo, en algunos alimentos la gran termotolerancia de enzimas y microorganismos (especialmente

esporas bacterianas) hace necesaria la aplicación de tratamientos térmicos extremos que afectan a las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento. Los avances en tecnología han permitido optimizar el procesado térmico, consiguiendo una eficacia máxima frente a microorganismos contaminantes y con un deterioro mínimo de la calidad del alimento (pasteurización HTST o esterilización UHT) (Lavigne et al., 1989). Aún así, los alimentos procesados por modernas tecnologías térmicas, aún carecen del flavor y textura de los productos frescos. Por tanto, la industria busca alternativas a la conservación por calor como medio principal de inactivar microorganismos patógenos y alterantes.

En las dos últimas décadas, la demanda por parte del consumidor de alimentos de alta calidad, microbiológicamente seguros y estables ha despertado un creciente interés en las técnicas de preservación no-térmicas capaces de inactivar microorganismos y enzimas (Mertens y Knorr, 1992; Barbosa-Cánovas et al., 1998; Raso y Barbosa-Cánovas, 2003). En el procesado no-térmico la temperatura del alimento se mantiene por debajo de la temperatura normalmente utilizada en tratamientos térmicos por lo que es esperable una mínima degradación de su calidad. Sin embargo, las tecnologías no-térmicas además de mejorar la calidad de los alimentos deben igualar o mejorar los niveles de seguridad de otros tratamientos convencionales a los que quieran sustituir.

1.3. Bioconservación

La tendencia de los consumidores a exigir alimentos de gran calidad, más naturales y sobretodo más seguros, ha obligado a los fabricantes a la búsqueda de productos de origen biológico alternativos a los tradicionales que se usan en la conservación de

alimentos. Es así como surge el término de "Bioconservación" que se refiere a una extensión de la vida útil y a un incremento de la seguridad de los alimentos utilizando la microflora natural y/o sus productos antibacterianos (Garriga et al., 2001).

El uso de cultivos iniciadores para dirigir las fermentaciones industriales está ampliamente difundido. Así mismo, es de sobra conocido que las bacterias ácido lácticas poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Esto ha llevado a que durante los últimos años hayan aparecido en el mercado numerosos productos que bajo diferentes denominaciones (bioconservadores, cultivos protectores, cultivos probióticos) proponen formas de conservación alternativas a las tradicionales o bien, proporcionan a los alimentos la cualidad de ejercer un efecto beneficioso para la salud paralelamente a su aporte nutritivo.

En la Tabla V.2. se intenta definir cada tipo de cultivo y enumerar sus principales aplicaciones así como establecer las principales diferencias entre ellos (Mata y Del Cubillo, 2000).

Tabla V.2. Tipos de cultivos y sus funciones.

TIPOS	COMPOSICIÓN	FUNCIONES
CULTIVOS INICIADORES	Microorganismos viables.	<p>Marcan las pautas en los productos fermentados.</p> <p>Modifican las propiedades sensoriales del producto.</p> <p>Ejercen efecto conservador sobre microorganismos patógenos o alterantes.</p>
BIOCONSERVADORES	Compuestos antimicrobianos purificados o no. No contienen microorganismos viables.	Acción antimicrobiana frente a microorganismos patógenos o alterantes.
CULTIVOS PROTECTORES	Microorganismos viables.	<p>No modifican las características sensoriales.</p> <p>Acción antimicrobiana frente a microorganismos patógenos o alterantes.</p>
CULTIVOS PROBIÓTICOS	Microorganismos viables.	Ejercen beneficios específicos para la salud.

1.3.1. Cultivos iniciadores o starters

Los cultivos iniciadores son microorganismos que se presentan en estado puro o mixto, seleccionados de acuerdo con sus propiedades específicas, que se agregan a los alimentos con objeto de mejorar su aspecto, aroma y sabor. En estos alimentos, además de marcar las pautas de la fermentación, instaurándose como flora predominante y excluyendo la flora indeseable, ejercen efecto conservador frente a microorganismos patógenos y alterativos. Aunque el mecanismo de acción inhibitor no se conoce exactamente, probablemente es debido a la acción simultánea de varios factores como son el bajo pH, la producción de ácidos

orgánicos y peróxido de hidrógeno, la excreción de antibióticos y bacteriocinas al medio y la competencia por los nutrientes. Así se reducen los riesgos higiénicos y de fabricación por deficiencias de origen microbiano y se consigue estandarizar el proceso y la calidad de los productos elaborados (Mata y Del Cubillo, 2000).

Los cultivos iniciadores comerciales deben cumplir una serie de requisitos que son indispensables para que su aplicación genere los beneficios esperados. Estos requisitos se pueden agrupar en tres principios básicos (Mata y Del Cubillo, 2000):

1. Seguridad: Los microorganismos utilizados como iniciadores no deben poseer actividad tóxica ni patógena y las preparaciones deben elaborarse con la máxima higiene y estar libres de cualquier tipo de contaminante, biológico o químico.
2. Competitividad tecnológica: Los microorganismos inoculados deben predominar sobre la flora espontánea que posea el alimento y desarrollar su actividad metabólica.
3. Viabilidad económica: El empleo del cultivo iniciador debe ser viable económicamente y de manipulación fácil; además su almacenamiento en congelación o liofilización no debe afectar a las propiedades de la cepa ni ocasionar pérdidas de su actividad.

1.3.2. Cultivos protectores

Los cultivos protectores se definen como organismos cuya principal función es la supresión de microorganismos indeseables y que, contrariamente a los cultivos iniciadores, modifican escasamente las propiedades sensoriales del producto. El empleo de estos cultivos estaría indicado para productos frescos o con un corto periodo de maduración. El principal grupo microbiano empleado como cultivo protector son las bacterias ácido lácticas y aunque la finalidad de su uso es la de ejercer una acción

antimicrobiana frente a microorganismos alterantes o patógenos, a diferencia de los bioconservadores, están constituidos por microorganismos viables (Mata y Del Cubillo, 2000).

Las propiedades deseables de los cultivos protectores se encuentran resumidas a continuación (Vignolo de Bartolucci y Castellano, 2004):

1. Ausencia de riesgos para la salud
 - Ausencia de patógenos
 - Ausencia de toxinas
 - Ausencia de aminas biógenas o metabolitos dañinos
2. Producción de efectos beneficiosos en el producto
 - Adaptación al producto/sustrato
 - Confiabilidad en la actividad protectora
 - Previsibilidad de la actividad metabólica (producción de ácido láctico/no producción de gas).
 - Competencia frente a organismos autóctonos
 - Actividad enzimática específica
3. Ausencia de efectos sensoriales negativos
4. Función "indicadora" de abuso de temperatura

Dentro de este grupo de cultivos protectores se pueden incluir los denominados cultivos bacteriocinógenos, es decir cultivos compuestos de cepas capaces de sintetizar bacteriocinas cuando se dan las condiciones adecuadas. La utilización de estos cultivos tiene tres fines diferentes: mejorar la competitividad de la cepa iniciadora, prevenir el crecimiento de patógenos y actuar como cultivo protector, evitando las alteraciones de origen microbiano (Mata y Del Cubillo, 2000).

1.3.3. Cultivos probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del huésped (Schrezenmeir y Vrese, 2001). La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias; por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales (Palou y Serra, 2000).

Una vez que los probióticos son ingeridos ocurren cambios en la microflora intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor. Es importante resaltar que la biota intestinal es una comunidad interactiva de organismos con funciones específicas para mantener el estado de salud. Esta función es la suma resultante de las diferentes actividades combinadas de los organismos que la conforman como lo son la fermentación de sustratos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio con la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) favoreciendo la recuperación y la absorción de calcio, hierro y magnesio, en la regulación del metabolismo de la glucosa reduciendo la glicemia postprandial, así como, la síntesis de la vitamina K y de las del grupo B (Guarner, 2000). Algunos beneficios incluyen mejoría en las enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulino dependiente, obesidad, osteoporosis y cáncer (Marteau et al., 2001; Sanders, 2000; Saavedra, 2001). Estos efectos pueden deberse directa o indirectamente a la regulación de la microflora intestinal o de la respuesta inmunológica (Guarner y Malagelada,

2002). Entre las bacterias probióticas más utilizadas para el consumo humano se encuentran las llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen a las siguientes: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei spp. rhamnosus*, *L. delbrueckii spp. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis spp. lactis*, *Lactococcus lactis spp. cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros (Farnworth, 2001).

Una forma de actuar de los probióticos para lograr alcanzar un buen estado de salud del individuo, es a través de la resistencia otorgada contra la invasión de microorganismos patógenos, que se logra mediante la generación de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Marteau et al., 2001; Sanders, 2000). Las BAL han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos ya que se encuentran en productos de leches fermentadas como yogurt, quesos madurados, productos cárnicos y hasta en algunas hortalizas. Metchnikoff hace más de un siglo comprobó el efecto benéfico en la salud del consumo de leches fermentadas (Mateos, 2002). Además de que las BAL proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos, desde hace décadas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos (Campos, 2002). La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimentaria ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían

reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como estafilococos y listerias respectivamente (Stiles, 1996). Dada la importancia que en la actualidad están tomando los probióticos como alimentos funcionales y en particular las bacteriocinas que producen, resulta interesante conocer algunas características de estas sustancias y sus propiedades antimicrobianas.

1.3.4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo relativamente heterogéneo de pequeñas proteínas biológicamente activas sintetizadas en los ribosomas. Tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora sin embargo, recientemente se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora, incluyendo bacterias patógenas de los alimentos y bacterias alterantes de los mismos. En algunos casos, "estrechamente relacionadas" incluye una amplia gama de bacterias gram-positivas, tales como *L. monocytogenes*, *C. Botulinum* y *B. cereus* (Lejeune et al., 1998; Sarantinopoulos et al., 2002). Aunque las bacterias Gram-negativas, las levaduras y los mohos no son

generalmente sensibles a la acción de las bacteriocinas de las BAL, la presencia de agentes quelantes, de surfactantes, un shock osmótico (cantidad elevada de sal), la presión hidrostática o las lesiones pueden sensibilizarlos (Garde, 2001; Montville y Winkowski, 2001; Smid y Gorris, 2002; González et al., 2003).

Las bacteriocinas pueden estar codificadas en el cromosoma o en plásmidos. Incluso en algunos casos los genes pueden estar repartidos entre el cromosoma y plásmidos. Una misma bacteriocina puede ser producida por cepas pertenecientes a géneros distintos. Una misma cepa puede contener varios plásmidos que codifiquen distintas bacteriocinas y un único microorganismo puede producir más de una bacteriocina. La función de las bacteriocinas sería la de capacitar a las bacterias productoras para sobrevivir frente sus competidores (Garde, 2001). Las bacteriocinas muestran una enorme heterogeneidad en su composición, tamaño y propiedades químico-físicas. Difieren en sus espectros de actividad, características bioquímicas y determinantes genéticos. La mayor parte de las bacteriocinas son pequeñas (3 a 10 kDa), tienen un punto isoeléctrico elevado y contienen dominios tanto hidrófobos como hidrófilos. Las propiedades químico-físicas (tamaño molecular, grado de resistencia al calor, al pH, sensibilidad a enzimas proteolíticos y al tratamiento con disolventes orgánicos) junto con el espectro de inhibición bacteriano son propiedades únicas que permiten diferenciar individualmente a unas bacteriocinas de otras. Estos parámetros se pueden utilizar para agrupar a las bacteriocinas encontradas en el estudio de un grupo bacteriano concreto en categorías o tipos (Gálvez del Postigo et al., 1991; Montville y Winkowski, 2001).

Desde el punto de vista de la conservación de los alimentos, elementos ventajosos de algunas bacteriocinas son su relativa alta

resistencia al calor, que son hidrolizables por las proteinasas gástricas y la inhibición de patógenos Gram positivos de los alimentos y organismos alterantes. La mayor parte de la atención se ha centrado en la inhibición de *L. monocytogenes*. Esta bacteria, tolerante al frío y que puede causar una alta mortalidad, está presente en muchos alimentos diferentes, y causa problemas específicamente en productos lácteos (quesos de pasta blanda) y en productos cárnicos (paté, embutidos...). Además, el impacto bactericida de algunas bacteriocinas sobre las bacterias formadoras de esporas, como especies de *Bacillus* y *Clostridium*, han sido objeto de estudio durante décadas e indica el enorme potencial que estas bacteriocinas pueden tener en la conservación de los alimentos (Smid y Gorris, 2002).

A lo largo de la historia del descubrimiento de los diversos tipos de sustancias antagonistas de origen microbiano han ido surgiendo términos tales como antibióticos, bacteriocinas y sustancias de tipo bacteriocina para designar a las distintas clases de inhibidores que muestran poder antibacteriano. En los últimos años se ha descubierto un número importante de bacteriocinas e inhibidores relacionados tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas. A parte del interés intrínseco que supone en sí el descubrimiento de nuevos antagonistas microbianos, ello proporciona nueva información sobre la distribución de su producción entre los microorganismos y sobre su función en ecosistemas microbianos particulares (Gálvez del Postigo et al., 1991). La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimentaria ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman

compuestos secundarios. Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares. Esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos (González et al., 2003).

1.3.4.1. Importancia y clasificación de las bacteriocinas

Tradicionalmente se considera a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon et al., 2000). Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. A continuación (Figura V.2.) se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Ness en 1996 en base a las características bioquímicas y genéticas:

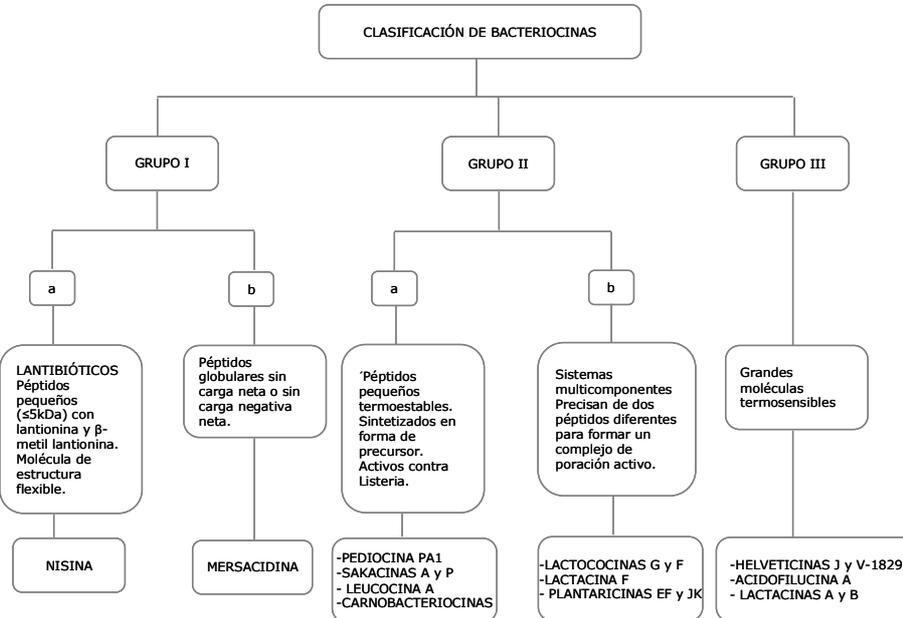


Figura V.2. Clasificación de bacteriocinas (Adaptado de Klaenhammer, 1993; Nes et al., 2002; Cleveland et al., 2001).

Grupo I.- Lantibióticos: Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como la lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina.

Grupo II.- No lantibióticos: Son bacteriocinas de peso molecular variable que contienen aminoácidos regulares. En este grupo se pueden identificar dos subgrupos:

- Grupo IIa.- Son péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

- Grupo IIb.- Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

Grupo III: Son péptidos grandes mayores de 30 kDa, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B.

1.3.4.2. Bacteriocinas más empleadas

1.3.4.2.1. Nisina

Es la bacteriocina más conocida y aplicada desde hace décadas en alimentación. Es un polipéptido sintetizado por *Lactococcus lactis*. Está incluida en la clase I de bacteriocinas, es decir, es un antibiótico. Es muy eficaz como conservador frente a bacterias Gram-positivas. No es eficaz con las bacterias Gram-negativas. Es capaz de impedir el desarrollo de clostridios y bacilos, destruyendo la pared de la espora. La sensibilidad a la nisina varía de unas bacterias a otras. La dosis mínima de eficacia no es siempre la misma. Desde 1981 está permitida en EEUU como conservador para prevenir el desarrollo y crecimiento de *Clostridium botulinum*, y por tanto la producción de la toxina botulínica, en la elaboración de quesos pasteurizados. Las grandes ventajas que ofrece la nisina como conservador son:

- Resistencia térmica. Permite su aplicación a productos enlatados y conservados a altas temperaturas. Mediante la acción de la nisina se reduce la temperatura de tratamiento, o bien, manteniendo la

misma temperatura de tratamiento reduce la contaminación previa del alimento a procesar.

- Estable a pH bajo (menor de 6).
- Síntesis a lo largo de todo el ciclo de desarrollo del *Lactococcus*, no solo en la fase exponencial como otras bacteriocinas. Esto permite que, aunque haya terminado la fase de crecimiento de la población láctica, se siga sintetizando la nisina en los alimentos que se encuentren estas bacterias.

Tiene el inconveniente de que en los alimentos ricos en grasa ésta disminuye su eficacia. También debe tenerse en cuenta que, como las bacteriocinas son proteínas, no debe agregarse nisina a los alimentos que contengan enzimas proteolíticos o microorganismos que tengan estos enzimas. La nisina se puede destruir por la nisinasa de *Bacillus cereus* y por la quimotripsina.

Se ha comprobado que la nisina es eficaz frente a *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. La nisina está considerada como GRAS (Generally Recognized As Safe) y se aplica a distintos alimentos. Las posibilidades del uso de la nisina como conservador natural ha permitido su empleo en la industria quesera, cárnica, de conservas por calor y tiene un gran futuro en la industria cervecera por inhibir durante la fermentación de la malta las bacterias Gram-positivas que inhiben a las levaduras fermentadoras y se adueñan del proceso. No obstante, sus aplicaciones tienen que ser aprobadas por las legislaciones correspondientes. Actualmente se comercializa bajo distintas marcas, empleándose para prevenir patógenos y alteraciones en distintos alimentos, según países.

1.3.4.2.2. Otras bacteriocinas de interés

La mayoría del resto de las bacteriocinas identificadas tienen interés, principalmente, desde el punto de vista de la calidad de los alimentos, ya que su actividad está dirigida solamente hacia las BAL directamente relacionadas. Esto supone un impacto en la calidad de los cultivos iniciadores. Con respecto a esto, se han estudiado distintas cepas productoras de bacteriocinas como *Enterococcus faecium* (productor de Enterocina A) *Lactobacillus sakei* (Sakacina), *Lactobacillus helveticus* (helveticinas y de lactocinas), *Lactobacillus acidophilus* (lactacinas, acidofilucina) y *Lactobacillus plantarum* (plantaricinas, plantacina). Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria es muy importante señalar el efecto inhibitorio que la plantacina BN ha ejercido sobre *C. botulinum* e incluso sobre la bacteria Gram-negativa *A. hydrophila*.

1.3.4.3. Descripción de la técnica

Para defenderse de otros microorganismos o persistir en su nicho ecológico muchas especies han desarrollado agentes antimicrobianos de defensa contra microorganismos competidores o infecciones (Nisen-Meyer y Nes, 1997). La producción de péptidos antimicrobianos es una estrategia de defensa de primera línea y común en el sistema inmunitario de muchas especies. Existen péptidos que actúan de forma específica contra alguna especie y otros que son de amplio espectro contra distintos tipos de microorganismos. El modo de acción más común de los péptidos antimicrobianos es la permeabilización de puntos concretos de la membrana celular lo que produce la fuga de material celular y la muerte de la célula (Cleveland et al., 2001). Algunas bacteriocinas se utilizan de forma rutinaria en muchos países (nisina) y existen muchas aplicaciones potenciales y patentes que permitirán el

desarrollo de nuevas técnicas de preservación en la industria alimentaria. La Figura V.3. resume las características principales del uso de bacteriocinas como técnica de conservación de alimentos.

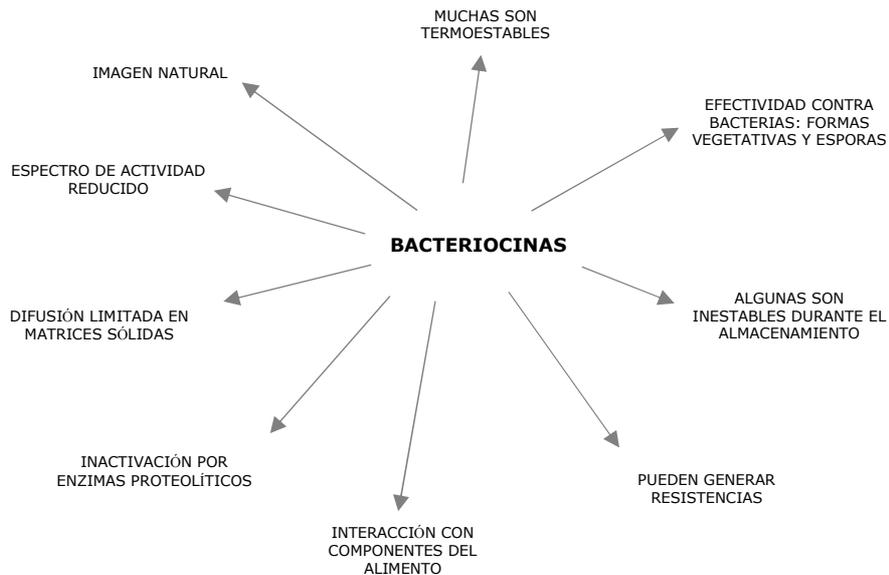


Figura V.3. Características de la utilización de bacteriocinas en industria alimentaria (Morata, 2008).

1.3.4.4. Mecanismo de acción de la técnica considerada

Las bacteriocinas, especialmente los lantibióticos, inhiben el desarrollo bacteriano produciendo poros en la membrana, lo que altera el potencial transmembrana ($\Delta\psi$) y el gradiente de pH lo que favorece la fuga al exterior del contenido celular. Se ha sugerido que para la formación de poros por nisina, debe existir un incremento de potencial transmembrana y del pH negativo en el interior de la célula (Oreke y Montville, 1992). Las bacteriocinas son moléculas con carga neta positiva y con grupos hidrofóbicos. Se piensa que las interacciones con grupos fosfato con carga

negativa en las membranas de las células y las interacciones hidrofóbicas entre membrana y bactericidas son los puntos de unión inicial a la membrana (Chen et al., 1997a y b; Lins et al., 1999). Es muy probable que la porción hidrofóbica de la bacteriocina se inserte en la membrana interaccionando con las colas hidrocarbonadas de los ácidos grasos formando poros. La interacción de la nisina con la membrana fosfolipídica se produce en el lípido II y la unión de ambos crea una estructura molecular rígida, que repetida varias veces según el modelo de la de barrica (*barrel-stave*), permite la formación de una estructura cilíndrica que expande la membrana creando un poro (Wiedemann et al., 2001; Breukink y Kruijff, 2006) (Figura V.4.)

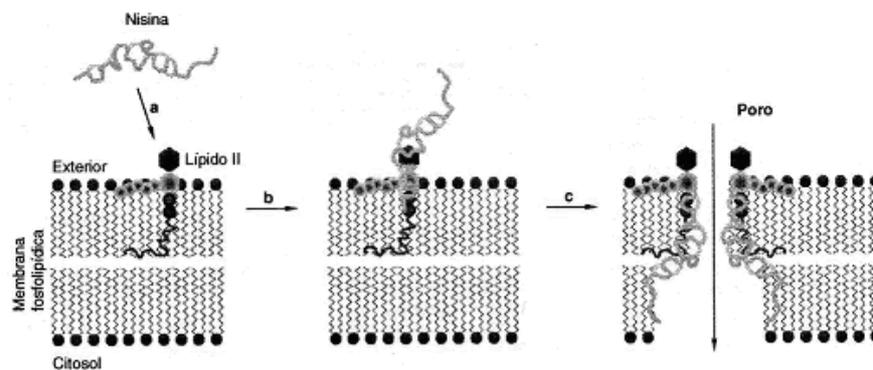


Figura V.4. Formación de poros en la membrana fosfolipídica por interacción entre la bacteriocina nisina y el lípido II (Morata, 2008).

Estos poros permiten la entrada o salida de iones o protones lo que desestabiliza el potencial transmembrana y lleva a la lisis celular. La Lacticina 3147 es una bacteriocina obtenida a partir de *Lactococcus lactis* cuyo mecanismo de acción se ha determinado y produce un poro en la membrana, que es permeable a cationes K^+ e iones fosfato a través del cual fugan al exterior celular. Para

equilibrar el sistema y reaccumular estos iones la célula tiene que hidrolizar ATP a ADP liberando fosfato. Pero el ATP es necesario para mantener el gradiente de protones y metabolismo energético y la célula pierde energía y termina muriendo (Mc Auliffe et al., 1998).

1.3.4.5. Efectos sobre las propiedades nutricionales de los alimentos

Las bacteriocinas no producen una mejora de las propiedades nutricionales, ya que son péptidos y proteínas de pequeño tamaño. Sin embargo, cuando la bacteriocina se aplica en la forma de un cultivo productor que realiza algún tipo de fermentación en el alimento, sí que se puede producir proteólisis, lipólisis y mejora de la digestibilidad del alimento, o bien producción de intermedios metabólicos nutricionalmente saludables. Tampoco producen, por su modo de acción, una reducción de características nutricionales como desnaturalización de enzimas o proteínas.

1.3.4.6. Métodos de purificación

Las bacteriocinas pueden ser utilizadas como conservante de manera purificada o semipurificada. El primer paso que se requiere para la purificación de las bacteriocinas se refiere a la concentración del sobrenadante, asumiendo un proceso de producción de bacteriocinas optimizado (Svetoslav et al., 2004). Algunas de ellas se encuentran en agregados moleculares, induciendo a errores en la determinación del peso molecular de la bacteriocina. Estas macromoléculas se disgregan usando agentes que disocian las macromoléculas, ultrafiltración o eliminando material lipídico por la extracción con metanol – cloroformo o etanol – dietiléter. Las bacteriocinas del sobrenadante pueden ser

concentradas de acuerdo con su tamaño: (i) filtración; (ii) precipitación con sales de sulfito de amonio; y (iii) extracción con solventes orgánicos como butanol y etanol (Svetoslav et al., 2004). La concentración permite reducir el volumen y recobrar las bacteriocinas del líquido sobrenadante aunque no es muy selectivo, para obtener una alta pureza es necesario realizar su separación de otros compuestos proteínicos con técnicas basadas en sus características fisicoquímicas (Casaus, 1998). La purificación inicia desde el crecimiento de la bacteria en un medio líquido conveniente y bajo óptimas condiciones, removiendo las células por centrifugación y precipitando la proteína con la adición de sulfato de amonio, seguido de varios pasos de cromatografía (Cintas et al., 2001). Se han desarrollado otros métodos con separaciones por cromatografía y de acuerdo al pH del medio donde logran una total liberación o absorción de las bacteriocinas dentro de la célula. El método más común utilizado es la precipitación con sulfato de amonio seguido de una cromatografía HPLC (Svetoslav et al., 2004).

1.3.4.7. Aplicaciones industriales

En la actualidad se desarrollan multitud de patentes y se tienen aislados y estudiados gran número de péptidos procedentes de bacterias con potencial biocida y con aplicaciones en la industria alimentaria. Muchas bacteriocinas son producidas por bacterias que no son patógenas, ni alterantes, y que están presentes en los alimentos o se utilizan para elaborarlos. Esto permite que sean utilizadas de forma natural en preservación de alimentos o en aplicaciones de seguridad alimentaria y en la selección de una flora microbiana adecuada en alimentos fermentados. Las bacteriocinas pueden ser utilizadas para conferir una inmunidad natural a los

alimentos durante su elaboración y comercialización (Cotter et al., 2005). Se han desarrollado tres estrategias hasta la fecha de aplicación de bacteriocinas para el control de patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes*: producción in situ de la bacteriocina mediante el uso de un microorganismo o cultivo productor, rociar el alimento con la bacteriocina parcialmente purificada y envasar el alimento con un film o película plástica recubierto de bacteriocinas. Además, algunas técnicas derivadas permiten incrementar la efectividad como por ejemplo la inmovilización de una cantidad máxima de bacteriocinas en un cultivo productor mediante técnicas de ajuste de pH.

En la presente tesis se propone la técnica de impregnación a vacío como método de aplicación de la bacteriocina y del cultivo bioprotector.

1.3.4.8. Aspectos legislativos y regulación

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son GRAS (Generally Recognized as Safe) para la producción de alimentos fermentados. La categoría de GRAS, otorgada por la Food and Drug Administration (FDA) de los EEUU, es especialmente deseable porque permite utilizar un compuesto en una aplicación específica sin necesidad de una aprobación reguladora adicional. A veces no se tiene en cuenta la relación entre el estatus de GRAS y una aplicación específica. Por ello, la categoría de GRAS de las BAL o sus metabolitos para la producción de alimentos fermentados no las convierte automáticamente en GRAS para usos tales como la conservación de alimentos sin fermentar. La nisina es la única bacteriocina que tiene la consideración de GRAS (Generally Recognized As Safe) (Montville y Winkowski, 2001). Las bacteriocinas producidas por organismos GRAS no son

automáticamente GRAS. Las bacteriocinas que no son GRAS están reguladas como aditivos alimentarios y requieren la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) antes de su comercialización. Un alimento fermentado con iniciadores productores de bacteriocinas puede utilizarse como ingrediente en un segundo producto alimentario. Su uso como un ingrediente podría incidentalmente prolongar la vida útil del producto sin necesidad de hacer una declaración de conservante. Sin embargo, si el ingrediente se añade con el fin de prolongar la vida útil, la FDA probablemente lo consideraría un aditivo y exigiría tanto los formalismos previos a la comercialización como las indicaciones pertinentes en el etiquetado. No hay duda de que las bacteriocinas purificadas utilizadas como conservantes requieren la aprobación de la FDA previa a la comercialización (Montville y Winkowski, 2001). La nisina es la única bacteriocina aprobada internacionalmente para su uso en alimentos. La FAO/OMS aprobó la nisina como aditivo alimentario en 1969 y establecieron los niveles máximos de ingestión en 33.000 UI/kg de peso corporal. Según esto, muchos países autorizan la nisina en una serie de productos, a veces sin restricciones, en lo que a valores máximos se refiere. Además de la leche, el queso y los productos lácteos, esto incluye a las hortalizas enlatadas, la mayonesa y los alimentos infantiles. En la actualidad la nisina está permitida en 50 países para la inhibición de los clostridios en el queso y en los alimentos enlatados. Ninguna de las restantes bacteriocinas conocidas hasta ahora está aprobada totalmente como aditivo alimentario (Montville y Winkowski, 2001; Smid y Gorris, 2002).

1.4. Impregnación a vacío

En la presente tesis doctoral se propone la técnica de impregnación a vacío como método de aplicación de la bacteriocina y el cultivo bioprotector en el filete de dorada (*Sparus aurata*). Basándose en la estructura porosa de muchos alimentos, Fito y Pastor (1994) explicaron la operación de impregnación a vacío a través del mecanismo hidrodinámico.

La impregnación a vacío es un mecanismo que consta de dos etapas las cuales se explican a continuación:

1. A un alimento sumergido en un líquido se le aplica una presión subatmosférica durante un tiempo t_1 . Al someter al alimento a presiones subatmosféricas el gas ocluido en los poros se expandirá con el objeto de equilibrarse con la presión impuesta al sistema. La expansión del gas ocluido produce por un lado la desgasificación parcial de la estructura porosa del alimento y por otro lado se produce una penetración del líquido por capilaridad cuando se alcanza el equilibrio de presiones. El nivel de desgasificación que se produce depende de la presión aplicada, obviamente a menor presión mayor será el nivel de desgasificación.
2. Restauración de la presión atmosférica durante un tiempo t_2 . Al restaurar de nuevo la presión atmosférica se produce un gradiente de presiones que hace que el líquido llene parcialmente los poros que antes habían estado ocupados por gases. La cantidad de líquido que impregna el sistema es función del nivel de desgasificación conseguido durante la primera etapa que, tal y como se ha comentado anteriormente, es función de la presión de trabajo (Cháfer et al., 2000).

De entre las ventajas que nos proporciona la técnica de impregnación a vacío se destacan las siguientes:

- La evacuación del gas ocluido en los poros producida durante la primera etapa de esta operación proporciona mayor estabilidad en cuanto a reacciones de deterioro se refiere.
- La impregnación a vacío permite la introducción de sustancias a través de los poros del alimento y de una manera controlada de acuerdo al mecanismo hidrodinámico. Estas sustancias pueden aumentar la estabilidad del producto o mejorar sus propiedades nutritivas o sensoriales.
- La estructura del alimento apenas sufre cambios.
- El tiempo de aplicación es relativamente corto debido a que el vacío acelera la cinética de transferencia de materia.

V.2. OBJETIVO

2.1. Objetivo general

El objetivo del presente capítulo es evaluar la posible utilización de cultivos bioprotectores o bioconservantes, concretamente *Lactococcus lactis*, con el fin de prolongar la vida útil de filetes de dorada (*Sparus aurata*) envasados en bolsas de polietileno y almacenados en refrigeración.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar la evolución de los filetes de dorada, durante el almacenamiento en refrigeración, desde el punto de vista microbiológico y fisicoquímico.
2. Analizar el desarrollo de *Lactococcus lactis* en diferentes medios.
3. Evaluar la capacidad inhibitoria de *Lactococcus lactis* y/o sus metabolitos in vitro, frente a determinados microorganismos indicadores (*Lactobacillus sakei*, *Bacillus cereus* y *Listeria innocua*).
4. Estudiar, in vivo, la evolución de la microflora de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) en fresco tratados con cultivos

bioprotectores (*Lactococcus lactis*) y almacenados en refrigeración.

5. Analizar el efecto de la adición de dicho cultivo (*Lactococcus lactis*) sobre los parámetros físico-químicos del filete de dorada (*Sparus aurata*) así como la evolución de los mismos durante el almacenamiento.

V.3. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo seguido para la consecución de los objetivos se divide en tres fases descritas a continuación:

1. Análisis de la microbiota presente en los filetes de dorada (*Sparus aurata*) y estudio de la evolución de los parámetros físico-químicos del filete a lo largo del almacenamiento en refrigeración.
 - 1.1. Estudio de la microbiota presente en los filetes de dorada (*Sparus aurata*) a lo largo del almacenamiento en refrigeración. Se determinarán los siguientes microorganismos: Aerobios mesófilos, enterobacterias, bacterias lácticas, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*
 - 1.2. Estudio de la evolución experimentada por los parámetros físico-químicos (color, a_w , pH y nitrógeno básico volátil total (TVBN)), a lo largo del almacenamiento en refrigeración.

2. Determinación de la actividad antimicrobiana de *L. lactis* y/o sus metabolitos "in vitro".
 - 2.1. Caracterización del desarrollo de *L. lactis* en diferentes medios de cultivo. Evaluación de diferentes medios de cultivo con la finalidad de seleccionar un medio apto para

su incorporación en alimentos con un buen desarrollo de *L. lactis* y una elevada actividad antimicrobiana. Los medios a analizar son: dos de referencia (YGLPB y MRS) y dos formulados (OPTIMO 1 Y OPTIMO 2). Estos medios fueron seleccionados en base a trabajos previos y a que debido a su composición podrían incorporarse a los filetes de dorada. Para cada uno de ellos se determinará la curva de crecimiento de *L. lactis* con la finalidad de determinar el tiempo de incubación requerido para la producción de metabólitos antimicrobianos.

2.2. Análisis de la actividad antimicrobiana de *L. lactis* y/o sus metabolitos frente a diferentes cepas diana (*Lactobacillus sakei*, *Bacillus cereus* y *Listeria innocua*) en los medios mencionados en los apartados anteriores (CC) y los sustratos parcialmente purificados (SPP) obtenidos a partir de los CC tras inactivación de las células microbianas. Cuantificación de dicha actividad frente a un patrón de nisina.

3. Determinación de la capacidad inhibitoria "in vivo" de la cepa productora de bacteriocinas (*Lactococcus lactis*) en los filetes de dorada y análisis de los parámetros físico-químicos de los filetes impregnados con *Lactococcus lactis* y nisina durante el almacenamiento en refrigeración de los mismos.

3.1. Estudio de la capacidad bioconservante de *Lactococcus lactis* y nisina en filetes de dorada (*Sparus aurata*) almacenados durante un periodo de tiempo correspondiente a 15 días. Los microorganismos evaluados son: Aerobios mesófilos, enterobacterias, bacterias lácticas, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*

3.2. Estudio de la evolución de los parámetros físico-químicos (color, a_w , pH y TVBN) de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados con *Lactococcus lactis* y con nisina durante los 15 días de almacenamiento en refrigeración.

En la Figura V.5. se puede observar el diagrama del plan de trabajo realizado para la consecución de los objetivos propuestos en el presente capítulo.

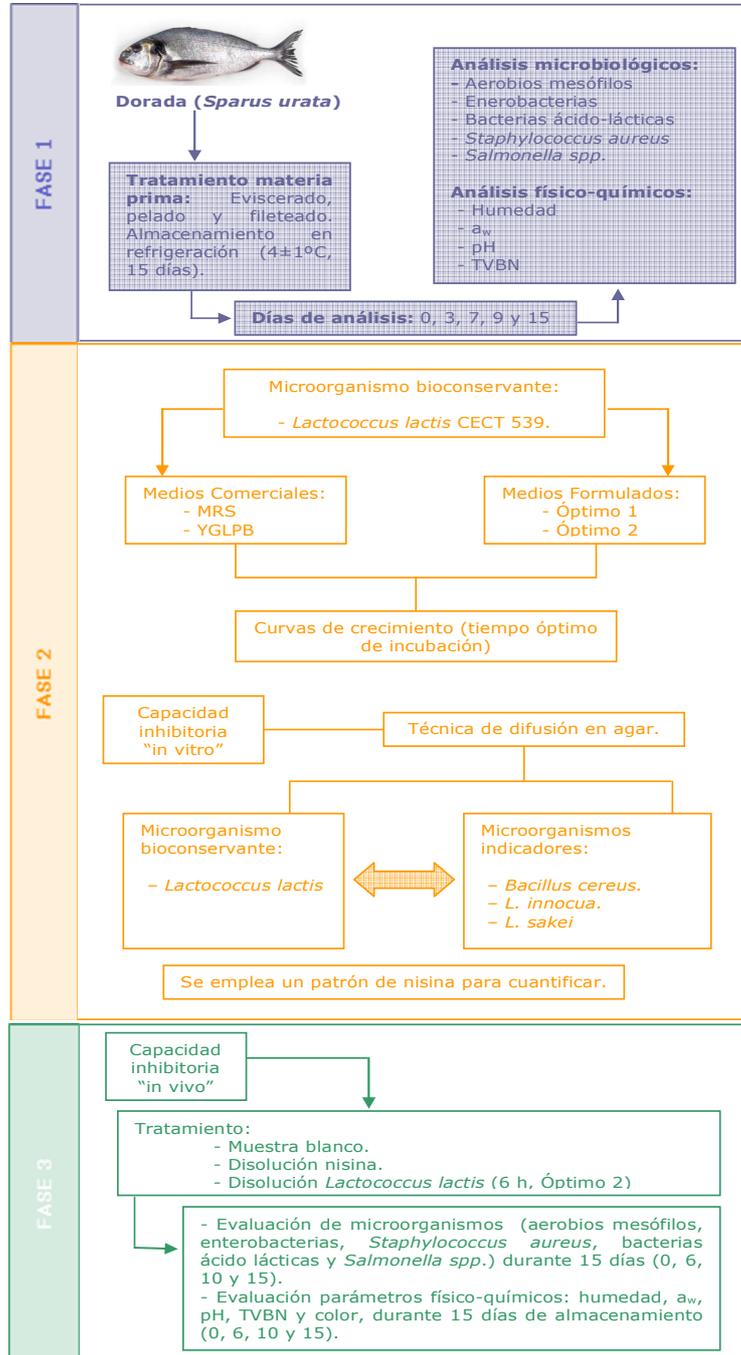


Figura V.5. Diagrama del plan de trabajo realizado para la consecución de los objetivos propuestos en el presente capítulo.

V.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materia prima y preparación de la muestra

4.1.1. Filetes de dorada (*Sparus aurata*)

En el presente capítulo se emplearon doradas (*Sparus aurata*) procedentes de piscifactoría, de un peso medio de 600 g. La selección de la materia prima se realizó a partir de las jaulas propias del Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas (GIRA) de la Universidad Politécnica de Valencia instaladas en las piscifactorías procedentes de la empresa colaboradora Gramasa S.A., situada en Gandía, según los criterios de selección: mismo lote y mismo peso (ración de consumo). Una vez en el laboratorio, las doradas fueron evisceradas, limpiadas y fileteadas. Los filetes se mantuvieron en refrigeración (envasados en bolsas de polietileno) para su posterior utilización (máximo 24 h).

4.1.2. Microorganismos

Los microorganismos utilizados en el presente estudio fueron *Lactococcus lactis* (CECT 539) como cultivo bioprotector y *Lactobacillus sakei* (CECT 906T), *Listeria innocua* (CECT 1014) y *Bacillus cereus* (CECT 5050), como microorganismos indicadores, todos ellos obtenidos de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

4.1.3. Patrón de nisina

Para llevar a cabo este estudio se utilizó como patrón nisina comercial de la marca Biostar S.A. (Valmojado, España) con una concentración de 1000 IU/mg ($1\text{g}=10^6$ IU).

4.1.4. Medios de cultivo

Como medios de cultivo comerciales empleados se emplearon los siguientes:

- Agar manitol yema de huevo con polimixina (Mannitol- Egg Yolk- Polymixin Agar: MYPA) de MOSSEL. Para la reconstitución de este medio se utiliza una emulsión estéril de yema de huevo y 100 mg/L de sulfato de Polimixina B.
- Agar verde brillante (Brilliant green agar: BGA).
- Baird parker (BP). Para la reconstitución de este medio se utiliza una emulsión estéril de yema de huevo con telurito-sulfametazina.
- Brain Heart Infusión Broth (BHI Caldo).
- Brain Heart Infusión agar (BHI agar).
- Caldo lactosado biliado verde brillante (Brilliant Green Bile Lactose: BGBL).
- Caldo Rappaport- Vassiliadis.
- Caldo base selenito cistina (Selenite Cystine Broth base). Para la reconstitución de este medio se añade biselenito de sodio.
- De Man, Rogosa y Sharpe Broth (MRS caldo).
- De Man, Rogosa y Sharpe agar (MRS agar).
- Nutrient broth.
- Nutrient agar.
- Oxford agar base. Para la reconstitución de este medio se añade suplemento Selectivo Oxford.
- Plate count modified agar (Agar de recuento en placa modificado).
- Agar selectivo Clostridium perfringens (SPS).
- Tryptone phosphate water (buffered).
- Triptona sulfito neomicina agar (TSN).

- Xilosa-lisina-desoxicolato agar (Xylose lysine desoxycholate modified agar: XLD modificado).
- Yeast glucose lactose peptone broth (YGLPB).
- Yeast glucose lactose peptone agar (YGLP Agar).

Como medios de cultivo formulados empleados se encuentran los siguientes:

- ÓPTIMO 1.

Tabla V.3. Composición del medio óptimo 1 en g/L.

Componente	g/L
Sacarosa	13,333
Tryptona	13,33
Extracto de levadura	14
KH ₂ PO ₄	6,667
NaCL	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,047

Para la reconstitución del medio se disolvieron los componentes indicados en la Tabla V.3. en 1 L de agua destilada y se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

- ÓPTIMO 2.

Tabla V.4. Composición del medio óptimo 2 en g/L.

Componente	g/L
Sacarosa	6,667
Tryptona	6,667
Extracto de levadura	15,66
KH ₂ PO ₄	4,34
NaCL	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,047

Para la reconstitución del medio se disolvieron los componentes indicados en la Tabla V.4. en 1 L de agua destilada y se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

4.2. Metodología

4.2.1. Análisis microbiológico de los filetes de dorada (*Sparus aurata*)

En la primera fase de este trabajo se realizó un estudio de la microbiota inicial presente en los filetes de dorada, para ello se siguieron los protocolos descritos por Pascual y Calderón (2000) y Allaert y Escolà (2000).

4.2.1.1. Preparación y toma de muestra

Las muestras se prepararon tal y como se indica en el apartado 4.1.1. del presente capítulo, y se almacenaron en refrigeración a 4 (1) °C durante 15 días, se realizó toma de muestra a tiempo 0, 3, 7, 9 y a los 15 días.

Para cada uno de los tiempos analizados se tomaron tres filetes de los cuales se pesaron aproximadamente 25 g de cada filete en condiciones de esterilidad y el resto se empleó para las determinaciones físico-químicas.

4.2.1.2. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos realizados fueron:

- Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos basado en la Norma ISO 4833 (AENOR, 2003). Mediante este recuento se estimó la flora total del producto sin especificar el tipo de gérmenes. Se utilizó el método de recuento por siembra en masa, sembrando 1 mL en agar nutritivo PCA (Plate Count Agar) e incubándose a 30(1) °C durante 72 horas.

- Recuento de Enterobacterias (*Enterobacteriaceae*) lactosa-positivas, coliformes (Tomlinson, 1995). Se realizó mediante un recuento en medio líquido, utilizando para ello el método del número más probable (NMP) con tres series de tres tubos conteniendo cada uno de ellos 10 mL de BGBL (Brilliant Green Bile Lactose 2% Broth) y una campana durham. Se incubaron a 30(1) °C, realizando la lectura a las 24 y 48 horas.

- Recuento de *Staphylococcus aureus* basado en las norma ISO 6888-1 (AENOR, 1999). Se empleó el método de recuento en placas, sembrando 0,1 mL sobre la superficie de agar BP (Baird Parker) e incubándose a 37(1) °C durante 48 horas.

- Recuento de bacterias acidolácticas (Tomlinson, 1995). Se llevó a cabo mediante el método de recuento en doble capa de 1 mL en MRS (De Man Rogosa and Sharpe) e incubándose a 37(1) °C durante 24-48 horas.

- Detección de *Salmonella spp.* se realizó según el procedimiento descrito por Pascual y Calderón (2000) tal y como se especifica en el apartado 4.4.5. de materiales y métodos del capítulo IV.

4.2.1.3. Análisis físico-químicos de los filetes de dorada (*Sparus aurata*)

4.2.1.3.1. Determinación del contenido en humedad

La determinación de la humedad se realizó mediante el método de la AOAC 950.46 (1997) según lo descrito en el apartado 4.3.3. de materiales y métodos del capítulo III.

4.2.1.3.2. Determinación de la actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) se determinó a partir de las muestras de dorada previamente trituradas siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.2. de materiales y métodos del capítulo IV.

4.2.1.3.3. Determinación del pH

Para la determinación del pH se empleó el equipo Seveneasy pH Meter S20 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) midiendo el potencial desarrollado entre los electrodos siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.3. de materiales y métodos del capítulo IV.

4.2.1.3.4. Determinación del nitrógeno básico volátil total (TVBN)

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

Para esta determinación se homogeneizaron en Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) 40 g de dorada, previamente triturada, con 80 mL de una disolución acuosa de ácido tricloroacético (7,5% p/v) durante 1 minuto. Este homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue filtrado a través de papel de filtro Whatman n°1, obteniéndose así el extracto de muestra.

En un tubo de destilación tipo Kjeldahl, se introdujeron 25 mL del filtrado y 5 mL de una disolución acuosa de NaOH (10% p/v). Los tubos se llevaron a una unidad de destilación Büchi B-316 (Büchi AG, Uster, Switzerland) y el destilado fue recogido sobre 15 mL de una disolución acuosa de ácido bórico (4% p/v), hasta alcanzar un volumen final de 50 mL. Finalmente, la disolución

obtenida se valoró con ácido sulfúrico 0,01 N, utilizando Shiro T-Shiro como indicador.

Paralelamente se realizó un ensayo en blanco, el cual se preparó de igual forma que las muestras, pero donde los 25 mL de extracto de muestra se sustituyeron por 25 mL de ácido tricloroacético (7,5% p/v).

La concentración de TVBN (mg N/100 g muestra) se calculó a partir del volumen de ácido sulfúrico empleado en la valoración del destilado recogido, mediante la ecuación V.1.

$$\text{mgN/100gmuestra} = \frac{N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot f \cdot (V_m - V_b) \cdot (80 + (m \cdot H)) \cdot 14}{m \cdot 25} \cdot 10^5 \quad \text{ecuac. V.1}$$

dónde:

$N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = normalidad del ácido sulfúrico

f = factor de normalidad del ácido sulfúrico

V_m = volumen de ácido sulfúrico empleado en la valoración de la muestra (L)

V_b = volumen de ácido sulfúrico empleado en la valoración del blanco (L)

m = masa de la muestra (g)

H = contenido en humedad de la dorada (g H₂O/g dorada)

4.2.1.3.5. Determinación de las propiedades ópticas

La medida de color de las muestras se realizó según lo descrito en el apartado 4.3.7. de materiales y métodos del capítulo III.

4.2.2. Inóculos concentrados

En este caso se prepararon inóculos concentrados de la cepa con actividad bioconservante (*Lactococcus lactis*) y de las cepas indicadoras (*Lactobacillus sakei*, *Listeria innocua* y *Bacillus cereus*).

A partir de la cepa liofilizada con actividad bioconservante y de las indicadoras, la recuperación se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Una vez revitalizada la cepa, para cada microorganismo se preparó un matraz erlenmeyer con 250 mL del medio de cultivo correspondiente, que se esterilizó en un autoclave marca JPSelecta modelo presoclave 75 (JPSelecta, Barcelona, España) durante 20 minutos a 121 °C.

A continuación se sembró, en condiciones asépticas, 1 mL de la suspensión bacteriana en el matraz estéril con el medio correspondiente y se incubó en estufa microbiológica (JP Selecta, Barcelona, España), donde se mantuvo a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo (30° para *Lactococcus lactis*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus sakei*; y 37 °C para *Listeria innocua*) durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se inocularon 2-3 mL del inóculo incubado en otros cuatro matraces de 900 mL, y éstos se mantuvieron en la estufa durante 12-18 horas a 30-37 °C en función del microorganismo recuperado.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la concentración del microorganismo, para ello se centrifugó a 11000 rpm y a 22 °C durante 5 minutos, realizándose tres ciclos de centrifugación, utilizando una centrifuga modelo 5804 R (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Finalizada la centrifugación se desechó el sobrenadante, se añadió agua destilada estéril (aproximadamente 2-3 ml) para recuperar el pellet y se agitó en el vortex hasta conseguir una total disolución. Seguidamente, todo el

pellet obtenido se distribuyó en alícuotas de 1 mL en eppendorfs a los que se les añadió 20% de glicerol. Los eppendorfs se conservaron a una temperatura correspondiente a -80 °C. Finalmente, se evaluaron las concentraciones de los microorganismos presentes en los eppendorfs siendo las indicadas en la Tabla V.5.

Tabla V.5. Concentraciones de los inóculos.

Microorganismo	Concentración
<i>Lactococcus lactis</i>	10 ¹⁰
<i>Bacillus cereus</i>	10 ⁹
<i>Listeria innocua</i>	10 ⁹
<i>Lactobacillus sakei</i>	10 ⁸

4.2.3. Obtención de la curva de crecimiento de *Lactococcus lactis*

Para determinar los niveles de crecimiento del microorganismo con actividad bioconservante (*Lactococcus lactis*) se procedió tal y como se indica a continuación.

4.2.3.1. Preparación del inóculo

Se parte de un inóculo con una concentración correspondiente a 10¹⁰ ufc/mL, tal y como se ha explicado en el apartado 4.2.2. del presente capítulo, por lo que a partir de éste se realizan diluciones en agua de peptona hasta obtener un inóculo de 10⁷ ufc/mL.

4.2.3.2. Curvas de crecimiento

El procedimiento empleado para la obtención de las curvas de crecimiento de *Lactococcus lactis* se detalla a continuación.

Lactococcus lactis con una carga de 10⁷ ufc/mL se inoculó 1 mL en 100 mL de cada uno de los cuatro medios seleccionados para

este trabajo (YGLPB, MRS, ÓPTIMO 1 y ÓPTIMO 2) alcanzándose una concentración de 10^5 ufc/mL; partiendo de esta concentración se incubó en los diferentes medios estudiados a la temperatura de incubación propicia para el microorganismo (30 °C).

Una vez inoculado el microorganismo en los medios de cultivo correspondientes, se tomó muestra a tiempo 0, 4, 6, 8, 12, 16 y 24 horas. En cada uno de estos tiempos de toma de muestra se realizaron recuentos del microorganismo para poder determinar el nivel de crecimiento. Para ello, se utilizó la técnica de las diluciones seriadas partiendo de 1 mL de cada uno de los medios y se realizó recuento en placa para la enumeración del microorganismo. El recuento de *Lactococcuss lactis* se realizó en De Man, Rogosa y Sharpe agar (MRS).

4.2.3.3. Modelización de las curvas de crecimiento

Los modelos matemáticos utilizados para modelizar la cinética de crecimiento microbiano se basan en expresiones matemáticas que describen el comportamiento de los microorganismos. Estos incluyen expresiones que muestran los cambios en las poblaciones microbianas con el tiempo y cómo influyen las condiciones ambientales sobre dichos cambios (Garza, 2004). Estos modelos cinéticos constituyen valiosas herramientas en la industria alimentaria, para predecir el crecimiento o supervivencia de los microorganismos. Los modelos pueden, de esta forma, aportar información muy útil para tomar decisiones a cerca de la higiene y la vida útil de un producto, pudiéndose estimar los riesgos potenciales debidos al crecimiento de patógenos en un alimento tras un periodo de almacenamiento en determinadas condiciones, o establecer una fecha de caducidad para un producto mediante la estimación del tiempo necesario para alcanzar un nivel especificado

de alteración del producto o de población microbiana. Además, también son útiles en otro tipo de situaciones relacionadas con la predicción del control de calidad, el desarrollo de nuevos productos, planes de trabajo y análisis de datos en el laboratorio y en educación.

Los distintos modelos pueden ser clasificados en función del proceso que estudian o de las variables consideradas. De este modo, existe una clasificación de los modelos en: primario, secundario y terciario. En el nivel primario se incluyen los modelos que describen los cambios de la población microbiana con el tiempo en unas determinadas condiciones. Aquí se incluyen los modelos de crecimiento y de inactivación/supervivencia microbiana. Los modelos del nivel secundario describen la variación de los parámetros de los modelos primarios con respecto a uno o más factores de cultivo o ambientales (pH, temperatura, atmósfera, etc.). En el nivel terciario se encontrarían las aplicaciones que ayudan a un mejor manejo de los modelos primario y secundarios de forma que, mediante un uso adecuado de la información obtenida, permiten calcular y formular las predicciones, comparaciones y gráficas deseadas (Garza, 2004).

Para modelizar el crecimiento microbiano en función del tiempo se utilizan con frecuencia curvas sigmoidales. Este tipo de funciones se eligen debido a que presentan cuatro fases, similares a las curvas de crecimiento microbiano, que como se ha explicado en el apartado 1.2.2. del presente capítulo, comprenden una fase inicial de cambio lento, una fase de cambio acelerado, otra fase de cambio desacelerado y, finalmente, una fase estacionaria. De este modo, los modelos primarios permiten estimar parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento microbiano como la fase de latencia, el tiempo de generación y la densidad de población

máxima de un microorganismo bajo determinadas condiciones (Garza, 2004).

Uno de los modelos primarios usado con mayor frecuencia para describir el crecimiento microbiano bajo condiciones definidas y controladas es el modelo cinético de Baranyi y Roberts (1994). Se trata de una ecuación sigmoideal asimétrica de cuatro parámetros que viene dada por las expresiones que se muestran en las ecuaciones V.2. y V.3. (Juárez et al., 2002; Puente, 2003). Este modelo es frecuentemente utilizado por diversas razones, entre las que se encuentra su fácil uso, es aplicable en condiciones dinámicas ambientales, tiene buena capacidad de prueba y la mayor parte de los parámetros de los modelos son biológicamente interpretables.

$$y = y_0 + a e^{-e^{-\frac{x-x_0}{b}}} \quad \text{ecuación V.2}$$

donde:

a: es la cantidad de crecimiento que se da al aumentar el tiempo indefinidamente

b: es la velocidad de crecimiento relativa en el tiempo

x_0 : es el tiempo al que la velocidad de crecimiento es máxima

y_0 : es la carga inicial de microorganismos

$$\text{Log } N = A + C e^{-e^{-B(t-M)}} \quad \text{ecuación V.3}$$

siendo:

Log N: el logaritmo del número de microorganismos en el tiempo t (Log ufc/mL)

A: el logaritmo de la carga microbiana inicial (N_0) (Log ufc/mL)

C: el crecimiento que se da al aumentar el tiempo indefinidamente (Log ufc/mL)

M: el tiempo al que la velocidad de crecimiento es máxima (h)

B: la velocidad de crecimiento relativa en el tiempo M (h⁻¹)

t: el tiempo (h)

Comparando las ecuaciones V.2. y V.3., se obtienen las siguientes equivalencias:

$$\text{Log } N = y \quad \text{ecuación V.4}$$

$$a = C \quad \text{ecuación V.5}$$

$$b = 1/B \quad \text{ecuación V.6}$$

$$X_0 = M \quad \text{ecuación V.7}$$

$$Y_0 = A \quad \text{ecuación V.8}$$

4.2.3.4. Determinación de los parámetros de crecimiento

A partir de los parámetros A, C, M y B obtenidos a partir del modelo de Baranyi y Roberts (1994) y definidos anteriormente, es posible calcular otros parámetros que caracterizan el crecimiento microbiano y que se definen en las ecuaciones V.9., V.10., V.11. y V.12.

$$\mu = \frac{B \cdot C}{e} \quad \text{ecuación V.9}$$

$$GT = (\log 2) \cdot \left(\frac{e}{B \cdot C} \right) \quad \text{ecuación V.10}$$

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B} \right) \quad \text{ecuación V.11}$$

$$MPD = A + C \quad \text{ecuación V.12}$$

donde:

μ : velocidad de crecimiento exponencial ((ufc/mL)/h ó DO)*

GT: tiempo de generación (h)

λ : duración de la fase de latencia (h)

MPD: máxima densidad de población (ufc/mL ó DO)*

(*) en función de la técnica de medida.

Los datos experimentales (DO ó ufc/mL) obtenidos de las curvas de crecimiento, se modelizaron con ayuda del programa informático DMFit manual versión 2.0. (Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom) seleccionando el modelo de Baranyi y Roberts (ecuación V.2.). A partir de la ecuación de Baranyi y Roberts correspondiente se obtuvieron los valores de a , b , x_0 e y_0 , y a partir de las ecuaciones V.4., V.5., V.6., V.7. y V.8. se obtuvieron A , C , M y B . Posteriormente se obtuvieron los parámetros cinéticos del crecimiento microbiano mencionados: velocidad de crecimiento, tiempo de generación, tiempo de latencia y densidad máxima de población, mediante las ecuaciones V.9., V.10., V.11. y V.12.

4.2.4. Medida de la actividad antimicrobiana

Con el fin de estudiar la capacidad bioconservante del cultivo seleccionado (*Lactococcus lactis*) se realizaron estudios *in vitro* frente a tres microorganismos indicadores (*Lactobacillus sakei*, *Listeria innocua* y *Bacillus cereus*). Para ello se empleó la técnica de difusión en agar, que se explica posteriormente en el apartado 4.2.5. de materiales y métodos. Se analizó el cultivo celular (CC) obtenido del crecimiento de *Lactococcus lactis* en los cuatro medios de cultivo seleccionados para este trabajo (MRS, YGLPB, ÓPTIMO 1 y ÓPTIMO 2) tras 4 y 6 horas de incubación (tiempo que se determinó de los resultados obtenidos en el estudio de la curva de crecimiento), y el sustrato parcialmente purificado (SPP) obtenido por inactivación y separación de las células microbianas.

4.2.4.1. Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos de *Listeria innocua* y *Bacillus cereus* se partió del microorganismo diana en una concentración de 10^9 ufc/mL y se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona tamponada hasta obtener una concentración de 10^7 ufc/mL. A partir de dicha concentración de 10^7 ufc/mL se inoculó 1 mL en 99 mL de caldo BHI para el caso de *Listeria innocua* y 99 mL de caldo nutritivo para el caso de *Bacillus cereus*, obteniendo así una concentración de 10^5 ufc/mL.

Para la preparación de *Lactobacillus sakei* se partió de una concentración de inóculo de 10^8 ufc/mL y se realizó una dilución en agua de peptona tamponada para obtener la dilución 10^7 ufc/mL. De dicha dilución se inoculó 1 mL en 99 mL de MRS caldo para obtener una concentración de 10^5 ufc/mL.

4.2.4.2. Obtención del sustrato parcialmente purificado

Para llevar a cabo la obtención de bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* se procedió a la recuperación del sobrenadante producido tras 4 y 6 horas de incubación. Para ello, se partió de los medios de cultivo expuestos en el apartado 4.1.4. del presente capítulo y de los inóculos obtenidos siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.3.1. y fueron incubados en estufa para favorecer su crecimiento.

Para la obtención del sustrato parcialmente purificado rico en sustancias antimicrobianas, fundamentalmente bacteriocinas, y libre de células bacterianas, se siguió la metodología definida por Cabo et al. (1999), Aymerich et al. (2000) y Guerra y Pastrana (2002), con pequeñas variaciones para ajustarla a la cepa bacteriana utilizada en el presente estudio.

El procedimiento seguido se detalla a continuación:

1. A partir de los matraces en los que se inoculó el microorganismo bioprotector en los diferentes medios y tras incubarlo el tiempo establecido para la toma de muestra (4 y 6 horas), se tomaron 25 mL de forma estéril y se introdujeron en un matraz estéril. Esta cantidad se tomó por duplicado ya que:

- Una de las muestras se usó como referencia para el control del pH.
- La segunda muestra se empleó en condiciones de total esterilidad para la extracción del sobrenadante.

Para la medición del pH se utilizó un pHmetro Seveneasy pH Meter S20 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland).

2. A continuación se ajustó el pH a pH 3,5 mediante la adición de una disolución de HCl 5N, para evitar la adsorción de moléculas de bacteriocina sobre la superficie de las células.

3. Después de dejar reposar la muestra 10 minutos, se pasteurizó en un baño de agua a 80 °C durante 10 minutos para inactivar las células microbianas sin alterar la bacteriocina, enfriando posteriormente durante 15 minutos en hielo.

4. A continuación la muestra fue sometida a centrifugación a 13000 g durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga marca Eppendorf modelo 5804 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Con la centrifugación se precipitaron las células muertas quedando en el sobrenadante las sustancias antimicrobianas.

5. Por último se recogió y neutralizó el sobrenadante, que contenía la bacteriocina, a pH 6,5 con una disolución de NaOH 5N.

6. Con el fin de comprobar la eficacia de la pasteurización, se inoculó 1 mL del sobrenadante obtenido, sembrándose en profundidad en placa. El resultado obtenido mostró un crecimiento

nulo del microorganismo, reflejando la eficacia del tratamiento térmico.

4.2.5. Determinación de la actividad antimicrobiana del sustrato parcialmente purificado

Para determinar la actividad de las bacteriocinas frente a *L. innocua*, *B. cereus* y *L. sakei* se utilizó el método de la gota en agar o método de difusión en agar que se basa en la capacidad de difusión de una cierta sustancia o disolución, en un agar o medio de cultivo sólido (Arihara et al., 1993; Bennik et al., 1997; Garriga et al., 2001; Montville y Winkowski, 2001; Guerra y Pastrana, 2002; Turcotte et al., 2003). Como referencia (patrón) se utilizó una solución de nisina (2000 UI/mL) (apartado 4.1.3. de materiales y métodos del presente capítulo).

En primer lugar se prepararon los cultivos con los diferentes microorganismos indicadores (*B. cereus*, *L. sakei* y *L. innocua*) tal y como se describe en el apartado 4.2.2. del presente capítulo, así como el cultivo del microorganismo bioprotector (*L. lactis*).

Una vez preparados los cultivos, se tomó 1 mL de cada matraz del cultivo indicador y se sembró en placas petri estériles empleando siembra en profundidad con BHI agar para *Listeria innocua*, en profundidad y doble capa con MRS agar en el caso de *Lactobacillus sakei*, y siembra en superficie con agar nutritivo para *Bacillus cereus*.

En cada una de las placas se realizaron 5 pocillos de 9 mm de diámetro con un sacabocados. Previamente a la perforación, las placas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C durante 30 minutos, para mejorar la solidificación del agar y realizar mejor los pocillos.

En los pocillos se inocularon 100 µL del sustrato a testar: cultivo celular (CC) y su correspondiente sustrato parcialmente purificado (SPP).

Posteriormente, tras realizar la inoculación de las placas, éstas se incubaron a 30 °C para *Bacillus cereus* y *Lactobacillus sakei* y a 37 °C para el caso de *Listeria innocua*. Transcurrido el tiempo de incubación correspondiente a 24 horas se midió el diámetro de las zonas de inhibición alrededor de los pocillos (Bennik et al., 1997; Guerra y Pastrana, 2002; Turcotte et al., 2003).

En la Tabla V.6. se muestran las combinaciones de los distintos sustratos a testar en las placas petri.

Tabla V.6. Distribución de los inóculos en los pocillos para la determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.

Placa	Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3	Pocillo 4	Pocillo 5
1	Nisina	SPP-MRS	SPP-MRS	CC-MRS	Vacío
2	Nisina	SPP-MRS	CC-MRS	CC-MRS	Vacío
3	Nisina	SPP-YGLPB	SPP-YGLPB	CC-YGLPB	Vacío
4	Nisina	SPP-YGLPB	CC-YGLPB	CC-YGLPB	Vacío
5	Nisina	SPP-ÓPT 1	SPP-ÓPT 1	CC- ÓPT 1	Vacío
6	Nisina	SPP-ÓPT 1	CC- ÓPT 1	CC- ÓPT 1	Vacío
7	Nisina	SPP-ÓPT 2	SPP-ÓPT 2	CC- ÓPT 2	Vacío
8	Nisina	SPP-ÓPT 2	CC- ÓPT 2	CC- ÓPT 2	Vacío

4.2.6. Obtención de las curvas patrón de nisina frente a la cepa diana

Para la realización de las curvas patrón dosis-respuesta, se prepararon diferentes disoluciones de nisina a diferentes concentraciones, frente a los mismos microorganismos indicadores

(*Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei*, *Bacillus cereus*). Usando la metodología planteada en el apartado 4.2.5. de la difusión en agar, se prepararon unas placas petri (con una carga microbiana entre 10^4 ufc/mL y 10^5 ufc/mL) con los microorganismos indicadores. Seguidamente se disolvieron 0,8 g de Nisina en 100 mL de agua destilada a pH 5,3 obteniendo una disolución de 8000 mg/L. A partir de esta disolución, se obtuvieron otras con diferentes concertaciones (8000, 5300, 4000, 3200, 2400, 1600, 800 y 400 mg/L). Estas diferentes disoluciones de nisina fueron pipeteadas (100 μ L) en los pocillos de las placas petri. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación de las placas con los cuatro microorganismos indicadores, se midieron los diámetros de los halos provocados por las disoluciones de nisina. A partir de los datos obtenidos se obtuvieron cuatro ecuaciones que relacionan el diámetro del halo de inhibición con la equivalencia en mg/L de nisina.

4.2.7. Evaluación de la actividad bactericida de *Lactococcus lactis* "in vivo"

Para finalizar el estudio se diseñó esta última experiencia sobre dorada fresca. En ella se analizó el efecto de la impregnación a vacío del sustrato (cultivo celular) como bioconservante en filetes de dorada (*Sparus aurata*), utilizando el ÓPTIMO 2 como medio de cultivo, debido a los resultados obtenidos aplicando la metodología descrita en el apartado 4.2.3.2. de materiales y métodos del presente capítulo. Las muestras impregnadas fueron almacenadas en bolsas de polietileno en refrigeración a 4 °C durante 15 días y se realizaron los análisis a tiempo 0, 6, 10 y 15 días.

4.2.7.1. Impregnación a vacío

Para la impregnación a vacío de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) con nisina y *Lactococcus lactis* se utilizó el equipo GASTROVAC® descrito en el apartado 4.4.1. de materiales y métodos del capítulo III. Los filetes se impregnaron a temperatura ambiente (25 °C). La presión de trabajo que se aplicó fue de 50 mbar y se impregnaron durante 5 minutos. La restauración de la presión se realizó manteniendo los filetes dentro de la solución de impregnación y con un periodo de reposo final de cinco minutos. Las muestras fueron pesadas antes y después del proceso de impregnación con el fin de determinar el porcentaje de impregnación experimentado. Se realizó también un análisis de la microestructura (siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.6. del capítulo IV) del filete de dorada en fresco para evaluar el porcentaje de impregnación en base a la porosidad de la matriz proteica de pescado.

4.2.7.2. Medios de impregnación

Solución de bacterias ácido lácticas (BAL): *Lactococcus lactis* CECT 539 creció en el medio ÓPTIMO 2 a 37 °C. La concentración final después de 6 horas de incubación fue de 10^9 ufc/mL. Un alícuota de dicha solución se transfirió a una solución isotónica con NaCl al 0,9% hasta obtener una concentración final de 10^7 ufc/mL.

Solución de nisina: la solución de nisina (2000 IU/mL) fue preparada diluyendo la nisina en una solución 0,1 N de HCl hasta alcanzar un pH de 5,3. La solución fue preparada con agua destilada.

4.2.7.3. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos llevados a cabo en este punto se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.1.2. de materiales y métodos del presente capítulo. Se analizaron: aerobios mesófilos, enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, bacterias ácido lácticas y *Salmonella spp.*

4.2.7.4. Evaluación de los parámetros físico-químicos de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados con cultivos bioprotectores durante el almacenamiento en refrigeración

4.2.7.4.1. Determinación del contenido en humedad

La determinación del contenido de humedad de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados con sustancias bioconservantes, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.3.3. del capítulo III.

4.2.7.4.2. Determinación de la actividad de agua (a_w)

La determinación de la actividad de agua de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados con sustancias bioconservantes, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.2. del capítulo IV.

4.2.7.4.3. Determinación del pH

La determinación del pH de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados con sustancias bioconservantes, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.3. del capítulo IV.

4.2.7.4.4. Determinación del nitrógeno básico volátil total (TVBN)

La determinación del nitrógeno básico volátil total (TVBN) de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados con sustancias bioconservantes, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.1.3.4. del presente capítulo.

4.2.7.4.5. Determinación de las propiedades ópticas

La determinación de las propiedades ópticas de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados con sustancias bioconservantes, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.1.3.5. del presente capítulo.

4.3. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). Con el objetivo de comprobar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el tiempo de almacenamiento para cada uno de los parámetros evaluados se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó el procedimiento LSD (*least significant difference*) para comprobar las diferencias a un nivel de significación $\alpha=0,05$. Así, se realizaron diferentes ANOVAS simples para cada uno de los parámetros fisicoquímicos así como ANOVAS factoriales para el tratamiento de impregnación utilizando como factores: el tiempo de almacenamiento y la nisina o el cultivo bioprotector (*Lactococcus lactis*).

V.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos refrigerados tienen una corta vida útil presentando un problema desde el punto de vista de la seguridad y la viabilidad comercial. El deterioro de los productos refrigerados y mínimamente procesados de pescado se atribuye principalmente a la actividad bacteriana que se manifiesta en cambios en las propiedades sensoriales del producto (Gram y Huss, 1996). Por este motivo, las investigaciones se centran en el control del crecimiento microbiano y las reacciones bioquímicas asociadas a dicho crecimiento para mejorar la calidad del pescado y prolongar su vida útil (Tsironi y Taoukis, 2010).

Los cambios en los hábitos de vida y culinarios en las últimas décadas y las demandas actuales de los consumidores han llevado a la industria de alimentos a producir una gran variedad de productos "de conveniencia" y muchos de ellos "listos para comer", conceptos que incluyen "fácil de usar" y con una larga vida útil. Los aspectos nutricionales también son más tenidos en cuenta por los consumidores que demandan, cada vez más, productos naturales sin conservantes. La bioconservación es un sistema natural que utiliza microorganismos inocuos o sus compuestos metabólicos para inhibir o destruir microorganismos no deseados en los alimentos para mejorar la seguridad del mismo y prolongar su vida útil (Cleveland et al., 2001). Los primeros sistemas de biopreservación se basaban en la utilización de las bacterias ácido-lácticas (BAL) empleadas durante muchos años en la industria de alimentos para producir alimentos fermentados. Actualmente, estos microorganismos se utilizan también con otros fines entre los que cabe destacar su potencial como probióticos y por lo tanto su uso en alimentos y sus propiedades bioprotectoras (Mata y Del Cubillo, 2000; Zabala et al., 2001; Puente, 2003). Las bacterias ácido-

lácticas inhiben el crecimiento de bacterias e inactivan a ciertos patógenos mediante la producción de ácido láctico y compuestos anticobianos (bacteriocinas, H₂O₂, lactoperoxidasa, etc.). Son utilizadas como conservante natural sin modificar ni la textura ni el flavor del alimento. En este capítulo se muestran los resultados obtenidos para la aplicación de *Lactococcus lactis*, como cultivo bioprotector, y la nisina, como bacteriocina, con propiedades bioconservantes para prolongar la vida útil de filetes de dorada (*Sparus aurata*) en fresco envasados en bolsas de polietileno. Por otra parte, también se presentan los resultados obtenidos para el análisis del medio y tiempo óptimo de crecimiento para *Lactococcus lactis* así como su capacidad bioconservante "in vitro". La elección de *Lactococcus Lactis* como bioprotector se hizo en base a que este microorganismo es secretor de nisina (Rodríguez et al., 1995) como se ha comentado anteriormente la nisina es la bacteriocina más estudiada a nivel práctico, bioquímico y genético (Harris et al., 1992).

5.1. Evolución de la microbiota del pescado fresco (*Sparus aurata*) durante el almacenamiento en refrigeración

Durante la muerte del pescado y en los procesos de eviscerado y fileteado, debido a la manipulación, los microorganismos pueden contaminar el producto. El pescado tiene propiedades que favorecen el crecimiento de microorganismos. A pesar de su bajo contenido en carbohidratos (0,2–1,5% dependiendo de la especie), el pescado es rico en moléculas nitrogenadas de bajo peso molecular que son rápidamente metabolizadas por las bacterias. Estos compuestos incluyen los aminoácidos libres, creatina, nucleótidos, urea y trimetilamina. El alto valor de pH postmortem que presenta (pH alrededor de 6) combinado con el bajo contenido

en carbohidratos, permiten el rápido crecimiento de Gram-negativos, bacterias psicrótrofas pH-sensitivas presentes en el pescado como *Pseudomonas* y *Shewanella* (Françoise, 2010). En el presente apartado se muestran los recuentos obtenidos para la microbiota del pescado fresco almacenado en refrigeración. En este caso se han analizado los microorganismos marcados por la legislación española para los productos de la pesca frescos y las bacterias ácido-lácticas.

La Orden del 2 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas (BOE 15/8/91) para los productos de la pesca y de la acuicultura indica el número de unidades formadoras de colonias que no se deben exceder, estos valores se recogen en la Tabla V.7.

Tabla V.7. Límites legislativos vigentes de los diferentes microorganismos para productos de la pesca frescos.

Alimento	Aerobios mesófilos	<i>Enterobacteriaceae</i> totales	<i>Salmonella-shigella</i>
Productos de la pesca frescos, salpresados, refrigerados y congelados	1x10 ⁶ ufc/g	1x10 ³ ufc/g	AUS/25g

Fuente: Orden de 2 de agosto de 1991

En la Figura V.6. se pueden observar los recuentos obtenidos para aerobios mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en las muestras de filetes de dorada (*Sparus aurata*) almacenados en bolsas de polietileno durante 15 días en refrigeración.

Tal y como muestra la Figura V.6., a los nueve días de almacenamiento, los recuentos de aerobios mesófilos y enterobacterias se situaron en valores cercanos a los límites establecidos por la legislación (Tabla V.7.). Los recuentos obtenidos para aerobios mesófilos fueron de 2,6(0,1) Log ufc/g al inicio del

almacenamiento, alcanzando valores de 8,5(0,1) Log ufc/g a los 15 días. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores como Cakli et al. (2007) que en un estudio llevado a cabo con dorada (*Sparus aurata*) entera sin eviscerar y almacenada en hielo mostraron recuentos iniciales de aerobios mesófilos de 2,61(0,12) Log ufc/g alcanzando valores de 7,97(0,04) Log ufc/g a los 18 días de almacenamiento. Kilinc et al. (2007) también reportaron valores similares para el almacenamiento de dorada entera sin eviscerar mostrando un recuento de aerobios mesófilos de 2,03(0,01) Log ufc/g al inicio, alcanzando valores de 7,51(0,19) Log ufc/g a los 15 días de almacenamiento en hielo a 4 °C. Estos datos podrían indicar que el proceso de fileteado llevado a cabo en este estudio se realizó en correctas condiciones higiénicas puesto que no supuso un aumento de los recuentos totales iniciales.

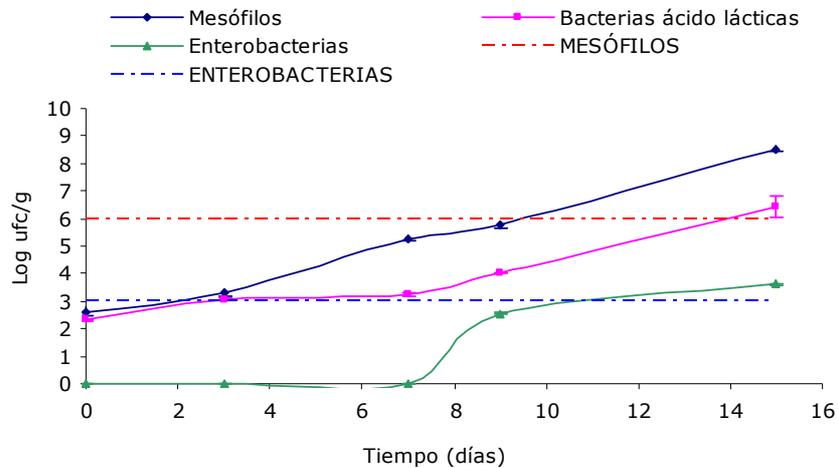


Figura V.6. Recuentos de aerobios mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en filetes de dorada (*Sparus aurata*), durante el almacenamiento en refrigeración. Las líneas punteadas hacen referencia al valor marcado por la legislación española para cada microorganismo.

Los recuentos de bacterias ácido-lácticas (BAL) fueron aumentando (Figura V.6.) durante todo el periodo de almacenamiento y este incremento se acentuó a partir del décimo día. Inicialmente se detectaron valores de 2,32(0,02) Log ufc/g, similares a los reportados por Tsironi y Taoukis (2010) en un estudio llevado a cabo en filetes de dorada (*Sparus aurata*) que determinaron valores iniciales de 2,4 Log ufc/g.

En este caso no se detectó presencia ni de *Salmonella* ni de *Staphylococcus aureus* durante los 15 días de almacenamiento. Las enterobacterias sobrepasaron los límites establecidos por la legislación a los 11 días de almacenamiento.

5.2. Evolución de los parámetros físico-químicos durante el almacenamiento en refrigeración de filetes de dorada (*Sparus aurata*) en fresco

5.2.1. Humedad, actividad de agua, TVBN y pH

En la Figura V.7. se muestra la evolución de los parámetros de humedad, a_w , pH y nitrógeno básico volátil (TVBN) durante el almacenamiento en refrigeración de los filetes de dorada en fresco. Los valores de humedad de los filetes frescos variaron entre 68,26 g agua/ 100 g de pescado a tiempo cero y 68,19 g agua/ 100 g de pescado a los 15 días de almacenamiento, y los valores de actividad de agua se mantuvieron constantes después de 15 días de almacenamiento con valores de 0,990. Los valores de humedad y de a_w , tal y como se puede observar en la Figura V.7., no experimentaron cambios significativos ($p > 0,05$) durante los 15 días de almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, los valores de nitrógeno básico volátil (TVBN) se fueron incrementando significativamente ($p \leq 0,05$) durante el almacenamiento alcanzando

valores de 13,69 mg TVBN/ 100 g de pescado a los 15 días. Cakli et al. (2007) en un estudio llevado a cabo con dorada (*Sparus aurata*) almacenada en hielo alcanzaron valores de TVBN de 28,96 mg TVBN/100 g de pescado a los 15 días de almacenamiento pero partieron de doradas con un valor de TVBN de 18,61 mg de TVBN/100 g de pescado. Estos valores indican que es tan importante el modo de almacenamiento como la calidad del pescado.

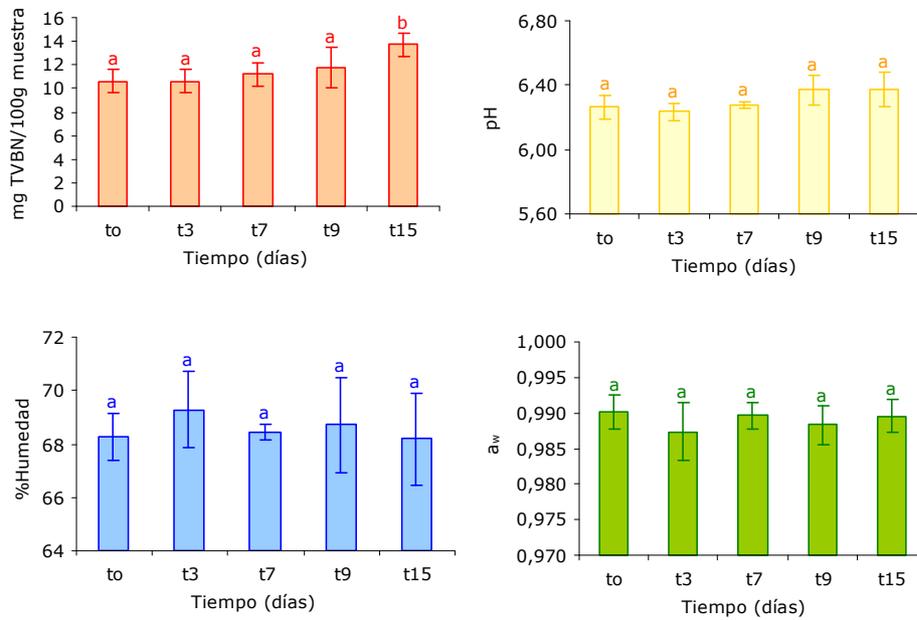


Figura V.7. Evolución de los parámetros de humedad, a_w , pH y TVBN durante el almacenamiento de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) en fresco.

El índice de nitrógeno básico volátil (TVBN) es empleado como índice de calidad en pescado, ya que se considera que su incremento está relacionado con el deterioro microbiano del

producto. Sin embargo, algunos autores no consideran que este índice sea un buen indicador de la calidad del pescado durante su almacenamiento (Kyrana et al., 1997; Papadopoulus et al., 2003; Tejada y Huidobro, 2002), ya que para la mayoría de las especies de pescado, la concentración de TVBN aumenta de manera curvilínea con el tiempo de almacenamiento (Kyrana et al., 2002). En este sentido, en un estudio de conservación de lubina no se observaron diferencias significativas en el contenido de TVBN hasta que los recuentos microbianos de aerobios totales alcanzaron niveles próximos a los límites legales (10^6 ufc/g) (Cakli et al., 2007). En este caso los recuentos de aerobios mesófilos, tal y como se expuso en el apartado 5.1., se situaron entorno a los límites legales a los nueve días de almacenamiento y sin embargo los valores de TVBN no muestran diferencias significativas hasta los 15 días de almacenamiento. Además, considerando el límite legal para el TVBN establecido por la Unión Europea (CEE, 2008) de 35 mg TVBN/100 g de pescado se observa que las muestras almacenadas en refrigeración no sobrepasaron dicho límite a lo largo de los 15 días de almacenamiento. La concentración de TVBN en pescado fresco está entre 5 y 20 mg TVBN/100 g de pescado, mientras que niveles de 30-35 mg TVBN/100 g de pescado se asocia con el límite de aceptabilidad (Connell, 1995).

Finalmente, los valores de pH (Figura V.7.) también sufrieron un ligero incremento durante los 15 días de almacenamiento sin mostrar diferencias significativas ($p > 0,05$). Al inicio del almacenamiento el pH fue de 6,26 y se incrementó hasta 6,37 a los 15 días. Este incremento de pH coincide con el incremento de TVBN en los filetes y posiblemente esté asociado también al crecimiento microbiano que se produce al final del almacenamiento.

5.2.2. Propiedades ópticas

En la Figura V.8. se muestra la evolución de las coordenadas colorimétricas (L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^*) durante el almacenamiento de los filetes de dorada en refrigeración.

El valor obtenido para la luminosidad (L^*) al inicio del almacenamiento fue de 35(2), alcanzando 39(5) después de 15 días. Tal y como se observa en la figura, tanto la luminosidad (L^*) como el croma (C_{ab}^*) no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) durante el tiempo estudiado. Los valores de a^* fueron aumentando mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) a los 15 días de almacenamiento. Los valores de b^* variaron de 0,38(0,1) a -2,1(0,7), mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el valor inicial y el resto de valores obtenidos durante el almacenamiento. Por otra parte, h_{ab}^* también se incrementó de forma significativa a partir del tercer día, permaneciendo estable hasta el final del periodo estudiado. El almacenamiento produjo un ligero cambio en el color de los filetes de dorada que se tradujo fundamentalmente en una reducción de la coordenada b^* .

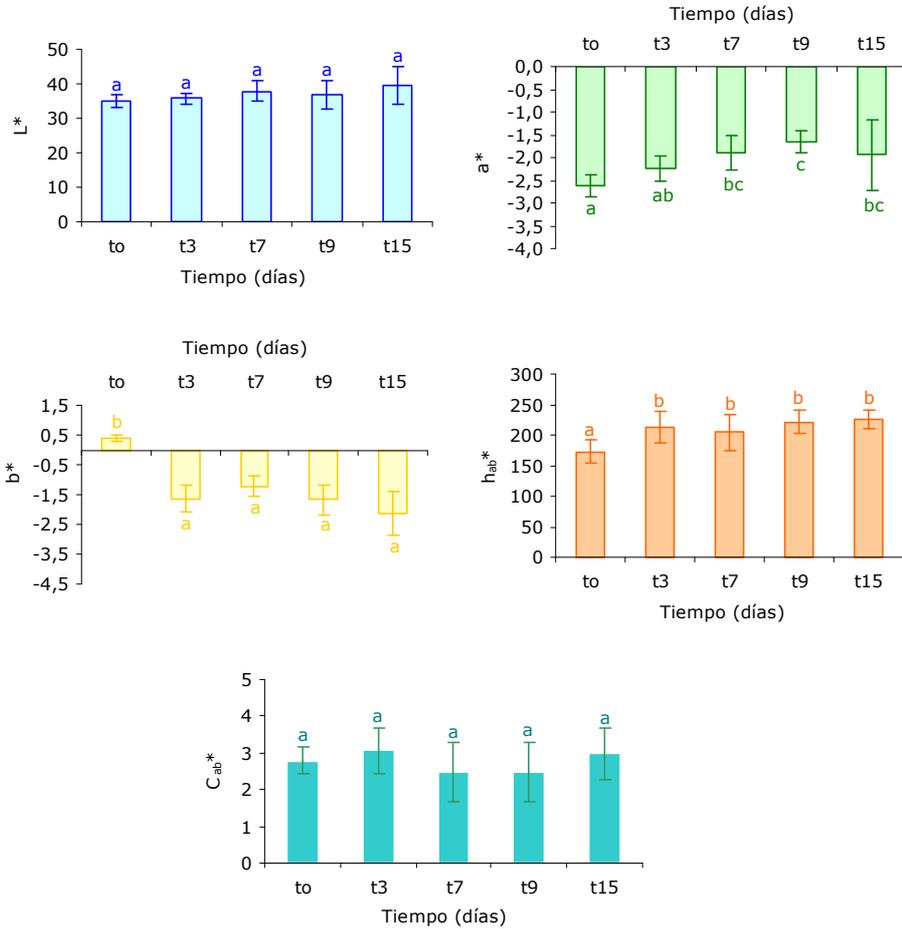


Figura V.8. Evolución de las coordenadas colorimétricas (L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^*) durante el almacenamiento de los filetes de dorada (*Spaurs aurata*) en fresco.

5.3. Caracterización del desarrollo de *L. lactis* en diferentes medios de cultivo.

En este apartado el objetivo fue seleccionar un medio apto para su incorporación en alimentos, en el que se lograra un buen desarrollo de *L. lactis* y una elevada actividad antimicrobiana, así como, determinar el tiempo de incubación necesario para lograr

una máxima producción de metabolitos con actividad antimicrobiana.

Para ello, se obtuvieron las curvas de crecimiento de dicho microorganismo en cuatro medios de crecimiento: MRS e YGLPB como medios de referencia aptos para el desarrollo de bacterias lácticas y dos medios diseñados en estudios previos a este trabajo, óptimo 1 y óptimo 2, cuya composición se describe en las tablas V.3. y V.4. del apartado 4.1.4.

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento, tal y como se detalla en el apartado 4.2.3.2. de materiales y métodos del presente capítulo, se modelizaron siguiendo el modelo de Baranyi utilizando el programa DMFit (Barany y Roberts, 1994) con la finalidad de determinar los parámetros característicos de crecimiento: velocidad de crecimiento (μ_{\max}), tiempo de latencia (λ) y máxima densidad poblacional (Y_{\max}). En la Figura V.9. se muestran las curvas de crecimiento de *L. lactis* en los cuatro medios estudiados.

En la Figura V.9. se muestra la modelización de las curvas de crecimiento de *L. lactis* en los cuatro medios estudiados.

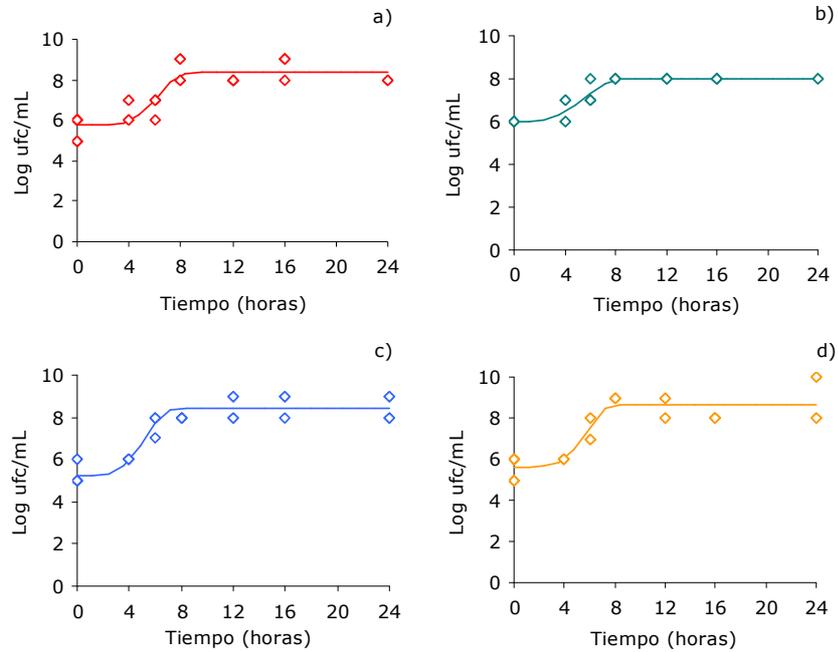


Figura V.9. Modelización de las curvas de crecimiento de *L. lactis* en los cuatro medios en estudio: a) MRS, b) YGLPB, c) óptimo 1 y d) óptimo 2.

A partir de las curvas mostradas en la Figura V.9. se obtuvieron los parámetros característicos del proceso de crecimiento del microorganismo en estudio en los cuatro medios analizados (Tabla V.8.).

Tabla V.8. Parámetros de crecimiento de *L. lactis* en los cuatro medios de cultivos analizados.

Parámetros de crecimiento						
Medio	μ (Log ufc/mL.h)	λ (h)	$Y_{inicial}$ (Log ufc/mL)	$Y_{m\acute{a}x}$ (Log ufc/mL)	se	R^2
MRS	0,77	4,45	5,78	8,35	0,56	0,81
YGLPB	0,43	2,97	6,00	8,02	0,25	0,93
óptimo 1	0,92	3,26	5,25	8,41	0,46	0,90
óptimo 2	1,01	4,10	5,62	8,62	0,60	0,84

Tal y como puede observarse en la Figura V.9. en el crecimiento de *L. lactis* se detectó fase de latencia (λ) (Tabla V.8.) para todos los medios en estudio observándose una menor duración de dicha fase en el medio YGLPB mientras que en el medio MRS fue dónde se obtuvo la mayor duración para dicha fase. Los valores obtenidos para los dos medios en estudio (óptimo 1 y óptimo 2) fueron intermedios a los observados para los dos medios de referencia anteriormente mencionados (YGLPB y MRS). El medio YGLPB es el medio de referencia aconsejado por la Colección Española de Cultivos Tipo para este microorganismo, esto explicaría la menor duración de la fase de latencia en dicho medio.

En cuanto a la velocidad de crecimiento (μ) (Tabla V.8.) de *L. lactis* se pudo observar que ésta fue mayor cuando los medios ensayados fueron el óptimo 1 y óptimo 2. Los medios óptimo 1 y óptimo 2 fueron los que originaron la máxima densidad poblacional ($Y_{\text{máx}}$ óptimo 1=8,41 Log ufc/mL; $Y_{\text{máx}}$ óptimo 2=8,62 Log ufc/mL). Por lo tanto, en lo referente a los parámetros de crecimiento, los dos medios estudiados en este trabajo (óptimo 1 y 2) ocasionaron un crecimiento similar o incluso superior al observado en los dos medios de referencia.

En las curvas de crecimiento (Figura V.9.) se puede observar que a las 8 horas es cuando se inicia la fase de crecimiento estacionario. Este dato es importante tenerlo en cuenta puesto que, según la bibliografía (Zúñiga, 2002), la mayor producción de sustancias antimicrobianas se produce cuando los microorganismos están en fase exponencial. Durante esta fase, se produce la máxima actividad microbiana ya que la cantidad de nutrientes es máxima y las células se encuentran en plena multiplicación. En la siguiente fase (estacionaria) el crecimiento se detiene debido al agotamiento de los nutrientes o a algún producto de desecho que

llega a ser inhibidor, cesando su crecimiento exponencial (Zúñiga, 2002; Mossel et al., 2003). Teniendo en cuenta este aspecto, se procedió a analizar con más detalle el crecimiento alcanzado a las 4 y 6 horas de incubación puesto que es el periodo de crecimiento exponencial para las condiciones de estudio. A tal efecto, se realizó un análisis de la varianza considerando los factores medio de crecimiento y tiempo. Los resultados obtenidos únicamente mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al tiempo de incubación, siendo en todos los casos mayores los niveles de crecimiento detectados a las 6 horas. Así, se puede decir que para los dos tiempos analizados, correspondientes a la fase exponencial de crecimiento, el medio de cultivo usado no afectó al desarrollo de los microorganismos y la cepa creció hasta alcanzar niveles similares.

Aunque según los resultados obtenidos se lograría un mayor desarrollo de la cepa a las 6 horas de incubación, no obstante, sería necesario asegurarse de que tras este periodo de incubación también se alcanza una mayor actividad antimicrobiana por lo que se procedió a estudiar su actividad *in vitro*.

5.4. Actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis*. Estudio *in vitro*

En el apartado 5.3. se ha mostrado la curva de crecimiento y los parámetros característicos de este proceso para la cepa estudiada. Sin embargo, es necesario conocer la capacidad que tiene dicha cepa, *Lactococcus lactis*, de producir sustancias antimicrobianas. Diversos estudios (Zúñiga, 2002; Mossel et al., 2003) indican que la mayor producción de dichas sustancias se da en la fase exponencial de la curva de crecimiento, tal y como se ha indicado anteriormente. Por lo tanto, y en base a los resultados

obtenidos en el apartado 5.3., se analizó la actividad antimicrobiana a las 4 y 6 horas de incubación de los microorganismos en estudio en los diferentes medios de crecimiento seleccionados para el presente trabajo (MRS, YGLPB, óptimo 1 y óptimo 2). La actividad antimicrobiana se analizó considerando dos tipos de sustrato obtenidos del crecimiento de *L. lactis* en los diferentes medios de cultivo. Por un lado, se estudió el cultivo celular (CC) compuesto por el caldo de fermentación e integrado por *L. lactis* y sus metabolitos y por otro lado el sustrato parcialmente purificado (SPP), obtenido a partir del mismo caldo de fermentación sometido a un proceso de purificación parcial para inactivar a los microorganismos. En todos los casos la actividad antimicrobiana se evaluó utilizando un patrón de nisina lo que permite poder cuantificar la actividad bactericida/bacteriostática del microorganismo y/o sus productos metabólicos con posible capacidad bioconservante utilizados en el presente estudio.

La actividad antimicrobiana, in vitro, se evaluó frente a tres microorganismos diana: *Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei* y *Bacillus cereus* (Uhlman et al., 1992; Van Reenen et al. 1998; Bogovic-Matijasic et al., 1998), siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.2 de materiales y métodos del presente capítulo.

La elección de estos microorganismos se hizo atendiendo a diversos criterios. *L. innocua* se utilizó como marcador de *L. monocytogenes*. La listeriosis es un problema emergente para la industria alimentaria como consecuencia del aumento de la incidencia, en los países desarrollados, de epidemias asociadas al consumo de alimentos contaminados con éste microorganismo (González y Suarez, 2011). Diversos estudios indican que *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria* se detectan habitualmente en los productos de la pesca, incluido el pescado

fresco (Embarek, 1994; Davies et al., 2001; González-Rodríguez et al., 2002; AESAN, 2009). Por otra parte, *Bacillus cereus* es un microorganismo asociado a enfermedades de origen alimentario en las que suele estar involucrado, entre otros alimentos, el pescado (Embarek, 1994; Davies et al., 2001; González-Rodríguez et al., 2002; AESAN, 2009). Finalmente, *Lactobacillus sakei* es un microorganismo de los denominados alterantes, contrariamente a *Listeria* y *Bacillus cereus* que suelen englobarse dentro del grupo de microorganismos patógenos. *L. sakei* junto con *L. curvatus* y *Carnobacterium piscicola* son las bacterias ácido lácticas mayoritarias en los procesos de degradación de los productos de la pesca (Joffraud et al., 2001; Lyhs et al., 2002). Además, es conveniente recalcar que tradicionalmente se ha considerado que las bacteriocinas son bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto ha sido modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon et al., 2000). Por lo tanto las razones anteriormente expuestas llevaron a seleccionar a *L. sakei* como microorganismo indicador junto con *L. innocua* y *B. cereus*.

5.4.1. Patrón dosis-respuesta de nisina

La nisina se viene utilizando en la preservación de alimentos desde hace más de 50 años. En 1983 fue incluida en la lista europea de aditivos alimentarios con el número E-234 (Directiva 83/463/ECC de Julio 1983) y en 1988 su utilización fue aprobada por la FDA (American food y drug Administration) (Anonymous, 1992) y clasificada como una sustancia GRAS (General Recognized as safe) (Vázquez, 2001). La nisina es considerada un aditivo y no

un compuesto natural puesto que suele utilizarse como conservante en concentraciones que exceden a las que suelen presentarse en los productos fermentados con microorganismos starters productores de bacteriocinas (Cleveland et al., 2001). Con la finalidad de cuantificar la actividad antimicrobiana de la cepa bacteriana en estudio (*L. lactis*) se utilizó como patrón la nisina (única bacteriocina de origen natural permitida por la legislación). Para ello, se obtuvieron las relaciones dosis-respuesta de nisina (Figura V.10, V.11. y V.12.) frente a los tres microorganismos indicadores considerados en este trabajo (*L. innocua*, *L. sakei* y *B. cereus*).

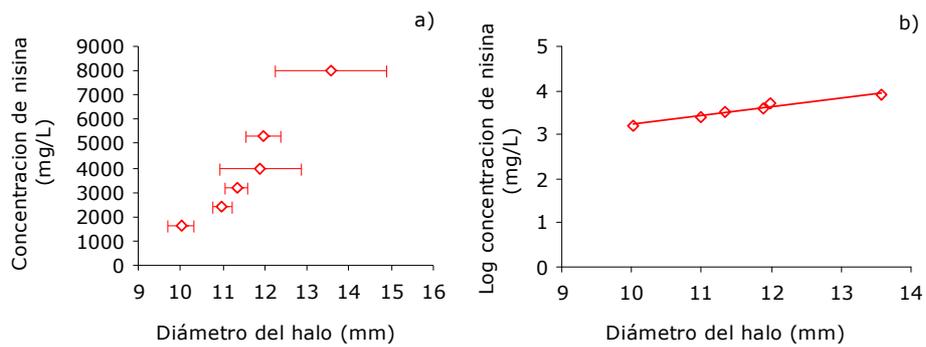


Figura V.10. Actividad antimicrobiana de la nisina frente a *Listeria innocua*: a) halo de inhibición generado para las distintas concentraciones de nisina analizadas y b) ajuste lineal y ecuación que relaciona la concentración de nisina y el halo de inhibición.

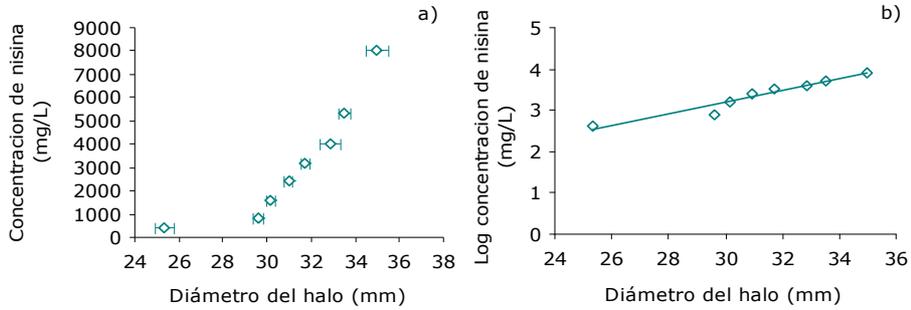


Figura V.11. Actividad antimicrobiana de la nisina frente a *Lactobacillus sakei*: a) halo de inhibición generado para las distintas concentraciones de nisina analizadas y b) ajuste lineal y ecuación que relaciona la concentración de nisina y el halo de inhibición.

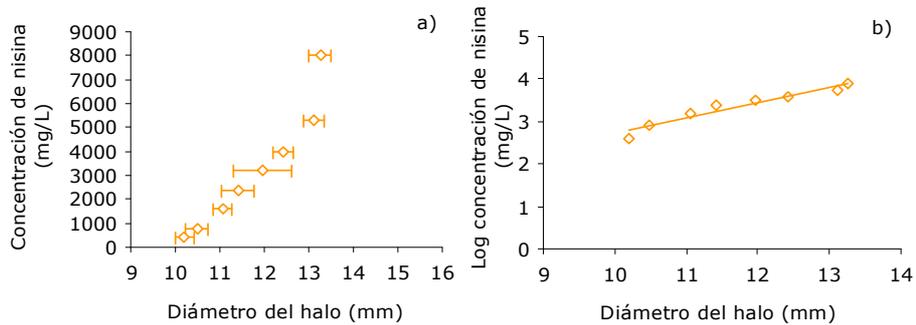


Figura V.12. Actividad antimicrobiana de la nisina frente a *Bacillus cereus*: a) halo de inhibición generado para las distintas concentraciones de nisina analizadas y b) ajuste lineal y ecuación que relaciona la concentración de nisina y el halo de inhibición.

Al analizar el efecto de las diferentes dosis de nisina frente a *L. innocua* (Figura V.10.), considerando el halo de inhibición producido, tras un periodo de incubación de 24 horas a 37 °C, se observó que la concentración mínima con efecto inhibitorio fue de

1600 mg/L de nisina (Figura V.10.a). El comportamiento descrito, se ajustó a una ecuación lineal considerando las concentraciones de nisina analizadas en unidades logarítmicas (Figura V.10.b.).

El análisis estadístico realizado considerando la concentración de nisina mostró que las concentraciones elevadas de nisina (2400 a 8000 mg/L) producían un efecto inhibitorio similar sobre *B. cereus* y sobre *L. innocua*, mientras que a concentraciones bajas (400 a 1600 mg/L) la respuesta de estos dos microorganismos diana variaba. Así, a concentraciones de 800 y 400 mg/L no se observó actividad antimicrobiana de la nisina sobre *L. innocua* apareciendo el primer halo de inhibición a la concentración de 1600 mg/L. Otro aspecto a destacar es que a partir de 5300 mg/L de nisina no se detectó un incremento significativo ($p > 0,05$) de la actividad antimicrobiana en el caso de *B. cereus* y *L. innocua*.

En el caso de *L. sakei* todas las concentraciones estudiadas mostraron actividad antimicrobiana observándose un incremento continuado de dicha actividad al aumentar la dosis de nisina. La mínima concentración analizada (400 mg/L) produjo un halo de inhibición de 25,36 mm. Además, como se aprecia en la Figura V.11., mínimos incrementos en la concentración (hasta 1000 mg/L) produjeron un incremento elevado en el halo generado. De 400 a 800 mg/L se produjo un incremento de 25,4 a 29,6 mm, mientras que a partir de 800 mg/L, el efecto ya no se vio tan marcado, obteniéndose un halo de 30,2 mm para una concentración de 1600 mg/L. El efecto bacteriostático/bactericida de la nisina frente a *L. sakei* fue muy superior al detectado para las otras dos cepas diana utilizadas en este estudio (*L. innocua* y *B. cereus*).

Los resultados anteriores indican que la nisina tiene mayor efecto inhibitorio sobre *L. sakei*, seguido de *B. cereus* y *L. innocua*.

En la Tabla V.9. se muestran las ecuaciones correspondientes a los ajustes lineales obtenidos a partir de las rectas correspondientes a las representaciones del logaritmo de la concentración de nisina versus al diámetro de halo de inhibición frente a las tres cepas indicadoras (Figura V.10.b, V.11.b y V.12.b). Estas ecuaciones permitirán cuantificar la actividad antimicrobiana del microorganismo bioconservante estudiado en los siguientes apartados, respecto al patrón de nisina permitiendo establecer una correlación entre el diámetro del halo de inhibición producido por *L. lactis* y/o sus productos metabólicos y la cantidad de nisina equivalente.

Tabla V.9. Ecuaciones correspondientes a los ajustes lineales obtenidos a partir de las rectas correspondientes a las representaciones del Log de la concentración de nisina versus diámetro de halo de inhibición frente a las tres cepas indicadoras (*L. innocua*, *L. sakei* y *B. cereus*).

Microorganismo	Nº	Ecuación	R ²
<i>L. innocua</i>	1	$y = 0,204x + 1,1805$	0,9511
<i>L. sakei</i>	2	$y = 0,1437x - 1,1235$	0,9481
<i>B. cereus</i>	3	$y = 0.3655x - 0.9381$	0,9319

Nº= número de la ecuación

y = Equivalente de nisina (Log mg/L)

x = diámetro del halo (mm)

5.4.2. Actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* frente a las cepas diana: *Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei* y *Bacillus cereus*

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antimicrobiana de la cepa bioprotectora (*L. lactis*) frente a las cepas diana (*L. innocua*, *L. sakei* y *B. cereus*). En

el apartado 5.3. se vio que a las 4 y 6 horas de incubación *L. lactis* se encuentra en fase exponencial de crecimiento donde se supone que poseen la máxima actividad antimicrobiana (Zúñiga, 2002), independientemente del medio de cultivo en el que se hayan desarrollado. Por lo tanto, se utilizó dicha cepa tras 4 y 6 horas de incubación tanto en los dos medios de referencia MRS y YGLPB como en los dos medios formulados óptimo 1 y óptimo 2 (CC: cultivo celular). Por otro lado, y considerando que la actividad antimicrobiana es debida en gran medida a los productos metabólicos producidos por dichas cepas se analizaron también los sustratos obtenidos tras dichos tiempos de incubación, parcialmente purificados y libres de células (SPP: sustrato parcialmente purificado). La actividad de los productos metabólicos procedentes de microorganismos bioconservantes ha sido estudiada fundamentalmente frente a cepas diana, pero son muy pocos los estudios relativos a su comportamiento frente a la microbiota presente en los alimentos. Dichos estudios mencionan una reducción considerable de la actividad antimicrobiana e incluso la no detección de dicha actividad (Aasen et al., 2003).

5.4.2.1. Espectro de la actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* frente a las cepas diana: *Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei* y *Bacillus cereus*

En la Tabla V.10. se muestra de forma resumida el espectro de actividad antimicrobiana de los cultivos celulares y de los sustratos parcialmente purificados frente a los tres microorganismos diana analizados en el presente trabajo.

Tabla V.10. Resumen del espectro de actividad antimicrobiana del cultivo celular (CC) y sustrato parcialmente purificado (SPP) de *Lactococcus lactis* frente a los tres microorganismos diana (*Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei* y *Bacillus cereus*).

m.o. diana	Sustrato-Medio crecimiento	4 h. incubación	6 h. incubación
<i>Listeria innocua</i>	CC-MRS	-	-
	SPP-MRS	-	-
	CC-YGPLB	-	-
	SPP-YGPLB	-	-
	CC-óptimo 1	-	-
	SPP-óptimo 1	-	-
	CC-óptimo 2	-	-
	SPP-óptimo 2	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	CC-MRS	+	+
	SPP-MRS	-	-
	CC-YGPLB	+	+
	SPP-YGPLB	-	-
	CC-óptimo 1	+	+
	SPP-óptimo 1	-	+
	CC-óptimo 2	+	+
	SPP-óptimo 2	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	CC-MRS	-	+
	SPP-MRS	-	-
	CC-YGPLB	-	-
	SPP-YGPLB	-	-
	CC-óptimo 1	+	+
	SPP-óptimo 1	-	-
	CC-óptimo 2	+	+
	SPP-óptimo 2	-	-

-: sin actividad antimicrobiana.

+: con actividad antimicrobiana.

Los resultados obtenidos indican que *Lactococcus lactis* no presentó actividad antimicrobiana frente a *L. innocua*, independientemente del medio de crecimiento utilizado y de que el sustrato analizado sea el cultivo celular (CC) o el sustrato parcialmente purificado (SPP). Este hecho, además, se evidencia tanto tras 4 como 6 horas de incubación. Sin embargo, esta cepa sí que presentó actividad antimicrobiana frente a *Lactobacillus sakei* y a *Bacillus cereus*.

Al analizar el comportamiento del *L. lactis* frente a *L. sakei*, se observó que cuando el microorganismo bioprotector se incubó durante 4 horas únicamente se detectó actividad antimicrobiana en el caso de los cultivos celulares y no para los sustratos parcialmente purificados y esto para todos los medios de cultivo estudiados. Por el contrario, tras 6 horas de incubación los cultivos celulares siguieron presentando actividad antimicrobiana y también se detectó dicho efecto para los sustratos parcialmente purificados obtenidos utilizando los medios óptimo 1 y óptimo 2.

Frente a *B. cereus*, únicamente se observó actividad antimicrobiana a las 4 horas de incubación con los cultivos celulares obtenidos a partir de los medios denominados como óptimos y a las 6 horas el comportamiento fue similar aunque también se observó efecto para el cultivo celular obtenido utilizando MRS como medio de crecimiento.

Por lo tanto, y en base a lo comentado anteriormente, *L. lactis* inhibiría el crecimiento, en determinadas condiciones de cultivo, de *L. sakei* y *B. cereus*.

5.4.2.2. Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* frente a las cepas diana (*Lactobacillus sakei* y *Bacillus cereus*)

Una vez seleccionados los extractos con actividad antimicrobiana se procedió a cuantificar dicha actividad. En la Figura V.13. se muestran los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para los cultivos celulares y los sustratos parcialmente purificados procedente de *L. lactis* y obtenidos tras 4 y 6 horas de incubación en los cuatro medios de cultivo ensayados (MRS, YGLPB, óptimo 1 y óptimo 2), frente a *B. cereus* y *L. sakei*.

Además, también se muestra el halo de inhibición obtenido para un patrón de nisina (2000 IU/mL).

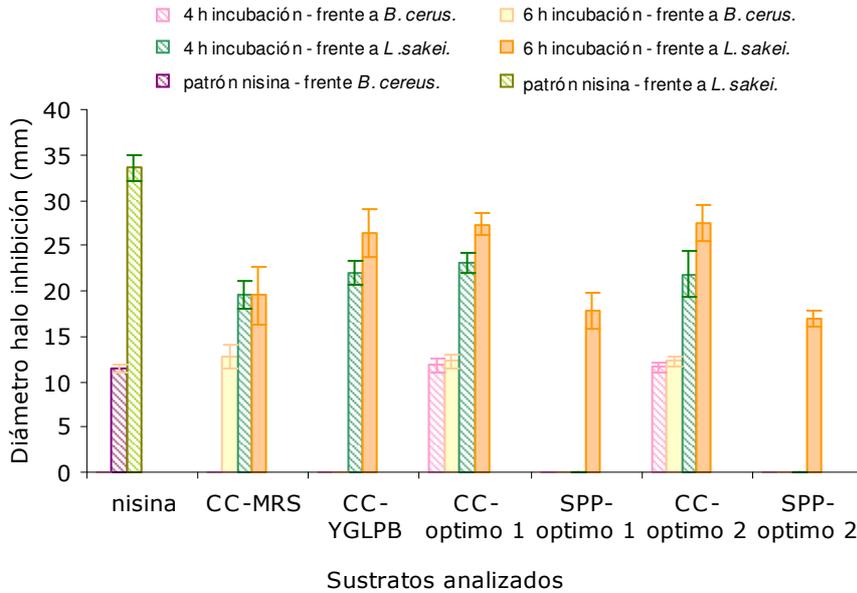


Figura V.13. Diámetros de los halos de inhibición (media y desviación estándar) obtenidos para los sustratos (CC:cultivo celular, SPP: sustrato parcialmente purificado), procedentes de *L. lactis*, obtenidos tras 4 y 6 horas de incubación en los cuatro medios de cultivo ensayados (MRS, YGLPB, óptimo 1 y óptimo 2), frente a *B. cereus* y *L. sakei*.

Como se puede observar en la Figura V.13., *L. lactis* ejerce una mayor actividad antimicrobiana frente a *L. sakei* que frente a *B. cereus*. Un comportamiento similar se observó para el patrón de nisina. Los sustratos estudiados, procedentes de *L. lactis*, frente a *L. sakei* presentaron menor actividad antimicrobiana que el patrón de nisina utilizado en este estudio. En el caso del sustrato obtenido por crecimiento de la cepa bioconservante en MRS la actividad

detectada no varió ($p > 0,05$) al incrementar el tiempo de incubación y fue inferior a la observada para el resto de los extractos obtenidos a partir de los otros medios de cultivo utilizados, excepto para los sustratos parcialmente purificados, presentando estos últimos una actividad ligeramente inferior. Cuando *L. lactis* se desarrolló en YGLPB o en los medios óptimos, la producción de sustancias antimicrobianas fue significativamente mayor tras 6 horas de incubación ($p \leq 0,05$). Además, el efecto inhibitor frente a *L. sakei* fue similar cuando se utilizó el medio óptimo 2 y el de referencia YGLPB ($p > 0,05$) y algo inferior al obtenido para el óptimo 1. Los únicos sustratos parcialmente purificados con actividad antimicrobiana fueron los obtenidos a partir de los medios óptimos para un periodo de incubación de *L. lactis* correspondiente a 6 horas. Así pues, *L. lactis* presentó mayor actividad antimicrobiana frente a *L. sakei* cuando se incubó durante 6 horas en el medio óptimo 2. Los sustratos parcialmente purificados solo fueron activos cuando se aislaron a partir de los cultivos obtenidos en los medios óptimos y tras 6 horas de incubación.

Al analizar la actividad antimicrobiana de *L. lactis* frente a *B. cereus* se observó que únicamente eran activos los sustratos que contenían células vivas del agente bioconservante presentando éstos una actividad ligeramente superior o igual al patrón de nisina. Las muestras que mayor efecto inhibitor presentaron fueron las obtenidas en los dos medios óptimos y en MRS tras 6 horas de incubación.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, los cultivos celulares obtenidos por crecimiento de *L. lactis* durante 6 horas en los medios óptimo 1 y 2, podrían ser considerados como bioconservantes de utilidad para evitar el desarrollo de

microorganismos patógenos como el *B. cereus* y alterantes como el *L. sakei*.

5.4.2.3. Actividad antimicrobiana del cultivo celular y sustrato parcialmente purificado de *Lactococcus lactis* frente a los tres microorganismos diana (*Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei* y *Bacillus cereus*) expresada como equivalentes de nisina (Log mg/L)

En la Tabla V.11. se muestra la actividad de los diferentes sustratos testados expresada como equivalentes de nisina (Log mg/L) en base a las fórmulas (Tabla V.9. Ecuaciones correspondientes a los ajustes lineales) obtenidas en el apartado 5.4.1.

Como se puede observar en la Tabla V.11. el medio en el que se obtiene unos valores mayores de equivalentes de nisina es el óptimo 2 con un tiempo de crecimiento de 6 horas, siendo los equivalentes de nisina frente a *L. sakei* de 2,86 Log mg/L y 3,56 Log mg/L frente a *B. cereus*. Puesto que estos valores no difirieron significativamente de los obtenidos para el medio óptimo y considerando la composición de ambos medios (apartado 4.1.4. del presente capítulo), se optó por el medio más económico y se decidió utilizar el *L. lactis* crecido en el medio óptimo 2 para realizar los ensayos *in vivo*. Por otra parte ya que los sustratos parcialmente purificados (SPP) no mostraron una actividad antimicrobiana elevada no se tuvieron en consideración para las pruebas *in vivo*.

Tabla V.11. Actividad antimicrobiana del cultivo celular y el sustrato parcialmente purificado de *Lactococcus lactis* frente a los tres microorganismos diana (*Listeria innocua*, *Lactobacillus sakei* y *Bacillus cereus*) expresada como equivalentes de nisina (Log mg/L).

m.o. diana	Sustrato-Medio crecimiento	4 h. incubación	6 h. incubación
<i>Listeria innocua</i>	CC-MRS	–	–
	SPP-MRS	–	–
	CC-YGPLB	–	–
	SPP-YGPLB	–	–
	CC-óptimo 1	–	–
	SPP-óptimo 1	–	–
	CC-óptimo 2	–	–
	SPP-óptimo 2	–	–
<i>Lactobacillus sakei</i>	CC-MRS	1,68	1,67
	SPP-MRS	–	–
	CC-YGPLB	2,05	2,65
	SPP-YGPLB	–	–
	CC-óptimo 1	2,20	2,80
	SPP-óptimo 1	–	1,43
	CC-óptimo 2	2,02	2,83
	SPP-óptimo 2	–	1,32
<i>Bacillus cereus</i>	CC-MRS	–	3,70
	SPP-MRS	–	–
	CC-YGPLB	–	–
	SPP-YGPLB	–	–
	CC-óptimo 1	3,38	3,53
	SPP-óptimo 1	–	–
	CC-óptimo 2	3,28	3,56
	SPP-óptimo 2	–	–

5.5. Actividad antimicrobiana de la nisina y *Lactococcus lactis in vivo*. Estudio microbiológico y físico-químicos de las muestras tratadas

En este apartado el objetivo fue analizar “in vivo” la influencia de la incorporación del *Lactococcus lactis* y nisina, como agentes bioconservantes, sobre la microbiota y parámetros físico-químicos de los filetes de pescado.

En base a los resultados obtenidos en los apartados anteriores se seleccionó, como medio óptimo para lograr tanto el adecuado

desarrollo de los microorganismos bioconservantes como una máxima capacidad inhibitoria, el medio óptimo 2.

El siguiente estudio se llevó a cabo sobre filetes de dorada impregnados, envasados y conservados en refrigeración durante 15 días. Las muestras fueron impregnadas con una disolución obtenida por crecimiento de *L. lactis* durante 6 horas en el medio óptimo 2, y se utilizaron como referencia muestras impregnadas con una solución de nisina (2000 mg/L). Para seleccionar la concentración de la solución de nisina se tuvieron en cuenta los resultados del apartado 5.4.1. donde se vio que a partir de concentraciones de 1600 mg/L de nisina se obtenía inhibición frente a microorganismos diana.

La impregnación a vacío se realizó en el equipo descrito en el apartado 4.4.1. de materiales y métodos del capítulo III y siguiendo la metodología descrita en el punto 4.2.7.1 del presente capítulo.

Hay que tener en cuenta que el porcentaje de impregnación conseguido mediante la operación a vacío depende de varios factores como son la presión de trabajo, la viscosidad de la solución de impregnación, pero sobre todo las características de la matriz a impregnar (Chiralt et al., 2001; Gras et al., 2002; Betoret et al., 2003). En el caso de los alimentos depende de la porosidad total (% poros de la matriz) así como su tamaño, tortuosidad y distribución (Chiralt et al., 2001; Betoret et al., 2003). En los productos de pescado, la estructura del músculo y la red vascular son los responsables de la respuesta del tejido a la impregnación a vacío. En la Figura V.14. se muestra una micrografía de cryo-SEM de una sección transversal de músculo de dorada. En ella se puede observar el endomisio alrededor de la miofibrillas, así como la estructura miofibrilar. En la estructura muscular, la fase gaseosa

está prácticamente ausente aunque los vasos sanguíneos podrían actuar como canales durante la impregnación a vacío. Sin embargo, la forma en la que el músculo se impregna con una solución externa todavía no se conoce con exactitud (Chiralt et al., 2001). Estas características hacen que el fenómeno de impregnación a vacío en tejidos animales presente una mayor dificultad.

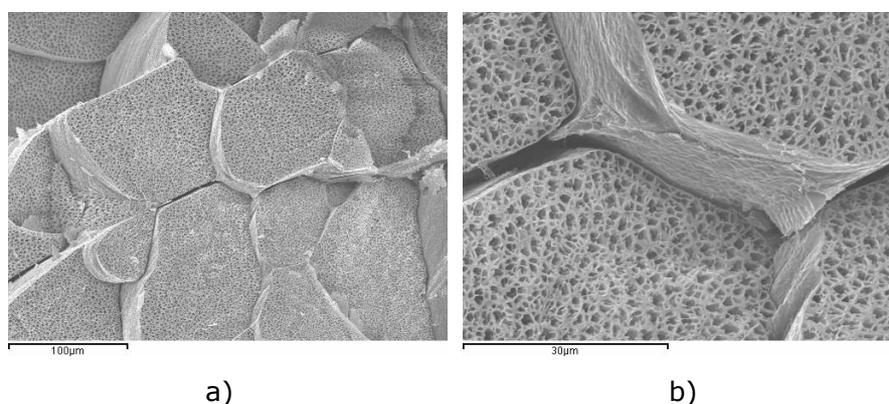


Figura V.14. Micrografía Cryo-SEM de filete de dorada. (a) x350, (b) x 2000.

En la Tabla V.12. se resumen los pesos iniciales de los filetes de dorada, el incremento de peso experimentado tras el proceso de impregnación y el porcentaje de impregnación, para los diferentes tratamientos analizados.

Tabla V.12. Peso inicial, incremento de peso y porcentaje de impregnación de los filetes de dorada sometidos a los distintos tratamientos de conservación. Valores promedio (SD).

Tratamiento	Peso inicial (g)	Incremento peso (g)	% Impregnación
Nisina	83 (11)	85,2 (11,5)	2,7 (0,4)
<i>L. lactis</i>	74 (9)	75,4 (9,0)	2,2 (0,7)

Como se puede observar, el porcentaje de impregnación en el filete es algo superior para el caso de la nisina debido a la menor viscosidad de la solución de nisina, pero en ambos casos son porcentajes bajos que no alcanzan el 3% de impregnación. Con estos porcentajes de impregnación el valor aproximado que se incorporó al filete fue de $2,16 \cdot 10^7$ ufc/100 g pescado para las BAL y 5294 IU de nisina/100 g pescado (0,13 mg nisina/100 g pescado).

5.5.1. Evolución de la microbiota de los filetes de dorada (*Sparus aurata*), impregnados a vacío con nisina, durante el almacenamiento en refrigeración

La nisina es un polipéptido de bajo peso molecular producido por *Lactococcus lactis*. Presenta un amplio espectro de acción, siendo activa frente a un amplio grupo de bacterias Gram-positivas (Thomas y Delves-Broughton, 2005). Algunos autores han concluido que la nisina es un agente antilisteria efectivo en salmón ahumado, especialmente cuando éste es envasado en una atmósfera de dióxido de carbono (Nilsson et al., 1997; Szabo y Cachill, 1999). Nykanen et al. (2000) mostraron que la nisina y el lactato de sodio actuaron sinérgicamente inhibiendo el crecimiento de listeria cuando la inyectaron en trucha antes del tratamiento de ahumado. Determinaron además que el tratamiento antimicrobiano no afectó a la calidad sensorial del pescado, que permaneció aceptable para un panel sensorial durante una semana de almacenamiento mostrando mejores resultados que las muestras sin tratamiento. Son numerosos los estudios realizados sobre nisina (Al-Holy et al., 2004; Al-Holy et al., 2005; Budu-Amoako et al., 1999), nisina combinada con otras bacteriocinas (Einarsson y Lauzon, 1995; Boutterfroy y Milliere, 2000), efectividad de la nisina en función del proceso de aplicación (Chi-Zang et al., 2004), todos

ellos con el fin de biopreservar alimentos de origen marino, y los resultados obtenidos son positivos en todos los casos.

En este apartado se presentan los resultados de los recuentos obtenidos en filetes de dorada tratados con una solución de nisina durante 15 días de almacenamiento.

Así pues, en la Figura V.15. se pueden observar los recuentos obtenidos para aerobios mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en las muestras de filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados a vacío con nisina y almacenados en refrigeración durante 15 días.

Tal y como muestra la Figura V.15., en los filetes impregnados con nisina, el recuento inicial de aerobios mesófilos fue de 2,63(0,08) Log ufc/g, alcanzando valores de 5,42(0,02) Log ufc/g a los 15 días de almacenamiento. El recuento de enterobacterias fue nulo hasta el día 10 alcanzando valores de 1,9(0,3) Log ufc/g a los 15 días de almacenamiento. Según los valores mostrados, tanto los recuentos obtenidos para aerobios mesófilos como para enterobacterias se encuentran dentro de los límites establecidos en la legislación (orden del 2 agosto 1991, BOE 15/8/91) a los 15 días de almacenamiento. Al comparar estos resultados con los obtenidos para las muestras no tratadas (apartado 5.1. del presente capítulo) se observa como la incorporación de nisina a los filetes de dorada estabiliza la microbiota aerobia mesofila por debajo de los límites legales. Además, el desarrollo de las enterobacterias es más tardío y los niveles alcanzados, al final del periodo de almacenamiento, son inferiores.

Por otra parte, se observa que la nisina reduce los niveles de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas respecto de las muestras no tratadas (apartado 5.1. del presente capítulo). Este resultado era de esperar puesto que las bacteriocinas suelen inhibir el

desarrollo de microorganismos filogenéticamente emparentados con el microorganismo que las produce (Sablon et al., 2000).

Por tanto, la impregnación a vacío de los filetes con nisina es una posibilidad para prolongar la vida útil de los filetes de dorada almacenados en refrigeración, para las condiciones en las que fueron manipulados y almacenados los filetes. Recordemos que la vida útil de los filetes de dorada en fresco sin tratamiento fue de diez días siendo los microorganismos aerobios mesófilos los limitantes.

En este caso los resultados obtenidos para *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* fueron negativos no apreciando crecimiento durante los 15 días de almacenamiento.

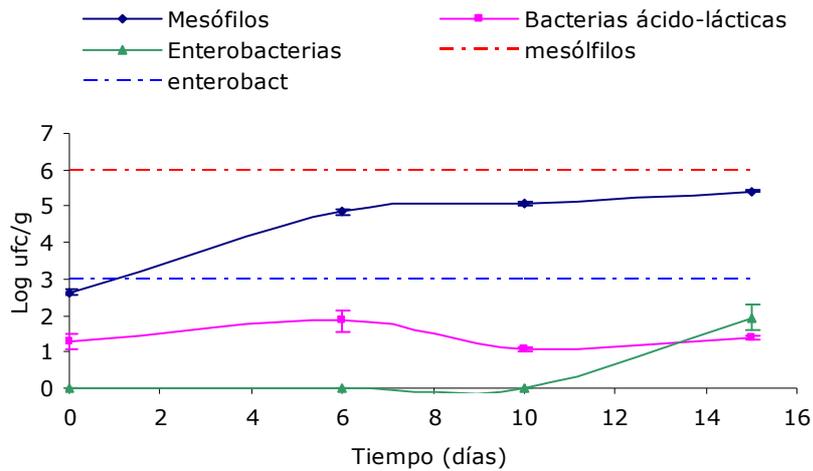


Figura V.15. Recuentos de aerobios mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en filetes de dorada (*Sparus aurata*), impregnados a vacío con nisina, durante el almacenamiento en refrigeración. Las líneas punteadas hacen referencia al valor marcado por la legislación española para cada microorganismo.

5.5.2. Evolución de la microbiota de los filetes de dorada (*Sparus aurata*), impregnados a vacío con *Lactococcus lactis*, durante el almacenamiento en refrigeración

Las bacterias ácido-lácticas, tal y como se ha explicado en la introducción del presente capítulo, constituyen un grupo de bacterias Gram-positivas no esporuladas. Son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración, son tolerantes a bajos pH y a altas concentraciones de sal y a la presencia de aditivos como el ácido láctico, etanol o ácido acético (Calo-Mata et al., 2007). Las bacterias ácido-lácticas pueden bioconservar los alimentos del crecimiento microbiano por competencia, por la producción de metabolitos antagonistas o por la formación de otros compuestos antimicrobianos (Schillinger et al., 1996; Stiles, 1996). El efecto conservante de dichas bacterias es debido a los compuestos que producen como resultado de su metabolismo, principalmente ácidos orgánicos, como ácido láctico, diacetilos, ácidos grasos, CO₂, peróxido, y bacteriocinas (Gibbs, 1987; Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1989; De Vuyst y Vandamme, 1994; Caplice y Fitzgerald, 1999). Las bacterias ácido lácticas pueden emplearse como cultivos bioprotectores que compiten con patógenos y otros organismos indeseables con el fin de incrementar la seguridad de los alimentos y prolongar su vida útil (Calo-Mata et al., 2007). A diferencia de los cultivos utilizados como starters, los cultivos biopretectores deben alterar las propiedades sensoriales del alimento lo menos posible (Schillinger et al., 1996). Como probióticos, las bacterias ácido-lácticas están siendo utilizadas cada vez más por su contribución a la salud y por la producción de metabolitos inhibidores (Stiles, 1996).

En este apartado se presentan los resultados de los recuentos obtenidos en filetes de dorada tratados con *Lactococcus lactis* durante 15 días de almacenamiento.

En la Figura V.16. se muestran los recuentos obtenidos durante el almacenamiento en refrigeración para los aerobios mesófilos, las bacterias ácido lácticas y enterobacterias. En este caso la impregnación de los filetes de dorada con *Lactococcus lactis* no mostró recuento de enterobacterias hasta el sexto día de almacenamiento, a partir del cual comenzaron a aumentar alcanzando valores de 2,68(0,04) Log ufc/g a los 15 de almacenamiento en refrigeración. No obstante, los recuentos de enterobacterias no sobrepasaron los límites establecidos por la legislación española durante el periodo de almacenamiento estudiado. Los niveles detectados al final del almacenamiento para este grupo microbiano fueron inferiores a los observados en muestras de pescado no tratadas (apartado 5.1.) y superiores a los detectados en las muestras con nisina (apartado 5.5.1.).

El crecimiento de aerobios mesófilos fue superior al observado en el caso de la nisina mostrando valores de 7,09(0,04) Log ufc/g al inicio del estudio, resultado que era de esperar puesto que los filetes habían sido impregnados con *Lactococcus lactis*. El recuento de bacterias ácido-lácticas por tanto fue elevado y el tratamiento no produjo los resultados esperados puesto que ya desde el inicio del almacenamiento los aerobios mesófilos sobrepasaron los límites legales. Desde este punto de vista, el uso de *Lactococcus lactis* para la prolongación de la vida útil de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) no sería viable. Cabe decir que en este apartado es posible que la referencia tomada de los límites legales no sea la más adecuada puesto que no se contempla el aumento de aerobios mesófilos que se va a producir por el tratamiento aplicado con

bacterias ácido-lácticas y por tanto sería necesario tener una legislación aplicada a los productos tratados con cultivos bioprotectores, que actualmente no existe. Tal y como muestra la Figura V.16., el recuento inicial de bacterias ácido-lácticas fue de 6,73(0,03) Log ufc/g y recordemos que tanto las muestras en fresco como las muestras tratadas con nisina mostraron recuentos iniciales de 2,32(0,03) y 1,26(0,02) Log ufc/g respectivamente. Partiendo de este valor inicial de bacterias ácido-lácticas era de esperar que los microorganismos mesófilos no entraran dentro de los límites que contempla la legislación española para pescado fresco.

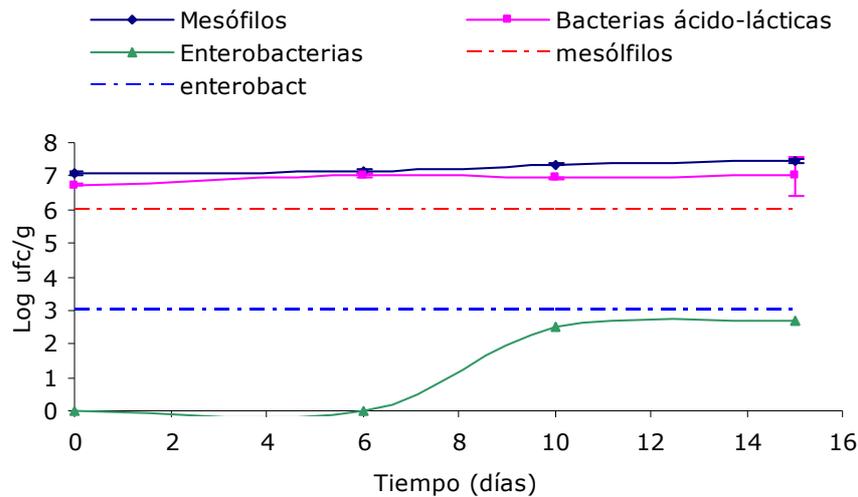


Figura V.16. Recuentos de aerobios mesófilos y bacterias ácido lácticas, en filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados a vacío con *Lactococcus lactis*, durante el almacenamiento en refrigeración. La línea punteada hace referencia al valor marcado por la legislación española para los microorganismos aerobios mesófilos.

No obstante se puede decir que, el tratamiento con *Lactococcus lactis* controló el crecimiento de aerobios mesófilos que se mantuvo prácticamente constante durante todo el periodo de almacenamiento estudiado presentando valores iniciales de 7,09(0,04) Log ufc/g y valores finales de 7,46(0,05) Log ufc/g.

Como en el caso de los filetes no tratados (apartado 5.1.) y de los tratados con nisina (apartado 5.5.1.) no se detectó presencia ni de *Salmonella* ni de *Staphylococcus auerus*.

5.5.3. Evolución de los parámetros físico-químicos durante el almacenamiento en refrigeración de filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados a vacío con nisina y con *Lactococcus lactis*

5.5.3.1. Humedad, actividad de agua, TVBN y pH

Conjuntamente con los recuentos microbiológicos se analizó la evolución de los parámetros físico-químicos de los filetes de dorada impregnados con nisina y con *Lactococcus lactis* durante el almacenamiento en refrigeración. La Figura V.17. muestra los valores obtenidos para los parámetros de actividad de agua, humedad, TVBN y pH. Para los parámetros físico-químicos se realizaron ANOVAS factoriales utilizando como factores el tiempo de almacenamiento y el tratamiento de impregnación (nisina o *Lactococcus lactis*). El valor promedio de humedad inicial para la muestra sin impregnar fue de 68,3(0,9) g agua/100 g pescado mientras que para las muestras impregnadas con nisina y con *Lactococcus lactis* fue significativamente superior ($p \leq 0,05$) mostrando valores de 71,2(0,5) g agua/100 g pescado y 70,6(0,5) g agua/100 g pescado respectivamente. Cabe recordar que las muestras experimentaron un 2,7% de impregnación para el caso

de la nisina y 2,2% para el caso de la impregnación con *Lactococcus* que justifica el mayor valor obtenido para la humedad en estas muestras. En el caso de la humedad, solo mostró un efecto significativo ($p \leq 0,05$) el tratamiento aplicado y el tiempo de almacenamiento no produjo cambios significativos ($p > 0,05$) en dicho parámetro.

Los valores iniciales de pH (Figura V.17.) fueron 6,27(0,08), 6,18(0,04) y 6,23(0,04) para las muestras sin impregnar, impregnadas con nisina y con *Lactococcus lactis* respectivamente, mostrando la frescura de los filetes de dorada. No se apreciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de pH debido al tratamiento de impregnación, siendo en este caso significativo el tiempo de almacenamiento. Los valores de pH se incrementaron a lo largo del almacenamiento para todas las muestras estudiadas, independientemente del tratamiento, mostrando diferencias significativas a los diez días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C. Dicho incremento de pH puede ir asociado a la producción de compuestos básicos como amonio, trimetilamina así como otras aminas biógenas debido al crecimiento microbiano (Boskou y Debevere, 2000; Kyrana et al., 1997; Masniyom et al., 2002; Ruíz-Capillas y Moral, 2001). A pesar de que no aparecieron diferencias significativas en los valores de pH de las muestras impregnadas, en las muestras impregnadas con *Lactococcus* se observaron valores de pH cercanos a 6,1 en muestras con altos recuentos de bacterias ácido-lácticas. Leroi et al. (1998) mostraron en sus estudios que *Lactococcus* es capaz de acidificar los productos hasta estos valores.

En cuanto a los valores de actividad de agua, tal y como muestra la Figura V.17., los valores iniciales fueron de 0,990(0,002) para las muestras sin impregnar, 0,983(0,002) para las muestras impregnadas con nisina y 0,983(0,001) para las

impregnadas con *Lactococcus lactis*. El tratamiento de impregnación produjo un descenso inicial de los valores de actividad de agua que en el caso de la impregnación con *Lactococcus lactis* podría ser debido a la composición del medio de impregnación que contenía cloruro sódico y otros compuestos que podrían haber hecho descender el valor de dicho parámetro. En este caso la interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento de impregnación tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la actividad de agua que mostró valores de 0,990(0,002) para la muestra sin impregnar, 0,989(0,002) para la muestra impregnada con nisina y 0,989(0,001) para la muestra con *Lactococcus lactis* después de 15 días de almacenamiento. A los seis días de almacenamiento los valores de las muestras impregnadas se incrementaron hasta alcanzar valores similares a los de las muestras sin impregnar.

Con respecto al TVBN (Figura V.17.), tanto para las muestras impregnadas con BAL como con nisina no se obtuvieron variaciones significativas ($p > 0,05$) durante el periodo de almacenamiento, presentando al final de dicho periodo valores de 11,1(0,7) mg de TVBN/100 g de muestra para las muestras impregnadas con nisina y 11,5(0,9) mg de TVBN/100 g de muestra para las muestras impregnadas con BAL.

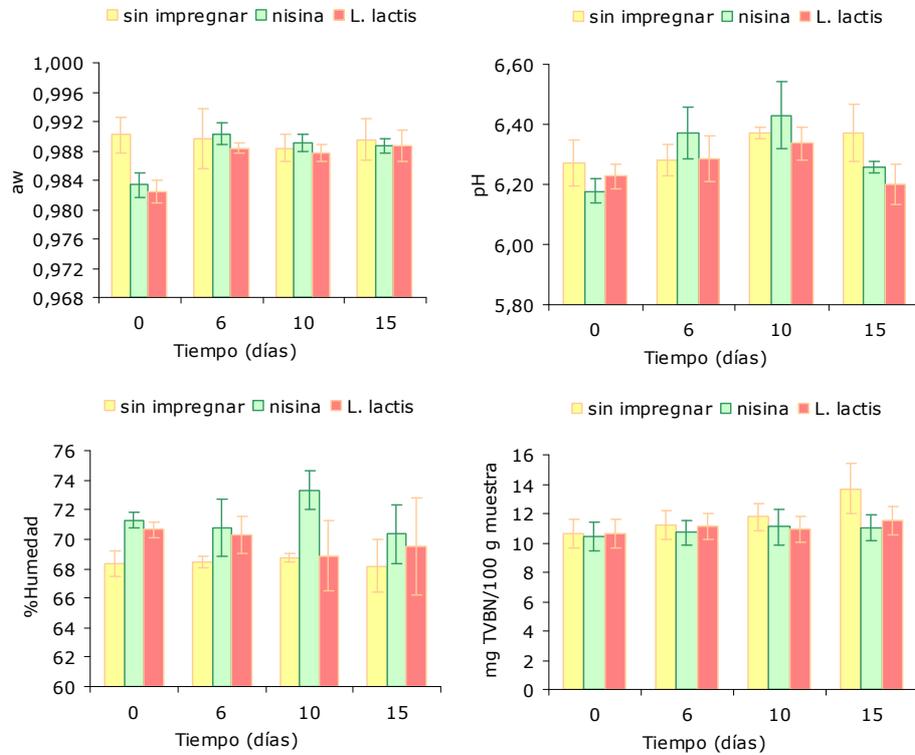


Figura V.17. Evolución de los parámetros de humedad, a_w , pH y TVBN durante el almacenamiento de los filetes de dorada (*Sparus aurata*) impregnados con nisina y con *Lactococcus lactis*.

5.5.3.2. Propiedades ópticas.

En la Figura V.18. se muestra la evolución de las coordenadas de color (L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^*) durante el almacenamiento en refrigeración a 4 °C durante 15 días de filetes de dorada (*Sparus aurata*) sin impregnar, impregnados con nisina y con *Lactococcus lactis*. Al inicio del almacenamiento los valores de L^* fueron 35(1) para la muestra sin impregnar, 36(1) para las muestras impregnadas con nisina y 38(2) para las impregnadas con *Lactococcus lactis*. El aumento de los valores de L^* por efecto del tratamiento están asociados con la impregnación de los filetes con

las respectivas soluciones de impregnación utilizadas para la nisina y los lactococos. Dichos valores se fueron incrementando significativamente ($p \leq 0,05$) a lo largo del tiempo de almacenamiento, alcanzando valores de 39(4) para las muestras sin impregnar, 38(1) para las muestras impregnadas con nisina y 39(2) para las muestras con *Lactococcus lactis*, a los 15 días. Resultados similares referentes al incremento de los valores de L^* durante el almacenamiento en hielo de dorada (*Sparus aurata*) y de lubina (*Dicentrarchus labrax*) han sido reportados por autores como Cakli et al. (2006a, 2006b, 2006c). Los valores de a^* fueron de -2,6(0,2) para las muestras sin impregnar, -1,8(0,2) para las muestras impregnadas con nisina y -2,2(0,3) para las muestras impregnadas con *Lactococcus lactis* al inicio del estudio. En el caso de la coordenada a^* la interacción entre el tiempo y el tratamiento empleado fue significativa ($p \leq 0,05$) siendo el tiempo el factor que más peso tuvo en dicha interacción. La nisina fue la que dio valores más bajos para la coordenada a^* indicando tonalidades más rojizas y este hecho se podría atribuir al color rojizo que presentaba la solución de impregnación con nisina. A los 15 días de almacenamiento los valores de a^* fueron de -1,9(0,7), -2,0(0,1) y -2,1(0,3) para las muestras sin impregnar, impregnadas con nisina e impregnadas con *Lactococcus* respectivamente.

Por otra parte, para los valores de b^* también fue la interacción entre el tiempo y el tratamiento empleado significativa ($p \leq 0,05$) siendo el tiempo el factor que más peso tuvo en dicha interacción. Los valores iniciales fueron 0,38(0,1), -2,1(0,1) y -1,8(0,1) para las muestras sin impregnar, impregnadas con nisina y con *Lactococcus* respectivamente.

La impregnación a vacío con nisina y *Lactococcus lactis* modificó el tono (h_{ab}^*) de las muestras con respecto a las muestras sin

impregnar incrementando los valores para dicha coordenada de forma significativa ($p \leq 0,05$), siendo los valores para la muestra sin impregnar de 172(15), 225(19) para la nisina, y 217(24) para el *Lactococcus*. Finalmente para el croma (C_{ab}^*) no aparecieron diferencias significativas ($p > 0,05$) debido a la impregnación con nisina o con lactococcus, ni tampoco aparecieron diferencias significativas después de 15 días de almacenamiento independientemente del tratamiento aplicado.

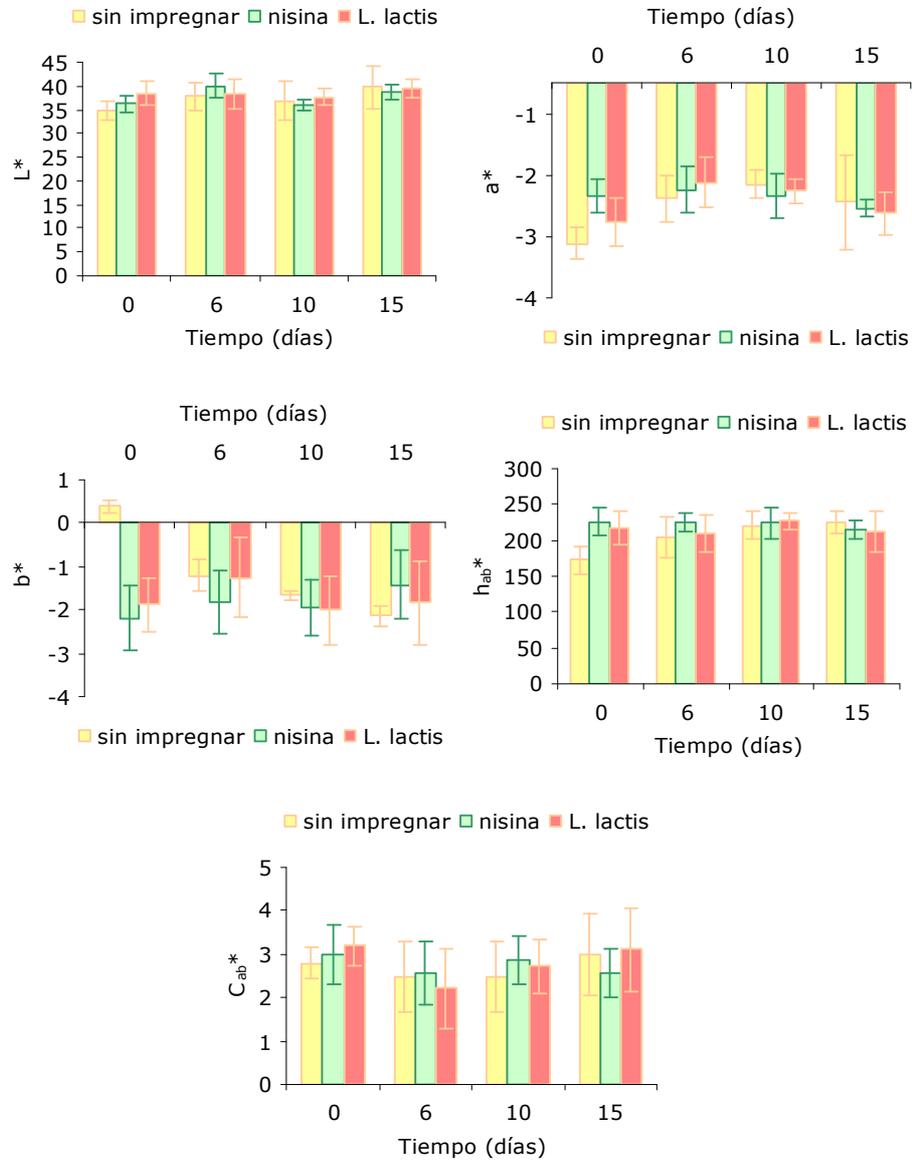


Figura V.18. Evolución de las coordenadas de color (L^* , a^* , b^* , h_{ab}^* y C_{ab}^*) durante el almacenamiento en refrigeración de filetes de dorada (*Sparus aurata*) sin impregnar, impregnados a vacío con nisina y con *Lactococcus lactis*.

V.6. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha evaluado la utilización de cultivos bioprotectores o bioconservantes, concretamente *Lactococcus lactis*, con el fin de prolongar la vida útil de filetes de dorada (*Sparus aurata*) envasados y almacenados en refrigeración.

1. Determinación de la vida útil microbiológica y físico-química de los filetes de dorada sin la utilización de ningún bioconservante

1.1. La vida útil de los filetes de dorada en fresco almacenados en refrigeración fue de aproximadamente nueve días siendo tanto los microorganismos aerobios mesófilos como las enterobacterias los limitantes, ya que sobrepasaron los límites marcados por la legislación. Los resultados obtenidos para *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* fueron negativos no apareciendo colonias durante los 15 días de almacenamiento.

1.2. En cuanto a la evolución de los parámetros físico-químicos durante el almacenamiento, los valores de humedad y de a_w no experimentaron cambios significativos durante los 15 días de almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, los valores de nitrógeno básico volátil (TVBN) se fueron incrementando significativamente durante el almacenamiento alcanzando valores de 13,69 mg TVBN/ 100 g de pescado a los 15 días.

1.3. El almacenamiento produjo un ligero cambio en el color de los filetes de dorada que se tradujo fundamentalmente en una reducción de la coordenada b^* .

2. Evaluación de las condiciones óptimas de crecimiento para la obtención del agente bioprotector (*Lactococcus lactis*). Utilización de la nisina como patrón

2.1. Los medios óptimo 1 y óptimo 2 fueron los que originaron la máxima densidad poblacional para *Lactococcus lactis*.

2.2. El efecto bacteriostático/bactericida de la nisina frente a *L. sakei* fue muy superior al detectado para las otras dos cepas diana utilizadas en este estudio (*L. innocua* y *B. cereus*), indicando que la nisina tiene mayor efecto inhibitor sobre *L. sakei*, seguido de *B. cereus* y *L. innocua*.

2.3. Los resultados obtenidos mostraron que *Lactococcus lactis* no presentó actividad antimicrobiana frente a *L. innocua*, independientemente del medio de crecimiento utilizado y de que el sustrato analizado fuera el cultivo celular (CC) o el sustrato parcialmente purificado (SPP). Este hecho, además, se evidenció tanto después de 4 como de 6 horas de incubación. Sin embargo, esta cepa sí que presentó actividad antimicrobiana frente a *Lactobacillus sakei* y a *Bacillus cereus*.

2.4. Al analizar el comportamiento del *L. lactis* frente a *L. sakei*, se observó que cuando el microorganismo bioprotector se incubó durante 4 horas únicamente se detectó actividad antimicrobiana en el caso de los cultivos celulares y no para los sustratos parcialmente purificados y esto para todos los medios de cultivo estudiados. Por el contrario, tras 6 horas de incubación siguieron presentando actividad antimicrobiana los cultivos celulares y los

sustratos parcialmente purificados obtenidos utilizando los medios óptimo 1 y óptimo 2.

2.5. Frente a *B. cereus*, únicamente se observó actividad antimicrobiana a las 4 horas de incubación con los cultivos celulares obtenidos a partir de los medios denominados como óptimos, y a las 6 horas el comportamiento fue similar aunque también se observó efecto para el cultivo celular obtenido utilizando MRS como medio de crecimiento.

2.6. El medio en el que *L. lactis* presentó unos mayores valores de inhibición frente a las cepas dianas fue el óptimo 2 con un tiempo de crecimiento de 6 horas. Puesto que, estos valores no difirieron significativamente de los obtenidos para el medio óptimo 1 y, considerando la composición de ambos medios, se optó por utilizar el medio más económico que es el óptimo 2. Por tanto el medio óptimo 2 fue el medio de crecimiento para *L. lactis* para realizar los ensayos *in vivo*.

2.7. Los sustratos parcialmente purificados (SPP) no mostraron una actividad antimicrobiana elevada por lo que no se tuvieron en consideración para las pruebas *in vivo*.

3. Estudio del efecto de la impregnación de filetes de dorada con biopreservantes sobre su vida útil. Como solución de impregnación se utilizó la obtenida por crecimiento de *L. lactis* durante 6 horas en el medio óptimo 2, y se utilizó como referencia muestras impregnadas con una solución de nisina (2000 mg/L)

3.1. El porcentaje de impregnación en el filete fue algo superior para el caso de la nisina (2,7%) frente a la solución con *L. lactis* (2,2%) debido a la menor viscosidad de la solución de nisina. Con estos porcentajes de impregnación el valor aproximado que se incorporó al filete fue de $2,16 \cdot 10^7$ ufc/100 g pescado para las BAL y 5294 IU de nisina/100 g pescado (0,13 mg nisina/100 g pescado).

3.2. En los filetes impregnados con nisina tanto los recuentos obtenidos para aerobios mesófilos como para enterobacterias se encontraron dentro de los límites establecidos en la legislación a los 15 días de almacenamiento. Por tanto, la impregnación a vacío de los filetes con nisina es una posibilidad para prolongar la vida útil de los filetes de dorada almacenados en refrigeración.

3.3. En la impregnación de los filetes de dorada con *Lactococcus lactis*, el recuento de microorganismos mesófilos no entró dentro de los recuentos que contempla la legislación española para pescado fresco, resultado que era de esperar puesto que los filetes habían sido impregnados con *Lactococcus lactis*.

3.4. El tratamiento con *Lactococcus lactis* controló el crecimiento de aerobios mesófilos que se mantuvo prácticamente constante durante todo el periodo de almacenamiento estudiado, lo que

puede hacer pensar que esta técnica podría resultar eficaz para controlar el crecimiento microbiano en el producto aunque habría que revisar la legislación para poder utilizar este tipo de técnicas en el desarrollo de productos probióticos a partir de pescado. El recuento de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* fue negativo también en este caso.

3.5. Durante el almacenamiento en refrigeración no se produjeron cambios importantes en las propiedades físico-químicas de los filetes.

3.6. La impregnación a vacío de los filetes con nisina y *L. lactis* es una posible técnica de biopreservación para prolongar la vida útil de filetes de dorada almacenados en refrigeración.

Este capítulo es la apertura de una línea de investigación en la utilización y aplicación de bioconservantes a productos de la pesca. Los resultados obtenidos muestran que estudios para evaluar la utilización de otros agentes bioconservantes, la utilización de manera conjunta con otros procedimientos de conservación como atmósferas protectoras, el uso de otras técnicas para su aplicación como microencapsulación, pulverización, etc. y el efecto del tratamiento térmico sobre los bioconservantes pueden dar lugar a nuevas tecnologías de interés en el sector acuícola.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

En la presente tesis doctoral se ha estudiado la aplicación de diferentes tecnologías para incrementar y diversificar productos de dorada (*Sparus aurata*) procedente de acuicultura. Las tecnologías objeto de estudio han sido la cocción y fritura a vacío, elaboración de texturizados y bioconservación.

VI.1. Estudio de los procesos de fritura y cocción a vacío de filetes de dorada (*Sparus aurata*)

Se ha estudiado el proceso de fritura y cocción en condiciones de vacío continuo de filetes de dorada (*Sparus aurata*) como alternativa a la fritura y la cocción tradicional.

1.1. Comparado con la fritura tradicional, la fritura a vacío de filetes de dorada puede suponer una reducción del contenido de grasa de las muestras y de la pérdida de humedad. La fritura a presión atmosférica produce una mayor pérdida de peso y encogimiento. No obstante, en el proceso de fritura a vacío el producto no adquiere los colores característicos de los productos fritos al trabajar a bajas temperaturas, con el efecto que ello puede tener en la aceptación del producto. Así pues el proceso de fritura a vacío para filetes de dorada puede ser una alternativa para la elaboración de preparaciones culinarias con dorada (*Sparus aurata*) con unos adecuados atributos composicionales.

1.2. De entre los tratamientos estudiados, la fritura a vacío a 110 °C y 25 kPa con un tiempo comprendido entre tres y cinco minutos es la que aporta un menor contenido graso con unas pérdidas de humedad, peso y encogimiento razonables, por lo que éstas

podrían ser unas condiciones adecuadas para la aplicación de dicho tratamiento.

1.3. Los diferentes tratamientos estudiados de cocción a vacío parecen no afectar al contenido total en proteínas y grasas del pescado, pero sí que pueden resultar interesantes para la conservación de algunos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados ya que además mantienen valores más elevados de humedad y presentan un menor encogimiento.

1.4. De entre los tratamientos estudiados, la cocción a vacío a 70 °C con tiempos superiores a 6 minutos podrían ser apropiados para conseguir productos más jugosos y con un adecuado perfil lipídico.

VI.2. Obtención de productos reestructurados a base de dorada (*Sparus aurata*)

Se ha estudiado y analizado el papel de la transglutaminasa microbiana (MTGasa) y la sal (NaCl) en las características de un producto reestructurado a base de dorada (*Sparus aurata*). Por otra parte se ha analizado el efecto de la adición de diferentes hidrocoloides (konjac glucomanano (KGM), carboximetilcelulosa sódica (CMC) y goma xantana) sobre la matriz proteica del gel de pescado.

2.1. La aplicación de 1% de NaCl junto con 0,3% de MTGasa permite obtener productos reestructurados con buenas propiedades texturales y atributos funcionales y sensoriales aceptables.

2.2. El producto sin tratamiento térmico no es viable desde el punto de vista microbiológico, puesto que el recuento de

enterobacterias se mostró superior al límite establecido en la legislación el primer día de formulación debido, probablemente, a la contaminación producida durante la manipulación y formulación del producto. Las muestras con tratamiento térmico presentaron una vida útil de 27 días, siendo los microorganismos aerobios mesófilos los limitantes.

2.3. La adición de fibra a la formulación implica cambios en algunos parámetros relevantes del producto como la textura, incrementa la capacidad de retención de agua y disminuye la a_w . Estos cambios pueden ser muy interesantes desde el punto de vista tecnológico y no afectan a la aceptación del producto por parte del consumidor, lo cual podría suponer una ventaja desde el punto de vista nutricional y de marketing.

2.4. El estudio microbiológico de la formulación como "fuente de fibra" sin tratamiento térmico, mostró que el recuento de enterobacterias sobrepasa el límite marcado por la legislación a t_0 haciendo inviable, desde un punto de vista microbiológico la comercialización de éste producto sin tratamiento térmico. Para las muestras con tratamiento térmico la vida útil fue, al menos, de 77 días, puesto que, durante dicho periodo de almacenamiento las muestras permanecieron estables y dentro de los límites marcados por la legislación, no habiendo crecimiento de ninguno de los microorganismos estudiados.

2.5. Estos resultados ponen de manifiesto que es posible el desarrollo de un reestructurado precocinado "fuente de fibra" a base de dorada (*Sparus aurata*) con unas adecuadas características sensoriales, físico-químicas y microbiológicas.

VI.3. Aplicación de bioconservantes para prolongar la vida útil del filete de dorada (*Sparus aurata*)

Se ha evaluado la utilización de cultivos bioprotectores o bioconservantes, concretamente *Lactococcus lactis*, incorporados mediante la técnica de impregnación a vacío con el fin de prolongar la vida útil de filetes de dorada (*Sparus aurata*) envasados y almacenados en refrigeración.

3.1. De los cuatro medios de crecimiento estudiados, los medios óptimo 1 y óptimo 2 fueron los que originaron la máxima densidad poblacional para *Lactococcus lactis*.

3.2. El medio en el que *L. lactis* presentó mayores valores de inhibición frente a las cepas diana fue el óptimo 2 con un tiempo de crecimiento de 6 horas. Aunque estos valores no difirieron significativamente de los obtenidos para el medio óptimo 1, y al no existir otra ventaja entre la utilización de uno u otro medio, se decidió utilizar el medio óptimo 2 como medio para el crecimiento de *L. lactis* para realizar los ensayos *in vivo*.

3.3. Los resultados obtenidos muestran que *Lactococcus lactis* no presentó actividad antimicrobiana frente a *L. innocua*, independientemente del medio de crecimiento utilizado y de que el sustrato analizado fuera el cultivo celular (CC) o el sustrato parcialmente purificado (SPP). Este hecho, además, se evidenció tanto después de 4 como de 6 horas de incubación. Sin embargo, sí que presentó actividad antimicrobiana frente a *Lactobacillus sakei* y a *Bacillus cereus*.

3.3. Los sustratos parcialmente purificados (SPP) no mostraron una actividad antimicrobiana elevada por lo que no se tuvieron en consideración para las pruebas *in vivo*.

3.4. En los filetes impregnados con nisina tanto los recuentos obtenidos para aerobios mesófilos como para enterobacterias se encontraron dentro de los límites establecidos en la legislación a los 15 días de almacenamiento.

3.5. El tratamiento con *Lactococcus lactis* controló el crecimiento de aerobios mesófilos que se mantuvo prácticamente constante durante todo el periodo de almacenamiento estudiado, lo que puede hacer pensar que esta técnica podría resultar eficaz para controlar el crecimiento microbiano en el producto aunque habría que revisar la legislación para poder utilizar este tipo de técnicas en el desarrollo de productos probióticos a partir de pescado.

3.6. La impregnación a vacío de los filetes con nisina y *L. lactis* es una posible técnica de bioconservación para prolongar la vida útil de filetes de dorada almacenados en refrigeración.

CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. (1995). En W. Horwitz (Ed.), Official Methods of Analysis. 16th edn. Ed. Horwitz, W. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.

A.O.A.C. (1997). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. En: W. Horwitz (Ed.). Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.

AASEN, I.M.; MARKUSSEN, S.; MORETRO, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L. y NATERSTAD, K. (2003). Interactions of bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 1-9.

ACEBRÓN, L.B. y DOPICO, D.C. (2000). The importance of intrinsic and extrinsic cues to expected and experienced quality: An empirical application for beef. *Food Quality and Preference*, 11, 229-238.

ADLER-NISSEN, J. (2007). Continuous work-frying of vegetables: Process parameters influencing scale up and product quality. *Journal of Food Engineering*, 83, 54-60.

AENOR (1992). Norma UNE 87-005-92. Análisis Sensorial. Prueba de Comparación entre Parejas. Madrid. España. 75-81.

AENOR (1999). Norma UNE EN- ISO 6888-1. Microbiología de Alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de staphylococcus coagulasa-positivos (*Staphylococcus*

aureus y otras especies). Parte 1: Técnica mediante el uso de agar Baird-Parker. Ed. AENOR, Madrid, España.

AENOR (2002). Norma UNE EN-ISO 6579. Microbiología de Alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Salmonella spp.* Ed. AENOR, Madrid, España.

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.

AENOR (2009). Norma UNE-EN ISO 5495. Análisis Sensorial. Prueba de comparación por parejas. Madrid. España. 1-27.

AESAN (2009). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo asociado a la presencia de *Listeria monocytogenes* en pescado fresco y congelado. Revista del comité científico, 10, 27-40.

AGUILERA, J.M. y KESSLER, H.G. (1989). Citado en: Barbut, S. (1994). Protein gel ultrastructure and functionality. En: N.

Hettiarachchy & G. Ziegler (Eds.), Protein functionality in food systems (Vol. 13). Marcel Dekker: New York, pp. 383–433.

AHVENAINEN, R. (1996). New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 179-187.

AKZO NOBEL. Added value of Akucell. [Fecha de Consulta: abril 2008]. <http://www.cs.akzonobel.com/>.

AL-HOLY, M., RUITER, J., LIN, M., KANG, D.H. y RASCO, B. (2004). Inactivation of *Listeria innocua* in nisin-treated salmon (*Oncorhynchus keta*) and sturgeon (*Acipenser transmontanus*) caviar heated by radio-frequency. *Journal of Food Protection*, 67, 1848-1854.

AL-HOLY, M., LIN, M. y RASCO, B. (2005). Destruction of *Listeria monocytogenes* in sturgeon (*Acipenser transmontanus*) caviar by a combination of nisin with Chemicals antimicrobials or moderate heat. *Journal of Food Protection*, 68, 512-520.

ALLAERT, C. y ESCOLÀ, M. (2002). Métodos de análisis microbiológicos de alimentos. Diaz de Santos. Madrid. España. pp. 248.

ÁLVAREZ, C. y TEJADA, M. (1997). Influence of texture of suwari gels on kamaboko gels made from sardine (*Sardina pilchardus*) surimi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 472-480.

ÁLVAREZ, C.; COUSO, I. Y TEJADA, M. (1999). Microstructure of suwari and a kamaboko sardine surimi gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 839-844.

AMBJERG PEDERSEN, H.C. y JØRGENSEN, B.B. (1991). Influence of pectin on the stability of casein solutions studied in dependence of varying pH and salt concentration. *Food Hydrocolloids*, 5, 323-328.

ANDO, H.; ADASHI, M.,; UMEDA, K.; MANSURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H. y MOTOKI, M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biochemical Chemistry*, 53, 2613-2617.

ANDRÉS-BELLO, A.; GARCÍA-SEGOVIA, P. y MARTÍNEZ-MONZO, J. (2011). Vacuum Frying: An Alternative to Obtain High-Quality Dried Products. *Food Engineering Reviews*, 3, 63-78.

ANG, J.F. y CROSBY, G.A. (2005). Formulating reduced-calorie foods with powered cellulose. *Food Technology*, 59, 35-38.

ANON. (1992). Report on Vacuum Packaging and Associated Processes. Advisory Committee for the Microbiological Safety of Foods. HMSO, Londres.

ANÓNIMO. (1989). Orden de 26 de enero de 1989. Aceites y grasas. Norma de Calidad para los aceites y grasas calentados. BOE 26: 507-510 y modificación.

ANONYMOUS. (1998). Nisin preparation: Affirmation of GRAS as a direct human food ingredient. Food and Drug Administration. Fed. Reg. 53, 11247.

AQUERRETA-APESTEGUIA, Y. (2000). Pescados. En: Alimentos, composición y propiedades. 2ª edición. Mc Graw-Hill-Interamericana, Madrid. España. pp. 29-52.

ARANCETA, J.; SERRA-MAJEM, L.; PÉREZ-RODRIGO, C.; RIBAS-BARBA, L. y DELGADO-RUBIO, A. (2006). Nutrition risk in the child and adolescent population of the Basque country: the enKid Study. The British Journal of Nutrition, 96, S58-S66.

ARANCETA, J.; PÉREZ, C.; DALMAU, J.; GIL, A.; LAMA, R.; MARTÍN, M^ªA.; MARTÍNEZ, V.; PAVÓN, P. y SUÁREZ, L. (2008). El comedor escolar: situación actual y guía de recomendaciones. Anales de Pediatría, 69, 72-88.

ARIHARA, K.; CASSENS, R.G. y LUCHANSKY, J.B. (1993). Characterization of bacteriocins from Enterococcus faecium with activity against Listeria monocytogenes. International Journal of Food Microbiology, 19, 123-134.

ASHKENAZI, N.; MIZRAHI, S.H. Y BERK, Z. (1984). Heat and mass transfer in fruiting. En: B. M. McKenna, Engineering in foods, Elsevier, vol. 1, New York.

ASOCIACIÓN EMPRESARIAL DE PRODUCTORES DE CULTIVOS MARINOS (APROMAR). (2007). La acuicultura marina de peces en España. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino.

ASOCIACIÓN EMPRESARIAL DE PRODUCTORES DE CULTIVOS MARINOS (APROMAR). (2009). La acuicultura marina de peces en España. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino.

ASOCIACIÓN EMPRESARIAL DE PRODUCTORES DE CULTIVOS MARINOS (APROMAR). (2010). La acuicultura marina de peces en España. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino.

AYMERICH, T.; ARTIGAS, M.G.; GARRIGA, M.; MONFORT, J.M. y HUGAS, M. (2000). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *in vitro* production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 686-694.

BAIK, D. O. y MITTAL, G.S. (2003). Kinetics of tofu color changes during deep-fat frying. *LWT- Food Science and Technology*, 36, 43-48.

BAIK, D. O. y MITTAL, G.S. (2006). Double-side pan-frying of unfrozen/frozen hamburgers for microbial safety using modelling and simulation. *Food Research International*, 39, 133-144.

BAKER, K.H.; LANIER, T.C. y GREEN, D.P. (2000). Cold restructuring of seafoods using transglutaminase mediated binding. En: 2000 IFT Annual meeting book of abstracts. IFT Press, Chicago. EUA. pp. 75-76, 164.

BARANYI, J. y ROBERTS. T.A. (1994). A dynamic approach to predicting the bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.Y.; POTHAKAMURY, U.R; PALOU, E. y SWANSON, B.G. (1998). Non-thermal Preservation of Foods. En: Marcel Dekker, Nueva York, EUA.

BARBUT, S. y MITTAL, G.S. (1996). Effects of three cellulose gums on the texture profile and sensory properties of low fat frankfurters. *International Journal of Food Science and Technology* 31, 241-247.

BAUMANN, B. y ESCHER, F. (1995). Mass and heat transfer during deep-fat frying of potato slices, rate of drying and oil uptake. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 395-403.

BELITZ, H.D. y GROSCH, W. (1997). Lípidos. En: *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza. España.

BELLO, J. (1998). *Ciencia y tecnología culinaria*. Editorial Díaz de Santos, Madrid. España.

BENDALL, J.R. y RESTALL, D.J. (1983). The cooking of single myofibres, small myofibre bundles and muscle strips from beef M. psoas and M. sternomandibularis muscles at varying heating rates and temperatures. *Meat Science*, 8, 93-117.

BENJAKUL, S. y VISESSANGAUN, W. (2003). Transglutaminase-mediated setting in bigeye snapper surimi. *Food Research International*, 36, 253-266.

BENNIK, M.H.J.; SMID, W.J. y GORRIS, L.G.M. (1997). *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2074-2076.

BERNAL, V.M.; SMAJADA, C.H.; SMITH, J.L. y STANLEY, D.W. (1987). Interactions in protein/polysaccharide/calcium gels. *Journal of Food Science*, 52, 1121-1136.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DÍAZ, M.J.; PAGÁN, M.J.; GARCÍA, M.J.; GRAS, M.L.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. y FITO, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56, 273-277.

BLUMENTHAL, M.M. (1991). A new look at the chemistry and physics of deep-fat frying. *Food Technology*, Febrero, 68-71, 94.

BOATELLA RIERA, J.; CODONY SALCEDO, R. y LÓPEZ ALEGRET, P. (2004). *Química y bioquímica de los alimentos*. Publicacions i edicions de la Universitat de Barcelona, Barcelona. España.

BOGNAR, A. (1998). Comparative study of frying to other cooking techniques influence on the nutritive value. *Grasas y aceites*, 49 (3-4), 250-260.

BOGOVIC-MATIJASIC, B.; Rogelj, I.; Nes, I.F. y Holo, H. (1998). Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus*

acidophilus LF221. Applied Microbiology and Biotechnology, 49, 606-612.

BORDERÍAS, A. J.; SÁNCHEZ-ALONSO, I. y PÉREZ-MATEOS, M. (2005). New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. Trends in Food Science and Technology, 16, 458-465.

BOSKOU, G. y DEBEVERE, J. (2000). Shelf-life extension of cod fillets with acetate buffer spray prior to packaging under modified atmospheres. Food Additives and Contaminants, 17, 17-25.

BOUTTERFROY, A. y MILLIERE, J.B. (2000). Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria MONocytogenes* ATCC 15313. International Journal of Food Microbiology, 62, 65-75.

BOYER, C. ; JOANDEL, S. ; OUALI, A. y CULIOLI, J. (1996). Ionic strength effects on heat induced gelation of myofibrils and myosin from fast- and slow-twitch rabbit muscles. Journal of Food Science, 61, 1143-1148.

BREUKINK, E. y KRUIJFF, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. Nature Reviews Drug Discovery, 5, 321-323.

BUDU-AMOAKO, E., ABLETT, R.F., HARRIS, J. y DELVES-BROUGHTON, J. (1999). Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria Monocytogenes* in cold-pack lobster meat. Journal of Food Protection, 62, 46-50.

BUDZAKI, S. y SEGURA, B. (2005). Determination of convective heat transfer coefficient during frying of potato dough. *Journal of Food Engineering*, 66, 307–314.

CABO, M.L.; MURADO, M.A.; GONZÁLEZ, P. y PASTORIZA, L. (1999). A method for bacteriocin quantification. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 87, 907-914.

CAKLI, S.; KILINC, B.; CADUN, A.; DINÇER, T. y TOLASA, S. (2006a). Effects of uncutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquacultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *European Food Research and Technology*, 222, 719–726.

CAKLI, S.; KILINC, B.; DINCER, T. y TOLASA, S. (2006b). Effects of using slurry ice during transportation on the microbiological, chemical and sensory assessments of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4 °C. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 453–458.

CAKLI, S.; KILINC, B.; CADUN, A. y TOLASA, S. (2006c). Effects of using slurry ice on the microbiological, chemical and sensory assessments of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4 °C. *European Food Research and Technology*, 222, 130–138.

CAKLI, S., KILINC, B., CADUN, A., DINCER, T., TOLASA, S. (2007). Quality differences of whole uncut sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18, 391-397.

CALO-MATA, P.; ARLINDO S.; BOEHME K.; DE MIGUEL, T.; PASCOAL, A. y BARROS-VELAZQUEZ, J. (2007). Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 43-63.

CALVO-DOPICO, D.; TUDORAN, A. y OTTAR, S. (2010). Análisis de las preferencias de un nuevo producto de conveniencia a base de pescado. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 225, 71-108.

CAMPOS, J.A. (2002). Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutraceútics) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*, 7, 26-37.

CAPLICE, E. y FITZGERALD, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.

CARBAJO-VASCO, D.; FERNÁNDEZ-POLANCO, J.M.; LOZANO-SOLDEVILLA, G.; LUNA, L.; MARTÍN, A.; SANTOS, M.; DA SILVA-BICHARA, J.; SOMOHANO, F. y SALA, P. (2005). Producción, comercialización. Competencia internacional del sector español de la lubina y la dorada. En: *Acuicultura marina mediterránea*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. España.

CARECHE, M.; ÁLVAREZ, C. y TEJADA, M. (1995). Suwari and kamaboko sardine gels. Effect of heat treatment on solubility of Networks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1002-1010.

CARR, R.A. (1991). Development of deep-frying fats. *Food Technology*, 2, 95-96.

CASAS, J.A. y GARCÍA-OCHOA, F. (1999). Viscosity of Solutions of xantan/locust bean mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 25-32.

CASAUS, M.P. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

CASP, A. y ABRIL, J. (1999). Procesos de conservación de alimentos. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. España. pp. 494.

CEE, (2008). Reglamento (CE) nº 1022/2008 de la comisión de 17 de octubre de 2008 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2074/2005 en lo que respecta a los valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT). *Diario oficial de la Unión Europea*, L277, 18.

CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; ORTOLÁ, M.D.; CHIRALT, A. y FITO, P. (2000). Osmotic dehydration of mandarin and orange peel by using rectified grape must. *Proceedings of the 12th international drying symposium. IDS 2000*, Elsevier Science, Amsterdam, Paper nº 103.

CHATTONG, U.; APICHARTSRANGKOON A. y BELL A. (2007). Effects of hydrocolloid addition and high pressure processing on the rheological properties and microstructure of a commercial ostrich meat product "Yor" (Thai sausage). *Meat Science*, 76, 548-554.

CHEFTEL, J.C. y CHEFTEL, H. (1992). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Volumen I.* Editorial Acribia, Zaragoza. España.

CHEN, C.R. y RAMASWAMY, H.S. (2002). Color and texture change kinetics in ripening bananas. *LWT-Food Science and Technology*, 35, 415-419.

CHEN, Y.; LUDESCHER, R.D. y MONTVILLE, T.J. (1997a). Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipids vesicles. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 4770-4777.

CHEN, Y.; SHAPIRA, R.; EISENSTEIN, M. y MONTVILLE, T.J. (1997b). Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 524-531.

CHIN, K.; GO, M. y XIONG, Y. (2009). Konjac flour improved textural and water properties of transglutaminase-mediated, heat-induced porcine myofibrillar protein gel: Effect of salt level and transglutaminase incubation. *Meat Science*, 81, 565-572.

CHIRALT, A.; FITO, P.; BARAT, J.M.; ANDRÉS, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; ESCRICHE, I. Y CAMACHO M.M. (2001). Use of vacuum impregnation in food salting process. *Journal of Food Engineering*, 49, 141-151.

CHI-ZANG, Y.; YAM, K.L. y CHIKINDAS, M.L. (2004). Effective control of *Listeria Monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 15-22.

CHOULIARA, I.; SAVVAIDIS, I.N.; PANAGIOTAKIS, N. y KONTOMINAS, M.G. (2004). Preservation of salted, vacuum packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) filetes by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.

CHRISTIE, W.W. (1982). *Lipid Analysis*. 2ª Edición. Pergamon Press, Oxford. UK. pp. 207.

CHRISTIE, W.W. y DOBSON, G. (2000). Formation of cyclic fatty acids during the frying process. *European Journal of Lipid Science Technology*, 102, 515-520.

CIE, Commission International de L'Eclairage. (1976). *Colorimetry*, vo. 15. Bureau Central de la CIE, Vienna, Austria.

CINTAS, L.M.; CASAUS, M.P.; HERRANZ, C.; NES, I.F. y HERNÁNDEZ, P.E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International*, 7, 281-305.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F. y CHIKINDAS, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.

CLYDESDALE, F.M. (1998). Colour as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 83-101.

COFRADES, S.; AYO, J.; SERRANO, A.; CARBALLO, J. y JIMÉNEZCOLMENERO, F. (2006). Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics. *European Food Research and Technology*. 222, 458-466.

COLL-MORALES, J. (1991). *Acuicultura marina animal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. España.

CONNELL, J.J. (1995). Control of fish quality. 4^a edición. En: *Fishing News Books Limited*. London. Inglaterra.

COSTA, R.M. y OLIVEIRA, F.A.R. (1999). Modelling the kinetics of water loss during potato frying with a compartmental dynamic model. *Journal of Food Engineering*, 41, 177-185.

COSTA, R.M.; OLIVEIRA, F.A.R y BOUTCHEVA, G. (2001). Structural changes and shrinkage of potatoes during frying. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 11-23.

COTTER, P.D.; HILL, C. y ROSS, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.

CUBERO, N.; MONFERRER, A., MONFERRER, C.A. y VILLALTA J. (2002). Aditivos alimentarios. Editorial Mundi-Prensa Libros, Madrid. España.

DA SILVA, P. y MOREIRA, R. (2008). Vacuum frying of high quality fruit and vegetable based snacks. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1758–1767.

DAESCHEL, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43, 164-167.

DANA, D., BLUMENTHAL, M.M. y SAGUY, I.S. (2003). The protective role of water injection on oil quality in deep frying conditions. *European Food Research and Technology*, 217, 104-109.

DANA, D. y SAGUY, I.S. (2006). Review: Mechanism of oil uptake during deep-fat frying and the surfactant effect- theory and myth. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128-130, 267-272.

DATTA, K. (2007). Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. I: problem formulations. *Journal of Food Engineering*, 80, 80–95.

DAVE, V. y MCCARTHY, S. P. (1997). Review of konjac glucomannan. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 5, 237-241.

DAVE, V.; SHETH, M.; McCARTHY, S.P., RATTO, J.A. y KAPLAN, D.L. (1998). Liquid crystalline, rheological and thermal properties of konjac glucomannan. *Polymer*, 39, 1139–1148.

DAVIES, A.R.; CAPELL, C.; JEHANNO, D.; NYCHAS, G.J.E. y KIRBY, R.M. (2001). Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control*, 12, 67-71.

DAVEY, C.L. y GILBERT, K. (1974). Temperature-dependent cooking toughness in beef. *Journal of Science and Food Agriculture*. 25, 931–938.

DE FREITAS, Z.; SEBRANEK, D.G., OLSON, D.G. y CARR, J.M. (1997a). Carrageenan effects on salt-soluble proteins in model Systems. *Journal of Food Science*, 62, 539-543.

DE FREITAS, Z.; SERANEK, J.G., OLSON, D.G. y CARR, J.M. (1997b). Carrageenan effects on thermal stability of meat proteins. *Journal of Food Science*, 53, 544-547.

DE VUYST, L. y VANDAMME, E.J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Londres. Inglaterra.

DELGADO-ANDRADE, C.; SEIQUER, I.; NAVARRO, M.P. y MORALES, F.J. (2008). Estimation of hydroxymethylfulfural availability in breakfast cereals. Studies in Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1600-1607.

DEMETRIADES, K.; GUFFEY, C. y KHALIL, M.H. (1995). Evaluating the role of honey in fat-free potato chips. *Food Technology*, Octubre, 66-67.

DEXTER, D.R.; SOFOS, J.N. y SCHMIDT, G.R. (1993). Quality characteristics of turkey bologna formulated with carragenan, starch, milk and soy protein. *Journal of Muscle Foods*, 4, 207-223.

DÍEZ-GAÑÁN, L.; GALÁN, I., LEÓN, C.M., GANDARILLAS, A.; ZORRILLA, B. y ALCARAZ, F. (2007). Ingesta de alimentos, energía y nutrientes en la población de 5 a 12 años de la Comunidad de Madrid: resultados de la encuesta de nutrición infantil 2001-2002. *Revista Española de Salud Pública*, 81, 543-558.

DOBARGANES, M.; PÉREZ-CAMINO, M. y MÁRQUEZ-RUIZ, C. (1988). High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. *Fat Science Technology*. 90, 308.

DOBARGANES, M.C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. y VELASCO, J. (2000). Interactions between fat and food during deep-frying. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 521-528.

DOBARGANES, M.C. y VELASCO, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 420-428.

DOBARGANES, M.C. (2007). Formation of volatiles and short-chain bound compounds during the frying process. *The Lipid Library*. En:

<http://www.lipidlibrary.co.uk/frying/c-volatile/index.htm>. [Fecha de Consulta: junio 2009].

DOERSCHER, D.R., BRIGGS, J.L. y LONERGAN, S.M. (2003). Effects of pork collagen on thermal and viscoelastic properties of purified porcine myofibrillar protein gels. *Meat Science*, 66, 181–188.

DURLING, L.J.K; BUSK, L. y HELLLMAN, B.E. (2009). Evaluation of the DNA damaging effect of the food-induced food toxicant 5-hydroxymethylfulfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 880-884.

EINARSSON, H. y LAUZON, H.L. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus boreales*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 669-676.

EMBAREK, P.K.B. (1994). Presence, detection and growth of *L. monocytogenes* in seafoods: a review. *Food Microbiology*, 23, 17-34.

EMBAREK, P.K.; JEPPESEN, V.F. y HUSS, H.H. (1994). Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains to inhibit *Clostridium botulinum* in sous-vide cooked fish fillets. *Food Microbiology*, 11, 525-536.

EMERTON V. y CHOI E. (2008) Essential guide to food additives. En: Leatherhead Publishing; Royal Society of Chemistry, Leatherhead Surrey, Cambridge. UK.

ERIKSSON, N.E. y JOHNSON, G. (1979). *Fisken*. Landbruksforlaget, Oslo, Norway.

FAGAN, J.D.; GORMLEY, T.R. y MHUIRCHEARTAIGH, M.U. (2003). Effect of freezechilling, in comparison with fresh, chilling and freezing, on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions. *LWT-Food Science and Technology*, 23, 647-655.

FAN, L.P.; ZHANG, M.; XIAO, G.N.; SUN J.C. y TAO, Q. (2005a). The optimization of vacuum frying to dehydrate carrot chips. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 911-919.

FAN, L.; ZHANG, M. y MUJUMDAR, A. (2005b). Vacuum frying of carrot chips. *Dry Technology*, 23, 645-656.

FARHOOSH, R. y PAZHOUHANMEHR, S. (2009). Relative contribution of compositional parameters to the primary and secondary oxidation of canola oil. *Food Chemistry*, 114, 1002-1006.

FARKAS, B.E.; SINGH, R.P. y RUMSEY, T.R. (1996a). Modeling heat and mass transfer in immersion frying, I Model development. *Journal of Food Engineering*, 29, 211-226.

FARKAS, B.E.; SINGH, R.P. y RUMSEY, T.R. (1996b). Modeling heat and mass transfer in immersion frying. II Model solution and verification. *Journal of Food Engineering*, 29, 227-248.

FARKAS, J.; POLYÁK-FEHÉR, K.; ANDRÁSSY, É. y MÉSZÁROS, L. (2002). Improvement of microbiological safety of sous-vide meals by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 345-348.

FARNWORTH, E.R. (2001). Probiotics and prebiotics. En: *Handbook of Nutraceutical and functional foods*. Capítulo 25. Editorial CRC Press, Boca Ratón. Florida. EUA. pp. 407-422.

FELLOWS, P.J. (1998). Frying. En: *Food processing technology. Principles and practice*. Editorial Woodhead, Nueva York. EUA.

FENNEMA, O.R. (1990). Comparative water holding properties of various muscle food. A critical review relating to definitions, methods of measurements, governing factors, comparative factors, comparative data and mechanistic matters. *Journal of Muscle Foods*, 1, 636-681.

FENNEMA, O.R. (1993). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza. España.

FERNÁNDEZ-POLANCO, J.; GONZÁLEZ-LAXE, F. y LUNA, L. (2006). Asymmetric Information Reduction on fish farm consumption. An Experimental Research for Branded Seabream Fillet in Spain. *Aqua* 06. Mayo de 2006, Florencia. Italia.

FERRY, J.D. Protein gels. (1948). *Advances in Protein Chemistry*, 3, 1-78.

FILIPI, I. y LEE, C.M. (1998). Preactivated iota-carrageenan and its rheological effects in composite surimi gels. *LWT-Food Science and Technology*, 31, 129-137.

FISHER, R.A. (1999). Seafood restructuring using cold-set binding technology. Gloucester Point, Va.: Virginia Sea Grant Marine Advisory Program (VSGCP-G-99-002). pp. 1-16.

FITO, P. y PASTOR, R. (1994). On some non diffusional mechanism occurring during vacuum osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, 21, 513-519.

FLORES CANDIA, J.L. (1998). Metabolic Flux distribution, Modelling and Process Optimization of Xanthan Production, PhD Thesis, Fortschr.-Ber. VDI Reihe 17 Nr. 172, Dusseldorf, VDI Verlag. Alemania.

FOEDING, E.A. y RAMSEY, S.R. (1987). Rheological and water holding properties of gelled meat batters containing iota carrageenan, kappa carrageenan or xhantan gum. *Journal of Food Science*, 52, 549-553.

FOLCH, J., LEES, M., y SLOANE STANLEY, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

FONDOPEDES. (2008). Fondo de imágenes del sector pesquero. MAPYA. [Fecha de Consulta: agosto 2008].
<https://www.mapya.es/ca/pesca/pags/Fondopes/intro.htm>.

FRANÇOISE, L. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27, 698-709.

FRAZIER, W.C. y WESTHOFF, D.C. (1993). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza. España. pp. 681.

FRITSCH, C.W. (1981). Measurements of frying fat deterioration: A brief review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Marzo, 272-274.

FROM. Estudio: El consumo de pescado en comedores escolares (15 de noviembre de 2006). [Fecha de Consulta: julio 2008]. http://www.from.mapa.es/docs/estudios/52_escolares2006.pdf.

GÁLVEZ DEL POSTIGO, A.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ, M.; VALDIVIA, E. (1991). *Las bacteriocinas: ¿Supervivencia del individuo frente a la especie?*. Servicio de publicaciones de la Universidad de Granada. Granada. España. pp. 129.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L. y OMAR, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.

GAMBLE M.H. y RICE, P.D. (1987). Distribution and morphology of oil deposits in some deep fried products. *Journal of Food Science*, 42, 1742-1745.

GAMBLE, M.H.; RICE, P. y SELMAN, J.D. (1987). Relationship between oil uptake and moisture loss during frying of potato slices

from c.v. Record U.K. tubers. *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 233-241.

GARAYO, J. y MOREIRA, R. (2002). Vacuum frying of potato chips. *Journal of Food Engineering*, 55, 181-191.

GARCÍA, M. A.; FERRERO, C.; BÉRTOLA, N.; MARTINO, M. y ZARITZKY, N. (2002). Edible coatings from cellulose derivatives to reduce oil uptake in fried products. *Innovative Foods Science and Emerging Technologies*, 3, 391-397.

GARCÍA-ARIAS, M.T.; PONTES, E.A.; GARCÍA-LINARES, M.C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C. y SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. (2003). Cooking-freezing-reheating (CFR) of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. Effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions. *Food Chemistry*, 83, 349-356.

GARDE, S. (2001). Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en la maduración dirigida de quesos españoles de pasta prensada. Tesis doctoral. Departamento de Tecnología de los Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria., Madrid. España. pp. 140.

GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; COSTA, S.; MONFORT, J.M. y HUGAS, M. (2001). Bacterias lácticas para evitar la viscosidad en productos cárnicos cocidos loncheados. Un ejemplo de bioprotección. *Eurocarne*, 96, 1-4.

GARZA, S. (2004). Caracterización reológica, microbiológica y cinéticas de deterioro en cremogenado de melocotón. Servicio de publicaciones de la Universidad de Lleida, Barcelona. España. pp. 168.

GEBHARDT, B. (1996). Oils and fat in snack foods. En: Baileys industrial oils and fat products (5ª edición). John Wiley and Sons Inc., Nueva York. EUA. pp.429-481.

GERTZ, C. y KLOSTERMANN, S. (2000). A new analytical procedure to differentiate virgin or non-refined from refined vegetable fat and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 329-336.

GERTZ, C.; KLOSTERMANN, S. y KOCHHAR, S.P. (2000). Testing and comparing oxidative stability of vegetable oils and fats at frying temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 543-551.

GIBBS, P.A. (1987). Novel uses of lactic acid fermentation in food preservation. *Journal of Food Protection*, 69, 1066-1071.

GLADYSHEV, M.I.; SUSHCHIK, N.N.; GUBANENKO, G.A.; DEMIRCHIEVA, S.M. y KALACHOVA, G.S. (2006). Effect of way of cooking on content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of humpback salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Food Chemistry*, 96, 446-451.

GLADYSHEV, M.I.; SUSHCHIK, N.N.; GUBANENKO G.A.; DEMIRCHIEVA, S.M. y KALACHOVA, G.S. (2007). Effect of boiling

and frying on the content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of four fish species. *Food Chemistry*, 101, 1694-1700.

GOFF, J.H.; BHUNIA, A.K. y JOHNSON, M.G. (1996). Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. *Journal of Food Protection*, 59, 1187-1192.

GÓMEZ-GUILLÉN, C. y MONTERO, P. (1996). Addition of hydrocolloids and non-muscle proteins to sardine (*Sardina pilchardus*) mince gels: effect of salt concentration. *Food Chemistry*, 56, 421-427.

GONZÁLEZ, A.; FERNÁNDEZ, N.; SAHAGÚN, AM^a.; GARCÍA, J.J.; DÍEZ, M^aJ.; CALLE, Á.P., CASTRO, L.J. y SIERRA, M. (2004). Glucomanano: propiedades y aplicaciones terapéuticas. *Nutrición Hospitalaria*, 19, 45-50.

GONZÁLEZ, B.E.; GÓMEZ, M. y JIMÉNEZ, Z. (2003). *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4, Abril-Junio.

GONZÁLEZ, B. y SUAREZ, M. (2011). *Listeria y listeriosis. Seguridad Alimentaria*, 58-67.

GONZÁLEZ-FANDOS, E.; VILLARINO-RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA-LINARES, M.C; GARCÍA-ARIAS, M.T. y GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C. (2005). Microbiological safety and sensory characteristics of salmon slices processed by the sous vide method. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 77-85.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, N.; SANZ, J.J.; SANTOS, J.A.; OTERO, A. y GARCÍA-LOPÉZ, M.L. (2002). Foodborn pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3°C. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 135-141.

GRAM, L. y HUSS, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121-137.

GRANDA, C.; MOREIRA, R.G., y TICHY, S.E. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. *Journal of Food Science*, 69, 405-411.

GRAS, M.; VIDAL-BROTÓNS, D.; BETORET, N.; CHIRALT, A. y FITO, P. (2002). The response of some vegetables to vacuum impregnation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 263-269.

GUANGQUAN XIONG; WEI CHENG, LIXIU YE; XIN DU, MING ZHOU; RUOTAI LIN; SHENGRONG GENG, MINGLI CHEN, HAROLD CORKE y YI-ZHONG CAI. (2009). Effects of konjac glucomannan on physicochemical properties of myofibrillar protein and surimi gels from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 116, 413-418.

GUARNER, F. (2000). El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana. *Alimentación Nutrición y Salud*, 7, 99-106.

GUARNER, F. Y MALAGELADA, J.R. (2002). Ecología Intestinal: Modulación mediante probióticos. En: Alimentos Funcionales. Probióticos. Capítulo 4. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España. pp. 33-44.

GUERRA, N.P. y PASTRANA, L. (2002). Modelling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties. *Process Biochemistry*, 37, 1005-1015.

HACHMEISTER, K.A. y HERALD, T.J. (1998). Thermal and rheological properties and textural attributes of reduced-fat turkey batters. *Poultry Science*, 77, 632-638.

HALDER, A., DHALL, A. y DATTA, A.K. (2007). An improved, easily implementable, porous media based model for deepfat frying. Part I: model development and input parameters. *Trans IChemE Part C. Food Bioproducts Process*, 85, 209-219.

HAMM, R. (1977). Changes of muscle proteins during the heating of meat. En: *Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing*. Applied Science Publishing, Londres. UK. pp. 101-134.

HAN, M.; ZANG, Y.; FEI, Y.; XU, X., y ZHOU, G. (2009). Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. *European Food Research and Technology*, 228, 665-670.

HARRIS, L.J.; FLEMING, H.P. y KLAENHAMMER, T.R. (1992). Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1477-1483.

HERMANSSON, A. y LANGTON, M. (1988). Filamentous structures of bovine myosin in diluted suspensions and gels. *Journal of Science Food Agriculture*, 42, 355-369.

HINDRA, F. y BAIK, O.D. (2006). Kinetics of quality changes during food frying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 239-258.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R. y SCHILLINGER, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343-362.

HOSTETLER, R.L. y LANDMAN, W.A. (1968). Photomicrographic studies of dynamic changes in muscle fibre fragments. 1. Effect of various heat treatments on lengths, widths and birefringence. *Journal of Food Science*, 33, 468-470.

HUSS, H.H. (1998). Evaluación de la calidad del pescado. En: *El pescado fresco: su calidad y sus cambios de calidad*. Colección FAO Pesca N°29, Roma. Italia. pp. 61-75.

IMESON, A.P.; LEDWARD, D.A., y MITCHELL, J.R. (1977). On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. *Journal of Science and Food Agriculture*, 28, 661-668.

JACK, R.W.; TAGG, J.R. y RAY, B. (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 171-200.

JIANG, S.T.; LEU, S.Z. y TSAI, G.J. (1998). Cross-linking of mackerel surimi actomyosin by microbial transglutaminase and ultraviolet irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5278-5282.

JIANU, C.; COCAN, I.; RUJESCU, C.; RINOVETZ, A.; BUJANĂ, G. y JIANU, I. (2008). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 14, 394-400.

JOFFRAUD, JJ.; LEROI, F.; ROY, C. y BERDAQUÉ, J.L. (2001) Characterisation of volatil compounds produced by bacteria isolated from the spolage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 175-184.

JUAREZ TOMÁS, M.S.; BRU, E.; WIESE, B.; DE RUIZ HOLGADO, A.A.P. y NADER-MACÍAS, M.E. (2002). Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 714-724.

KANAJI, T.; OZAKI, H.; TAKAO, T.; HAWAJINI, H.; IDE, H.; MOTOKI, M. y SHIMONIKI, Y. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. Strain S-8112. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 565-72.

KAWAS, M.L. y MOREIRA, R.G. (2001). Characterization of product quality attributes of tortilla chips during the frying process. *Journal of Food Science*, 47, 97-107.

KERRY, J.F.; MORRISSEY, P.A. y BUCKLEY, D.J. (1999). The rheological properties of exudates from cured porcine muscle: effects of added polysaccharides and whey protein/polysaccharide blends. *Journal of Science and Food Agriculture*. 79, 1260-1266.

KHANNA, S. y TESTER, R. F. (2006). Influence of purified konjac glucomannan on the gelatinisation and retrogradation properties of maize and potato starches. *Food Hydrocolloids*, 20, 567-576.

KILINC, B.; CAKLI, S.; CADUN, A.; DINCER, T. y TOLASA, S. (2007). Comparison of effects of slurry ice and flake ice pretreatments on the quality of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4 °C. *Food Chemistry*, 104, 1611-1617.

KIM B.Y.; PARK J. y YOON W. (2004). Rheology and texture properties of surimi gels. En: *Surimi and surimi seafood*. CRC Press, Boca Raton. Florida. pp. 491-582.

KISHIDA, N.; OKIMASU, S. y KAMATA, T. (1978). Molecular weight and intrinsic viscosity of konjac glucomannan. *Agricultural and Biochemical Chemistry*, 42, 1465-1470.

KLAENHAMMER, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.

KLENHAMER, T.R. (1993). Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86.

KOCHHAR, S. P. y GERTZ, C. (2004). New theoretical and practical aspects of the frying process. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 722-727.

KONG, F.; TANG, J.; LIN, M. y RASCO, B. (2008). Thermal effects on chicken and salmon muscles: Tenderness, cook loss, area shrinkage, collagen solubility and microstructure. *LWT-Food Science and Technology*, 14, 1210-1222.

KROKIDA, M. K.; OREOPOULOU, V.; MAROULIS, Z. B. y MARINOKOURIS, D. (2000a). Water loss and oil uptake as a function of frying time. *Journal of Food Engineering*, 44, 39-46.

KROKIDA, M. K.; OREOPOULOU, V.; MAROULIS, Z. B. y MARINOKOURIS, D. (2000b). Effect of frying conditions on shrinkage and porosity of fried potatoes. *Journal of Food Engineering*, 43, 147-154.

KUMAR, S. y AALBERSBERG, B. (2006). Nutrient retention in foods after earth-oven cooking compared to other forms of domestic cooking: 1. Proximates, carbohydrates and dietary fibre. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 302-310.

KURASHI, C.; SAKAMOTO, J.; YAMAZAKI, K.; SUSU, Y.; KUHARA C. y SOEDA, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62, 488-490.

KURAIISHI, C.; SAKAMOTO, K. y SUSA, Y. (2001). Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Reviews*, 17, 221-246.

KÜTEMEYER, C.; FROECK, M.; WERLEIN, H.-D. y WATKINSON, B.M. (2005). The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. *Food Control*, 16, 735-737.

KYRANA, V.R.; LOUGOVOIS, V.P. y VALSAMIS, D.S. (1997). Assesment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 32, 339-347.

KYRANA, V.R. y LOUGOVOIS, V.P. (2002). Sensory and chemical and microbial assesmente of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 319-328.

LAAKKONEN, E.; WELLINTONG, G.H.; SHERBON, J.W. (1972). Low-temperature, long-time heating of bovine muscle : 1. Changes in tenderness, water-binding capacity, pH and amount of water-soluble components. *Journal of Food Science*, 35, 175-177.

LANIER, T. C. (1990). Interactions of muscle and nonmuscle proteins affecting heat-set gel rheology. En: *Macromolecular interactions and food colloid stability ACS Symposium Series*. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 268-284.

LAVIGNE, C.; ZEE, J.A.; SIMARD, R.E. y BELLVEAU, B. (1989). Effect of processing and storage conditions on the fate of vitamins

B1, B2, and C and on the shelf-life of goat's milk. *Journal of Food Science*, 54, 30-34.

LEE, C.M.; WU, M.C. y OKADA, M. (1992). Ingredient and formulation technology for surimi-based products. En: *Surimi technology*. Dekker, Nueva York. EUA. pp 273–302.

LEEK, S.; MADDOCK, S. y FOXALL, G. (2000). Situational determinants of consumption. *British Food Journal*, 102, 18-39.

LEJEUNE, R. ; CALLEWAERT, R. ; CRABBE, K. y De VUYST L. (1998). Modelling the growth and bacteriocin by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 159–168.

LE-QUERÉ. J.L. y SEBEDIO, J.L. (1996). Cyclic monomers of fatty acids. En: *Deep fryins, chemistry, nutrition and practical applications*. Editorial Perkins E.G., Erikson, M.D. Champaing. IL.

LEROI, F.; JOFFRAUD, J.J.; CHEVALIER, F. y CARDINAL, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 111-121.

LI, B.; XIE, B.J. y KENNEDY, J.F. (2006). Studies on the molecular chain morphology of konjac glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, 64, 510–515.

LIN, K. y HUANG, H. (2003). Konjac/gellan gum mixed gels improve the quality of reduced-fat frankfurters. *Meat Science*, 65, 749-755.

LINS, L.; DUCARME, P.; BREUKINK, E. y BRASSEUR, R. (1999). Computation study of nisin interaction with model membrane. *Biochimic and Biophysic acta*, 1420, 111-120.

LIU-PING, F.; MIN-ZHANG; GONG-NIAN, X.; JIN-CAI, S. y QIAN-TAO (2005a). The optimization of vacuum frying to dehydrate carrot chips. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 911-919.

LIU-PING, F.; MIN-ZHANG y MUJUMDAR, A.S. (2005b). Vacuum Frying of Carrot Chips. *Drying Technology*, 23, 645-656.

LYHS, U.; KORKEALA, H. y BJÖRKROTH, J. (2002). Identification of lactic acid bacteria from spoiled vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 147-153.

MAEKAJI, K. (1974). The mechanism of gelation of konjac mannan. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38, 315-321.

MALLE. P. y TAO. S.H. (1987). Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam Distillation. *Journal of Food Protection*, 50, 756-760.

MARISCAL, J.M. y BOUCHON, P. (2008a). Optimization of processing conditions to reduce oil uptake and enhance physico-

chemical properties of deep fried rice crackers. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 805-812.

MARISCAL, M. y BOUCHON, P. (2008b). Comparison between atmospheric and vacuum frying of apple slices. *Food Chemistry*, 107, 1561-1569.

MARTEAU, P.; VRESE, M.; CELLIER, C.J. y SCHREZENMEIR, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinic Nutrition*, 73, 430-436.

MARTENS, H. y VOLD, E. (1976). DSC studies of muscle tissue protein denaturation. *Proceedings 22nd European Meet. Meat Research Workers*, 19, 3-6.

MARTENS, H.; STABURSVIK, E. y MARTENS, M. (1982). Texture and color changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscle proteins. *Journal of Texture Studies*, 13, 291-309.

MARTÍNEZ, J.R. y POLANCO, I. (2007). *El libro blanco de la alimentación escolar*. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid. España.

MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; ANDRÉS, J.; TORRES, S.; SANJUÁN, N. y GARCÍA-SEGOVIA, P. (2004). System for vacuum cooking of food. ES 1057342U. (A47J27/04), 10 Agosto 2004. U200400864, 1 Abril 2004. 8p.

MASNIYOM, P.; BENJAKUL, S. y VISESSANGUAN, W. (2002). Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices under modified

atmosphere packaging. *Journal of Science Food and Agriculture*, 82, 873–880.

MATA, C.M. y DEL CUBILLO, M.T. (2000). Aplicación de microorganismos y sus metabolitos en la industria cárnica. *Eurocarne*, 90, Octubre.

MATEOS, J.A. (2002). Aspectos Básicos de la Tecnología de las Leches Fermentadas. En: *Alimentos Funcionales. Probióticos*. Capítulo 6. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España. pp. 57-64.

Mc AULIFFE, O.; RYAN, MP.; ROSS, R.P.; HILL, C.; BREEUWER, P. y ABEE, T. (1998). Lacticin 3147: a broad spectrum bacteriocina which selectively dissipates the membrane potential. *Applien and Environment Microbiology*, 64, 439-445.

MEHTA, U. y SWINBURN, B. (2001). A review of factors affecting fat absortion in hot chips. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41, 133-154.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V. y CARR, B.T. (1999). Attribute differences test. III. Pairwase Ranking Test: Friedman Analysis. En: *Sensory Evaluation Techniques*. 3ª Edición. CRC Press, Boca Raton, Florida. EUA. pp. 103-106.

MELLEMA, M. (2003). Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 364-373.

MELTON, S.L.; JAFAR, S.; SYKES, D. y TRIGIANO, M.K. (1994). Review of stability measurements for frying oils and fried food flavour. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 1301-1306.

MERTENS, B. y KNORR, D. (1992). Developments of nonthermal processes for food preservation. *Food Technology*, 46, 124-133.

MILLS, A. (1990). Utilization of retextured deboned mackerel fish. En: *Pelagic fish: the resource and its exploitation*. Fishing News Books, Oxford. UK.

MIN, B. y GREEN, B.W. (2008). Use of Microbial Transglutaminase and Nonmeat Proteins to Improve Functional Properties of Low NaCl, Phosphate-Free Patties Made from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Belly FlapMeat. *Journal of Food Science*, 73, E218-E226.

MIN, D.B. (1998). Lipid oxidation of edible oils. En: *Food Lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology*. Editorial MerceL Dekker INC., Nueva York. EUA.

MIR-BEL, J.; ORIA, R. y SALVADOR, M.L. (2009) Influence of the vacuum break conditions on oil uptake during potato post-frying cooling. *Journal of Food Engineering*, 95, 416-422.

MIR-BEL, J. (2010). Caracterización y modelado de la fritura a vacío de productos amiláceos no laminados. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Zaragoza. España.

MITTAL, G.S. y BARBUT, S. (1992). Use of carrageenans and xanthan gum in reduced fat breakfast sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 25, 509-513.

MITTAL, G.S. y BARBUT, S. (1994). Effects of carrageenans and xanthan gum on the texture and acceptability of low fat frankfurters. *Journal of Food Processing and Preservation*, 18, 201-216.

MOHR, V. y BENDALL, J.R. (1969). Constitution, physical and chemical properties of intramuscular connective tissue. *Nature*, 223, 404-405.

MONTERO, P.; HURTADO, J.L. y PÉREZ-MATEOS, M. (2000). Microstructural behaviour and gelling characteristics of myosystem protein gels interacting with hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 14, 455-461.

MONTERO, P. y PÉREZ-MATEOS, M. (2002). Effects of cations on the gelling characteristics of fish mince with added non ionic and ionic gums. *Food Chemistry*, 6, 363-373.

MONTVILLE, T.J. y WINKOWSKI, K. (2001). Sistemas biológicos de conservación de bacterias probióticas. En: *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza. España. pp. 581-601.

MORATA BARRADO, A. (2008). Nuevas tecnologías de conservación de alimentos. AMV Ediciones, Madrid. España. pp. 320.

MOREIRA, R.G.; PALAU, J. E. y SUN, X. (1995). Deep-fat frying of tortilla chips: An engineering approach. *Food Technology*, April, 146-150.

MOREIRA, R.G.; SUN, X.Z. y CHEN, Y.H. (1997). Factors affecting oil uptake in tortilla chips in deep-fat frying. *Journal of Food Engineering*, 31, 485-498.

MOREIRA, R.G. y BARRUFET, M.A. (1998). A new approach to describe oil absorption in fried foods: a simulation study. *Journal Food Engineering*, 31, 485-498.

MOREIRA, R.G.; BARRUFET, M.A. y CASTELL-PEREZ, M.E. (1999). Deep fat frying: fundamentals and applications. Editorial Kluwer Academic Publishers, New York. EUA.

MOREIRA, R.G. (2001). Deep-Fat Frying of Foods. En: *Food Processing Operations Modeling*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York. EUA. pp. 115-146.

MOREIRA, R.G.; DA SILVA, P.F. y GOMES, C. (2009). The effect of a de-oiling mechanism on the production of high quality vacuum fried potato chips. *Journal of Food Engineering*, 92, 297-304.

MORIN, L.A.; TEMELLI, F. y MCMULLEN, L. (2004). Interactions between meat proteins and barley (*Hordeum spp.*) β -glucan within a reduced-fat breakfast sausage system. *Meat Science*, 68, 419-430.

MOSSEL, D.A.A.; MORENO, B. y STRUIJK, C.B. (2003). Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza. España. pp. 703.

MOTTRAM, D.S.; WEDSICHA, B.L. y DODSON, A.T. (2002). Acrylamide is formed in the maillard reaction. *Nature*, 419, 448-449.

MOYANO, P.C.; TRONCOSO, E. y PEDRESCHI, F. (2007). Modeling texture kinetics during thermal processing of potato products. *Journal of Food Science*, 72, E102-E107.

MSC, Ministerio de Sanidad y Consumo (1991). Orden de 2 de agosto de 1991. Pescado. Normas microbiológicas, límites de contenido de metales pesados y métodos analíticos para su determinación en los productos de la pesca y acuicultura con destino al consumo humano. *Boletín Oficial del Estado* 195, 27153 (15 de agosto de 1991).

MYRLAND, Ø.; TRONDSEN, T.; JOHNSTON, R.S. y LUND, E. (2000). Determinants of seafood consumption in Norway: lifestyle, revealed preferences, and barriers to consumption. *Food Quality and Preference*, 11, 169-188.

NAWAR, W.W. (2000). Lipids. En: *Food Chemistry*. Editorial Dekker, Nueva York. EUA.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.; EIJSINK V. y HOLO, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 113-128.

NES, I.F.; HOLO, H.; FIMLAND, G.; HAUGE, H.H. y NISSEN-MEYER, J. (2002). Unmodified peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. En: *Peptide Antibiotics: Discovery, Mode of Actions, and Applications*. Marcel Dekker, Nueva York. EUA. pp. 81-117.

NIELSEN, J. (2004). Microbial process kinetics. En: *Basic biotechnology*. University Press, Cambridge. UK. pp. 127-149.

NILSSON, L.; HUSS, H.H. y GRAM, L. (1997). Inhibition of *Lysteria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 217-227.

NISHINARI, K., WILLIAMS, P.A. y PHILLIPS, G.O. (1992). Review of physico-chemical characteristics and properties of konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*, 6, 199-222.

NISSEN-MEYER, J. y NES, I.F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbioly*, 167, 67-77.

NIWA, E.; KANO, S. y NAKAYAMA, T. (1986). Setting and sort of ion. *Bulletin Japanese of Society Science Fisheries*, 52, 2121-2125.

NIWA, E.; TSUJIMOTO, K. y KANO, S. (1992). Kamaboko gel strengthening effect of polyuronides and other polysaccharides. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 85-88.

NORIEGA-RODRÍGUEZ, J.A.; ORTEGA-GARCÍA, J.; ANGULO-GUERRERO, O.; GARCÍA, H.S.; MEDINA-JUÁREZ, L.A. y GÁMEZ-

MEZA, N. (2009). Oil production from sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *CyTA- Journal of Food*, 7, 173-179.

NUNES, Y. y MOREIRA, R. (2009). Effect of osmotic dehydration and vacuum frying parameters to produce high-quality mango chips. *Journal of Food Science*, 74, 355–362.

NUSSINOVITCH, A. (1997). *Hydrocolloid Applications: Gum Technology in the Food and Other Industry*. (Capítulo 6, 8, 9). Blackie Academic and Professional, Londres. UK. pp. 156–158.

NYKANEN, A.; WECKMAN, K. y LAPVETELAINEN, A. (2000). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 63-72.

O´BRIEN, R.D. (1998). *Fats and oils: formulating and precesing for applications*. Editorial Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, Pensilvania. EUA. pp. 437–458.

OBSERVATORIO DE PROSPECTIVA TECNOLÓGICA INDUSTRIAL (OPTI). (2005). *Tecnologías del mar. Industria transformadora de productos del mar. Tendencias tecnológicas a medio y largo plazo*, 4-46.

OFFER, G.; RESTALL, D. y TRINCK, J. (1984). Water-holding in meat. En: *Recent Advances in Chemistry of Meat*. The Royal Society of Chemistry of London, Londres. UK. pp. 71-83.

OKADA, M. (1974). Elasticity of kamaboko and its strengthening. En: Fish paste products. Koseisha Koseikaku, Tokyo. pp. 180-202.

OKEREKE, A. y MONTVILLE, T.J. (1992). Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2463-2467.

OLSSON, G.B.; OFSTAD, R.; LODEMEL, J.B. y OLSEN, R.L. (2003). Changes in water-holding capacity in halibut muscle during cold storage. *LWT-Food Science and Technology*, 36, 771-778.

OOMEN, C.M.; FESKENS, E.J.; RASANEN, L.; FIDANZA, F.; NISSINEN, A.M.; MENORRI, A.; KOK, F.J. y KROMHOUT, D. (2000). Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy, and The Netherlands. *American Journal of Epidemiology*, 151, 999-1006.

ORTHOEFER, F.T. y COOPER, D.S. (1996). Evaluation of used frying oil. En: Deep frying chemistry. Nutrition and Practical Applications. Editorial AOCS Press. Champaign, Illinois. EUA. Pp. 285-310.

OVIATT, H.W. y BRANT, D.A. (1993). Thermal treatment of semi-dilute xanthan solutions yield weak gels with properties resembling hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15, 3-10.

ÖZDEMİR, M. y DEVRES, O. (2000). Kinetics of color changes of hazelnuts during roasting. *Journal of Food Engineering*, 44, 31-38.

PACHECO-AGUILAR, R.; OCANO-HIGUERA, V.M., EZQUERRA-BRAUER, J.M.; CASTILLO-YAEZ, F.J.; GARCÍA-SÁNCHEZ, G. y MÁRQUEZ-RÍOS, E. (2010). Partial characterization of 5'-nucleotidase from giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle. *CyTA-Journal of Food*, 7, 173-179.

PALOU, A. y SERRA, F. (2000). Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. *Alimentación Nutrición y Salud*, 7, 76-90.

PANG, J. (2003). Progress in the application and studies on functional material of konjac glucomannan. *Chinese Journal of Structural Chemistry*, 22, 633-642.

PAPADOPOULUS, V.; CHOULIARA, I.; BADEKA, A.; SAVVAIDIS, I.N. y KONTOMINAS, M.G. (2003). Effect of gutting on microbial, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20, 411-420.

PARADOSSI, G.; CHIESSI, E.; BARBIROLI, A. y FESSAS, D. (2002). Xanthan and Glucomannan Mixtures : Synergistic Interactions and Gelation. *Biomacromolecules*, 3, 498-504.

PARK, J.W. (1996). Temperature-tolerant fish protein gels using konjac flour. *Journal of Muscle Food*, 7, 165-174.

PASCUAL, M^a R. y CALDERÓN, V. (2000). *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Editorial Díaz-Santos, Madrid. España. pp. 441.

PAUL, S. y MITTAL, G.S. (1997). Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 635-662.

PEDRESCHI, F.; AGUILERA, J.M. y PYLE, M. (2001). Textural characterization and kinetics of potato strips during frying. *Journal of Food Science*, 66, 314-318.

PEDRESCHI, F. y MOYANO, P. (2005). Oil uptake and texture development in fried potato slices. *Journal of Food Science*, 70, 557-536.

PEDRESCHI, F.; MOYANO, P.; KAACK, K. y GRANBY, K. (2005a). Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Research International*, 38, 1-9.

PEDRESCHI, F.; HERNÁNDEZ, P.; FIGUEROA, C. y MOYANO, P. (2005b). Modeling water loss during frying of potato slices. *International Journal of Food Properties*, 8, 289-299.

PEDRESCHI, F.; LEON, J.; MERY, D.; MOYANO, P.; PEDRESCHI, R.; KAACK, K. y GRANBY, K. (2007). Color development and acrylamide content of pre-dried potato chips. *Journal of Food Engineering*, 79, 786-793.

PÉREZ-MATEOS, M. y MONTERO, P. (2000). Contribution of hydrocolloids to gelling properties of blue whiting muscle. *European Food Research and Technology*, 210, 383-390.

PINTHUS, E.J.; WEINBERG, P. y SAGUY, I.S. (1993). Criterion for oil uptake by deep-fat frying. *Journal of Food Science*, 58, 204-205.

POKORNY, J. (1998). Influencia del sustrato en el proceso de fritura. *Grasas y Aceites*, 49(3-4), 265-270.

POKORNY, J. (1999). Changes of nutrients at frying temperatures. En: *Frying of food*. Editorial Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, Pensilvania. EUA. pp. 69-103.

PRIMO-YÚFERA, E. (1998). *Química de los alimentos*. Editorial Síntesis, Madrid. España.

PRIYA, R.; SINGHAL, R.S. y KULKARNI, P.R. (1996). Carboxymethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose as additives in reduction of oil content in batter based deep-fat fried boondis. *Carbohydrate Polymers*, 29, 333-335.

PROTHON, F. (2003). Combined dehydration methods. From fresh fruit to high-quality ingredients. PhD. Thesis. Lund University. Lund, Sweden.

PUENTE, L. (2003). Aplicación de la técnica de impregnación a vacío en la obtención de alimentos funcionales con contenido probiótico a partir de manzana. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. España.

RAMÍREZ, J.A.; RODRÍGUEZ-SOSA, R.; MORALES, O.G. y VÁZQUEZ, M. (2000). Surimi gels from striped mullet (*Mugil*

cephalus) employing microbial transglutaminase. *Food Chemistry*, 70, 443-449.

RAMÍREZ, J.A.; SANTOS, I.A.; MORALES, O.G.; MORRISEY, M.T. y VÁZQUEZ, M. (2000). Application of Microbial Transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3, 21-28.

RAMÍREZ, J.A.; BARRERA, G.; MORALES, O.G. y VÁZQUEZ, M. (2002a). Effect of xanthan and locust bean gums on the gelling properties of myofibrillar protein. *Food Hydrocolloids*, 16, 11-16.

RAMÍREZ, J.A.; URESTI, R.; TÉLLEZ, S. y VÁZQUEZ, M. (2002b). Using salt and microbial transglutaminase as binding agents in restructured fish products resembling hams. *Journal of Food Science*, 67, 1778-1784.

RASO, J. y BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. (2003). Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 265-285.

REGENSTEIN, J.M. (1989). Are comminuted meat products emulsions or gel matrix?. En: *Food proteins*. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois. EUA. pp. 178-184.

REGLAMENTO (CE) Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

REINDL, B. y STAN, H.J. (1982). Determination of volatile aldehydes in meat as 2,4-dinitrophenylhydrazones using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 30, 849-854.

RIMAC, S.; LELAS, V.; RADE, D. y SIMUNDIĆ, B. (2004). Decreasing of oil absorption in potato strips during deep-fat frying. *Journal of Food Engineering*, 64, 237-241.

RING y STAINSBY. (1982). Ingredient and formulation technology for suirimi-based products. En: *Surimi technology* (Vol. 11). Marcel Dekker, Nueva York. EUA. pp. 273-302.

RODGERS, S. (2004). Novel approaches in controlling safety of cook-chill meals. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 366-372.

RODRÍGUEZ, J.M.; CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HORN, N.; DODD, H.M.; HERNÁNDEZ, P.E. y GASSON, M.J. (1995). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*. 78, 109-115.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.I. y TECANTE, A. (1999). Dynamic viscoelastic of gellan-i-carrageenan and gellan-xhantan gels. *Food Hydrocolloids*, 13, 59-64.

ROININEN, K.; LÄHTEENMAKI, L. y TUORILA, H. (1999). Quantification of consumer attitudes to health and hedonic characteristics of foods. *Appetite*, 33, 71-88.

ROMERO, A.; BASTIDA, S. y SANCHEZ-MUÑIZ, F.J. (2006). Cyclic fatty acid monomer formation in domestic frying of frozen foods in sunflower oil and high oleic acid sunflower oil without oil replenishment. *Food Chemical Toxicology*, 44, 1674-1681.

ROSS-MURPHY, S.B. (1995). Rheological characterization of gels. *Journal of Texture Studies*, 26, 391-400.

ROWE, R.W.D. (1989). Electron microscopy of bovine muscle: II- The effects of heat denaturation on post rigor sarcolemma and endomyosium. *Meat Science*, 26, 281-294.

RUIZ, J. (2010). Cocina al vacío y a temperaturas controladas. SEBBM. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, 166, 11-14.

RUIZ-CAPILLAS, C. y MORAL, A. (2001) Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science*, 66, 1030–1032.

SAAVEDRA, J.M. (2001). Clinical applications of probiotic agents. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 1147-1151.

SABLON, E.; CONTRERAS, B. y VANDAMME, E. (2000). Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetic and Biosynthesis. En: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Verlag. Alemania. pp.125-136.

SACILIK, K. y ELICIN, A.K. (2006). The thin layer drying characteristics of organic apple slices. *Journal of Food Engineering*, 73, 281-289.

SAGUY, I.S. y PINTHUS, E.J. (1995). Oil uptake during deep-fat frying: Factors and mechanism. *Food Technology*, 49, 142-145, 152.

SAGUY, I.S.; UFHEIL, G. y LIVINGS, S. (1998). Oil uptake in deep-fat frying: review. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 5, 30-35.

SAGUY, I.S. y DANA, D. (2003). Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumers aspects. *Journal of Food Engineering*, 56, 143-152.

SAHIN, S.; SASTRY, S. K. y BAYINDIRLI, L. (1999). The determination of convective heat transfer coefficient during frying. *Journal of Food Engineering*, 39, 307-311.

SAKAMOTO, H.; KUMAZAWA, Y.; TOIGUCHI, S.; SEGURO, K.; SOEDA, T. y MOTOKI, M. (1994). Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *Journal of Food Science*, 60, 300-304.

SALEH, M.A. y ORDAL, Z.J. (1955). Studies on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in a precooked frozen food. *Food Research*, 20, 340-350.

SÁNCHEZ, I.; PÉREZ-MATEOS, M. y BORDERÍAS, J. (2004). Incorporación de fibra dietética a reestructurados: una posibilidad. CTC Alimentación, Marzo, 10-12.

SÁNCHEZ-ALONSO, I.; HAJI-MALEKI, R. y BORDERÍAS, J. (2007). Wheat fiber as a functional ingredient in restructured fish products. *Food Chemistry*, 100, 1037-1043.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; CARMONA, P.; MORENO, P.; BORDERÍAS, J.; SÁNCHEZ ALONSO, I.; RODRÍGUEZ-CASADO, A. y CARECHE, M. (2008). Protein and water structural changes in fish surimi during gelation as revealed by isotopic H/D exchange and Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 106, 56-64.

SANDERS, M.E. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *Journal of Nutrition*, 130, 384S-390S.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULUS, G. y TSAKALIDOU, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 93-105.

SATO, S. y TSUCHIYA, T. (1992). Microestructure of surimi and surimi-based products. En: *Surimi Technology*. Marcel Dekker, Nueva York. EUA. pp. 501-518.

SHELLENKENS, M. (1996). New research issues in sous-vide cooking. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 256-262.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R. y HOLZAPFEL, W.H. (1996). Potential of antagonist microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 158-164.

SCHREZENMEIR, J. y VRESE, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and symbiotic-approaching a definition. *American Journal of Clinic Nutrition*, 73, 361-364.

SCOTT, V.N. y TAYLOR, S.L. (1981). Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Food Science*, 46, 117-120.

SENBA. (2008). Recursos didácticos. Los alimentos. Tablas de composición de los alimentos. [Fecha de Consulta: Agosto 2008]. http://www.senba.es/recursos/tablas_comp_alim.htm

SERRA, LI.; ARANCETA, J.; RIBAS, L.; PÉREZ, C.; SAAVEDRA, P. y PEÑA, L. (2003). Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). *Medicina clínica*, 121.19, 725-732.

SERRA, LI.; ARANCETA, J. y MATAIX, J. (2006). *Nutrición y Salud Pública: Métodos, bases científicas y aplicaciones*. 2ª Edición. Elsevier-Masson, Barcelona. España.

SHAND, P.J.; SOFOS, J.N. y SCHMIDT, G.R. (1993). Properties of algin/calcium and salt/phosphate structured beef rolls with added gums. *Journal of Food Science*, 58, 1224-1230.

SHINSAKU, K.; SHIGETOMO, T.; NARUHIRO, H. y TSUKAMOTO, Y. (2002). Preparation and rheological characterization of carboxymethyl konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*, 16, 289-294.

SHYU, S.L. y HWANG, L.S. (2001). Effects of processing conditions on the quality of vacuum fried apple chips. *Food Research International*, 34, 133-142.

SHYU, S.L.; HAU, L.B. y HWANG, L.S. (2005). Effects of processing conditions on the quality of vacuum-fried carrot chips. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 85, 1903-1908.

SINGH, R.P. (1995). Heat and mass transfer in foods during deep-fat frying. *Food Technology*, 4, 134-137.

SINRAM, R.D. y HARTMAN. (1989). Flavored vegetable oils as a substitute for beef tallow in deep-frying applications. *Food Technology*, 6, 90-94.

SKINNER, G.E.; SOLOMON, H.M. y FINGERHUT, G.A. (1999). Prevention of *Clostridium botulinum* type A, proteolytic B and E toxin formation in refrigerated pea soup by *Lactobacillus plantarum* and ATCC 8014. *Journal of Food Science*, 64, 724-727.

SLODKI, M.E. (1998). Polisacáridos Microbianos. En: *Enciclopedia de Tecnología Química Kirk-Othmer*, Limusa, 1998. *Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley, Nueva York. EUA.

SMID, E.J. y GORRIS, L.G.M. (2002). Antimicrobianos naturales para la conservación de los alimentos. En: Manual de conservación de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza. España. pp. 311-336.

SOLHEIM, R. y ELLEKJAER, M.R. (1994). Sensory quality of low-fat sausages affected by fat substitutes. *Food Quality and Preference*, 4, 127-131.

SOMSUB, W.; KONGKACHUICHAJ, R.; SUNGPUAG, P. y CHAROENSIRI, R. (2008). Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, 187-197.

SOUPAS, L.; HUIKKO, L.; LAMPI, A. M. y PIIRONEN, V. (2007). Pan-frying may induce phytosterol oxidation. *Food Chemistry*, 101, 286-297.

STABURSVIK, E. y MARTENS, H. (1980). Thermal denaturation of proteins in post-rigor muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Science and Food Agriculture*, 31, 1034-1042.

STANLEY, D.W. y TUNG, M.A. (1976). Microstructure of food and its relation to texture. En: *Rheology and Texture in Food Quality*. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, EUA. pp. 28-78.

STEENKAMP, J.B. (1993). Food consumption behaviour. *European Advances in consumer research*, 1, 401-409.

STEVENSON, S.G.; VAISEY-GENSER, M. y ESKIN, N.A.M. (1984). Quality control in the use of deep frying fats. *Journal of American Oils Chemists' Society*, 61, 1102-1108.

STILES, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 331-345.

SUKLIM, K.; FLICK, G.J.; MARCY, J.E.; EIGEL, W.N.; HAUGH, C.G. y GRANATA, L.A. (2004). Effect of cold-set binders: Alginates and microbial transglutaminase on the physical properties of restructured scallops. *Journal of Texture Studies*, 35, 634-642.

SUN, X.D. (2009). Utilization of restructuring technology in the production of meat products: A review. *CyTA – Journal of Food*, 7, 155-164.

SVETOSLAV, T.; VAZ-VELHO, M. y GIBBS, P. (2004). Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocina produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35, 157-160.

SWACKHAMER, R. (1995). Responding to customer requirements for improved frying system performance. *Food Technology*, 4, 151-152.

SZABO, A.E. y CACHILL, ME. (1999). Nisin and ALTATM 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO₂. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 373-377.

TAIWO, K.A. y BAIK, O.D. (2007). Effect of pre-treatments on the shrinkage and textural properties of fried sweet potatoes. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 661-668.

TAKEOKA, G.; PERRINO, C. y Jr. BUTTERY, R. (1996). Volatile constituents of used frying oils. *Journal of fried sweet potatoes. LWT-Food Science and Technology*, 40, 661-668.

TAN, K.J. y MITTAL, G.S. (2006). Physicochemical properties changes of donuts during vacuum frying. *International Journal of Food Properties*, 9, 85-98.

TANGDUANGDEE, C.; BHUMIRATANA, C.S. y TIA, S. (2003). Heat and mass transfer during deep-fat frying of frozen composite foods with thermal protein denaturation as quality index. *Science Asia*, 29, 355-364.

TANNAHILL, R. (1995). *Food in History*. Editorial Three Rivers Press, Nueva York. EUA.

TAREKE, E.; RYDBERG, P.; KARLSSON, P.; ERIKSSON, S. y TÖRNQVIST, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heats foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4998-5006.

TEJADA, M. (1994). Gelation of myofibrillar fish proteins. Review of *Agroquimic Technology*, 34, 257-273.

TEJADA, M. y HUIDOBRO, A. (2002). Quality of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter

method and gutting. *European Food Research and Technology*, 215, 1-7.

TÉLLEZ, S.; RAMÍREZ, J. y VÁZQUEZ, M. (2004). Application in restructured fish products of transglutaminase obtained by *Streptoverticillum ladakanaum* in media made from hydrolysates of sorghum straw. *Journal of Food Science*, 69, 1-5.

TÉLLEZ-LUIS, J.S.; URESTI, M.R. ; RAMÍREZ, J.A. y VÁZQUEZ, M. (2002). Low-salt restructured fish product using microbial transglutaminase as binding agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 953-959.

THOMAS, L.V. y DELVES-BROUGHTON, J. (2005). Nisin. En: *Antimicrobials in food*. 3ª edición. Taylor y Francis, CRC Press, Boca Raton, Florida. EUA. pp. 237-274.

TOLEDO, R. (1991). *Fundamentals of food process engineering*. Editorial Van Nostrand Reinhold Company, Inc., Nueva York. EUA.

TOLSTOGUZOV, V.B. y BRAUDO, E.E. (1983). Fabricated foodstuffs as multicomponent gels. *Journal of Texture Studies*, 14, 183-212.

TOLSTOGUZOV, V.B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. En: *Functional properties of food macromolecules*. Elsevier, London, UK. pp. 385-415.

TOMLINSON, L.A. (1995). *Food and drug administration bacteriological analytical manual*, (8th ed.), AOAC International, Gaithersburg.

TORNBERG, E. (2005). Effects of heat on meat proteins. Implications on structure and quality of meat products. A review. *Meat Science*, 70, 493-508.

TRESPALACIUS, P. y PLA, R. (2007). Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. *Food Chemistry*, 100, 264-272.

TRONCOSO, E.; PEDRESCHI, F. y ZÚÑIGA, R.N. (2009). Comparative study of physical and sensory properties of pre-treated potato slices during vacuum and atmospheric frying. *LWT-Food Science Technology*, 42, 187-195.

TROWELL, H.C., SOUTHGATE, D.A.T. y WOLEVER, T.M.S. (1976). Dietary fiber redefined. *Lancet*, 1, 1967-1968.

TSIRONI, T. y TAOUKIS, P.S. (2010). Modeling microbial spoilage and quality of gilthead seabream fillets: combined effect of osmotic pretreatment, modified atmosphere packaging, and nisin on shelf life. *Journal of Food Microbiology and Safety*, 75, 243-251.

TURCOTTE, C.; LACROX, C.; KHEADR, E.; GRIGNON, L. y FLISS, I. (2003). A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 283-293.

UFHEIL, G. y ESCHER, F. (1996). Dynamics of oil uptake during deep-fat frying of potato slices. *LWT-Food Science and Technology*, 29, 640-644.

UHLMAN, L.; SCHILLINGER, U.; RUPNOW, J.R. y HOLZAPFEL, W.H. (1992). Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 141-151.

URESTI, R.M.; TÉLLEZ-LUIS, S.J.; RAMIREZ, J.A. y VÁZQUEZ, M. (2004). Use of Dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 86, 257-262.

URESTI, R.M.; VELÁZQUEZ, G.; VÁZQUEZ, M.; RAMÍREZ, J.A. y TORRES, J.A. (2006). Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chemistry*, 94, 202-209.

VÁCHA, F.; NOVIK, I.; ŠPIČKA, J. y PODOLA, M. (2006). Determination of the effect of microbial transglutaminase on technological properties of common carp (*Cyprinus carpio L.*) meat. *Czech. Journal of Animal Science*, 51, 535-542.

VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M.T. y CHIKINDAS, M.L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1131-1137.

VARELA, G. (1994). La fritura de los alimentos en aceite de oliva. Consejo oleícola internacional. Madrid. España.

VÁZQUEZ, J.A. (2001). Lactobacterias como probiontes e produtoras de bacteriocinas. Modelos de crecimiento e actividades. Aplicacións á acuicultura. Ph.D. Thesis, Universidade de Santiago de Compostela, España.

VIGNOLO DE BARTOLUCCI, G. y CASTELLANO, P. (2004). Meat-model system development for antibacterial activity determination. En: Public Health Microbiology, capítulo 46. Editorial J.F.T. Spencer and A.L. Ragout de Spencer. Humana Press Inc., Totowa, NJ. EUA. pp. 467 – 470.

VIKLUND, G.; MENDOZA,; F. SJÖHOLM, I. y SKOG, K. (2007). An experimental set-up for studying acrylamide formation in potato crisps. LWT-Food Science and Technology, 40, 1066-1071.

VITRAC, O.; TRYSTRAM, G. y RAOULT-WACK, A.L. (2000). Deep-fat frying of food: heat and mass transfer, transformations and reactions inside the frying material. European Journal of Lipid Science and Technology, 102, 529-538.

VITRAC, O.; DUFOUR, D.; TRYSTRAM, G. y RAOULT-WACK, A.L. (2002). Characterization of heat and mass transfer during deep-fat frying and its effect on cassava chip quality. Journal of Food Engineering, 53, 161-176.

WAN, J., MIURA, J. y SEKI, N. (1992). Effect of monovalent cations on cross-linking of myosin in suwari gels from walleye pollack. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 583–590.

WANG, N. y BRENNAN, J.G. (1995). Changes in structure, density and porosity of potato during dehydration. *Journal of Food Engineering*, 24, 61-76.

WARNER, K. (1998). Chemistry of frying fats. En: *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. Editorial MerceL Dekker Inc, Nueva York. EUA.

WHITE, P.J. (1995). Conjugates diene, anisidine value and carbonyl value analyses. En: *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods*. AOCS Press. Champaign, Illinois. EUA. pp 159–178.

WIEDEMANN, I.; BREUKINK, E.; VAN KRAAIJ, C.; KUIPERS, O. P.; BIERBAUM, G.; De KRUIJFF, B. y SAHL, H.A. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1772-1779.

WINKOWSKI, K.; CRANDALL, A.D. y MONTVILLE, T.J. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigerated temperatures. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 2552-2557.

WRIGHT, D.J.; LEACH, I.B. y WILDING, P. (1977). Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *Journal of Science and Food Agriculture*, 28, 557-564.

WRIGHT, D.J. y WILDING, P. (1984). Differential scanning calorimetric study of muscle and its proteins: myosin and

it a subfragmenta. *Journal of Science and Food Agriculture*, 35, 357-372.

YAMSAENGSUNG, R. y MOREIRA, R. G. (2002a). Modeling the transport phenomena and structural changes during deep fat frying. Part II. Model solution and validation. *Journal of Food Engineering*, 53, 11-25.

YAMSAENGSUNG, R. y MOREIRA, R. G. (2002b). Modeling the transport phenomena and structural changes during deep fat frying. Part I. Model development. *Journal of Food Engineering*, 53, 1-10.

YAMSAENGSUNG, R. y RUNGSEE, C. (2006). Modeling the heat and mass transfer during the vacuum frying of chips. En: [http://161.246.48.249/rsce2004/SharedDocs/paper_file/HS117/hs117_RSCE%202004%20Full%20Paper%20\(Modeling%20Vacuum%20Frying\).pdf](http://161.246.48.249/rsce2004/SharedDocs/paper_file/HS117/hs117_RSCE%202004%20Full%20Paper%20(Modeling%20Vacuum%20Frying).pdf). [Fecha de consulta: septiembre 2009].

YEANNES, M.J. y ALMANDOS, M.E. (2003). Estimation of fish proximate composition starting from water content. *Journal of Food Composition and Analysis*. 16, 81-92.

YETIM, H. y OCKERMAN, W. (1995). The effects of egg white, tumbling and storage time on proximate composition and proteina fractions of restructured fish product. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4, 65-78.

YOO, B. y LEE, C.M. (1993). Rheological relationships between surimi sol and gel as affected by ingredients. *Journal of Food Science*, 58, 880-883.

YOSHIMURA, M. y NISHINARI, K. (1999). Dynamic viscoelastic study of konjac glucomannan with different molecular weights. *Food Hydrocolloids*, 13, 227-233.

ZABALA, A.; MARTIN, M.R.; HAZA, A.L.; FERNANDEZ, L.; RODRIGUEZ, J.M. y MORALES, P. (2001). Anti-proliferative effect of two lactic acid bacteria strains of human origin on the growth of a myeloma cell line. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 287-292.

ZDZISLAW, E. y SIKORSKI. (1994). Tecnología de los productos del mar: recursos, composición nutritiva y conservación. Editorial Acribia, Zaragoza. España. pp: 66-70.

ZHANG, Y.; XIE, B. y GAN, X. (2005). Advance in the applications of konjac glucomannan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 60, 27-31.

ZIEGLER y FOEGEDING. (1991). Ingredient and formulation technology for surimi-based products. En: *Surimi technology* (Vol. 11). Marcel Dekker, Nueva York, EUA. pp. 273-302.

ZÚÑIGA, A.L. (2002). Producción continua de bacteriocinas de *Carnobacterium piscicola* a escala pre-piloto y estudio de su efecto antagónico en contra de *Listeria monocytogenes*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias de la Escuela de Ingeniería en Alimentos, Universidad Austral de Chile. pp. 86.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

ANEXO A: Análisis sensorial para determinar el nivel de MTGasa óptimo.

Formulario de respuesta

Test sensorial texturizados de dorada (*Sparus aurata*)

Nombre:.....

Fecha:

Pruebe las dos muestras de izquierda a derecha. **Marque con una X la muestra** que considere **que tiene mayor intensidad** del atributo por el que se pregunta y al final la que usted prefiere.

Pareja 1

Atributo	Muestra	
	847	436
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Gomosidad		
MUESTRA PREFERIDA		

Pareja 2

Atributo	Muestra	
	675	210
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Gomosidad		
MUESTRA PREFERIDA		

Pareja 3

Atributo	Muestra	
	081	359
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Gomosidad		
MUESTRA PREFERIDA		

Observaciones:

.....

ANEXO B: Análisis sensorial para determinar el nivel de NaCl óptimo.

Formulario de respuesta

Test sensorial texturizados de dorada (*Sparus aurata*)

Nombre:.....

Fecha:

Pruebe las dos muestras de izquierda a derecha. **Marque con una X la muestra** que considere **que tiene mayor intensidad** del atributo por el que se pregunta y al final la que usted prefiere.

Pareja 1

Atributo	Muestra	
	435	071
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Nivel de sal		
MUESTRA PREFERIDA		

Pareja 2

Atributo	Muestra	
	759	381
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Nivel de sal		
MUESTRA PREFERIDA		

Pareja 3

Atributo	Muestra	
	101	248
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Nivel de sal		
MUESTRA PREFERIDA		

Observaciones:

.....

ANEXO C: Análisis sensorial de formulación fuente de fibra.**Formulario de respuesta****Test sensorial texturizados de dorada (*Sparus aurata*)****Nombre:**.....**Fecha:**

Pruebe las dos muestras de izquierda a derecha. **Marque con una X la muestra** que considere **que tiene mayor intensidad** del atributo por el que se pregunta.

Pareja 1

Atributo	Muestra	
	713	826
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Gomosidad		
Sabor a dorada		
Jugosidad		

Pareja 2

Atributo	Muestra	
	234	561
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Gomosidad		
Sabor a dorada		
Jugosidad		

Pareja 3

Atributo	Muestra	
	073	423
Aspecto (atractivo)		
Dureza		
Gomosidad		
Sabor a dorada		
Jugosidad		

Observaciones:

.....

ANEXO D: Elección de la muestra preferida para la formulación fuente de fibra.

Formulario de respuesta

Test sensorial texturizados de dorada (*Sparus aurata*)

Nombre:.....

Fecha:

Pruebe las dos muestras de izquierda a derecha. **Elija la muestra que prefiere** en relación a un conjunto de atributos (aspecto, textura, sabor, olor, etc...) e identifíquela colocando una cruz en la casilla correspondiente.

Pareja 1

528

317

Comentarios:

.....
.....

Pareja 2

701

238

Comentarios:

.....
.....

Pareja 3

101

812

Comentarios:

.....
.....

Si usted desea hacer un comentario respecto a los motivos de su elección o a las características de las muestras, puede anotarlos en el apartado de "Comentarios".