



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

Envasado, Conservación y Desarrollo de Nuevos  
Productos de Dorada (*Sparus aurata*)

D<sup>a</sup>. Miriam del Carmen Espinosa Vicente

**2015**





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

M<sup>a</sup> DOLORES GARRIDO FERNÁNDEZ Catedrática de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia en el Dpto. de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la tesis doctoral titulada “Envasado, conservación y desarrollo de nuevos productos de dorada (*Sparus aurata*)” realizada por Dña. Miriam del Carmen Espinosa Vicente, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 12 de Junio de 2015

**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Tecnología de los Alimentos**  
**Nutrición y Bromatología**

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia  
T. 868 88 87 67 – F. 868 88 71 67 – [www.um.es](http://www.um.es)





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

PEDRO DÍAZ MOLINS Profesor Asociado de la Universidad de Murcia en el Dpto. de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la tesis doctoral titulada “Envasado, conservación y desarrollo de nuevos productos de dorada (*Sparus aurata*)” realizada por Dña. Miriam del Carmen Espinosa Vicente, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 12 de Junio de 2015

**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Tecnología de los Alimentos**  
**Nutrición y Bromatología**

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia  
T. 868 88 87 67 – F. 868 88 71 67 – [www.um.es](http://www.um.es)



## ***Agradecimientos***

*Llegué un poco por casualidad a la Universidad de Murcia y el destino me guardaba una de las mejores experiencias de mi vida. Me quedo con las grandes personas que aquí he conocido y con todos los buenos momentos vividos que ¡¡han sido muchísimos!! Por ello, me gustaría dedicar unas líneas de agradecimiento a todas aquellas personas que de algún modo han sido partícipes en esta gran experiencia.*

*Mi primer y especial agradecimiento es para mí directora de tesis, la Dra. María Dolores Garrido Fernández, sin ella, hoy no estaría escribiendo estas líneas. Aquel día caluroso de Septiembre de 2009, la suerte estuvo de mi parte, y es que, entre tantas puertas a las que tocar, para solicitar director de trabajo fin de máster, llegué al de la Dra. Garrido, convirtiéndose desde aquel mismo momento en mi directora de trabajo... ¡¡una gran suerte para mí!! Adentrándome desde aquel instante, en el fascinante mundo de la dorada y de la investigación. Gracias por haberme dado esta maravillosa oportunidad, por tu enseñanza y formación en este campo tan entusiasta y por haberme hecho partícipe de este grandioso grupo en el que eres la directora principal, regalándome estos años tan fantásticos... ¡nunca lo olvidaré!*

*A mi codirector de tesis y compañero de grupo de investigación, Pedro Díaz Molins. Ha sido un pilar importante para que esta tesis creciera y se llevara a cabo. Gracias por tu ayuda a nivel experimental y por tus sabios consejos.*

*A los profesores componentes de mi grupo de investigación de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia, y en especial a D. José Laencina, Belén López, Eduardo Ferrandini y Alejandra Price. ¡Gracias por tan buenos momentos vividos y transmitir tanta sabiduría!*

*A la empresa Rational Food, S.A. por su colaboración y a Paco por su inestimable ayuda recibida en todo momento.*

*A mis compañeros de “despachito” Rocío, Macarena, Belén, Pedro, Víctor, Mariella, Silvia y Khalid. Cada uno de vosotros ha hecho que mi estancia durante estos años fuera más que especial. Todos juntos definís a la perfección: compañerismo, trabajo en equipo, humildad, cariño y sencillez.*

*A cada uno de mis compañeros de “zulo y bodega” (Paola, Adri, Mario, Rafa, Jordi, Esther, Inés, Lorena, Sandra, Alex, Naiara, Yolanda, Rafa, Pedro...) de los cuales siempre guardaré un especial cariño, pues habéis sido grandes compañeros y muchos de ellos, seguís siendo amigos fuera de las puertas de este Departamento.*

*A los técnicos de laboratorio Antonio y Carmen, personal, profesores, alumnos y compañeros de laboratorio de este Departamento con los que he compartido tan buenos momentos y siempre habéis estado ahí cuando os he necesitado ¡¡un millón de gracias!!*

*A todos mis amigos con los que comparto todos los momentos importantes de mi vida.*

*A mi familia y en especial, a mis queridos abuelos Jeromo Espinosa y Manuel Vicente, porque desde el cielo estoy segura sienten un profundo orgullo de mí al igual que yo siempre lo he tenido hacia ellos. Así como a mis dos abuelas Carmen y Fina, por el profundo cariño que siento por ellas.*

*A mis padres Carmelo y Finita, por ser los pilares principales de mi vida. Por ofrecerme todo sin nada a cambio, por confiar en mí y en lo que hago, por el orgullo que sienten por su hija Míriam, el cual es recíproco de mí por ellos. Porque lo que soy, es gracias a vosotros. A mi hermana M<sup>a</sup> José, por formar junto a mis padres y a mí, “mi familia perfecta” ¡¡os quiero!!*

*Sabía que estas últimas líneas las escribiría para alguien especial en mi vida y no me equivocaba, Jerónimo, la persona que me ha acompañado en esta última parte de mi tesis doctoral y el cuál me ha brindado todo su amor y cariño para el empujón final. Estoy inmensamente feliz de vivir este momento contigo.*

*Gracias a todos de corazón*

*Míriam*





*Dedicado a mis padres, Carmelo y Finita y  
a mi hermana María José.*

*“Una vez hayas probado el vuelo siempre caminarás por la Tierra con la vista mirando al Cielo, porque ya has estado allí y allí siempre desearás volver.”*

*Leonardo da Vinci (1452-1519)*



<i>Índice</i>	<i>Página</i>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	11
<b>1.1. La dorada (<i>Sparus aurata</i>)</b>	11
<b>1.2. Producción acuícola</b>	12
<b>1.3. Deterioro del pescado: cambios microbiológicos, físico-químicos y sensoriales</b>	17
1.3.1. Autólisis	18
1.3.2. Oxidación lipídica	19
1.3.3. Actividad microbiana	21
<b>1.4. Parámetros para evaluar el deterioro del pescado</b>	22
1.4.1. Parámetros físico-químicos	22
1.4.2. Parámetros microbianos	25
1.4.3. Parámetros sensoriales	28
<b>1.5. Estrategias para la conservación y diversificación del pescado de acuicultura</b>	29
1.5.1. Envasado	30
1.5.2. Cocinado <i>sous vide</i>	31
<b>1.6. Tecnologías de conservación: Altas presiones</b>	36
<b>2. OBJETIVO GENERAL</b>	45
<b>2.1. Objetivos específicos</b>	45
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	49
<b>3.1. Muestras</b>	49
<b>3.2. Análisis Físico-Químicos</b>	49
3.2.1. Composición proximal	49
3.2.1.1. Cenizas	49
3.2.1.2. Humedad	50
3.2.1.3. Grasa Total	50
3.2.1.4. Proteínas	51
3.2.2. Color CIElab	53
3.2.3. pH	54
3.2.4. Capacidad de retención de agua (CRA)	54
3.2.5. Índice de TBARs	55
3.2.6. Nitrógeno de Trimetilamina (N-TMA)	57
3.2.7. Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT)	60

3.2.8. Perfil de Textura (TPA)	61
<b>3.3. Análisis de ozono en agua</b>	63
<b>3.4. Análisis microbiológicos</b>	64
3.4.1. Pescado	66
3.4.2. Agua	68
3.4.3. Superficies	71
<b>3.5. Análisis sensorial</b>	72
3.5.1. Filetes de dorada frescos	73
3.5.2. Dorada cocinada <i>sous vide</i>	76
<b>3.6. Análisis estadístico</b>	79
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	83
<b>CAPÍTULO I</b>	83
Efecto del ozono en la calidad microbiológica de filetes de dorada.	
<b>CAPÍTULO II</b>	
Estudio de vida útil de filetes de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ) envasados en atmósfera modificada y vacío almacenados en refrigeración.	99
<b>CAPÍTULO III</b>	
Desarrollo de un plato “listo para consumir” con base de pescado mediante tecnología <i>sous vide</i> : diversificación de productos de acuicultura.	119
<b>CAPÍTULO IV</b>	
Efecto del tipo de envasado (bolsa vs barqueta) sobre la calidad microbiológica, físico-química y sensorial de filetes de dorada cocinados <i>sous vide</i> .	137
<b>CAPÍTULO V</b>	
Efecto del tratamiento de altas presiones sobre la calidad microbiológica, físico-química y sensorial de un plato de dorada cocinado <i>sous vide</i> .	151
<b>5. CONCLUSIONES</b>	171
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	177

**Índice de Tablas**

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Curva de calibración para la determinación de N-Trimetilamina.	59
<b>Tabla 2</b> Definición de dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad según Bourne (1978).	62
<b>Tabla 3</b> Cuadro resumen de los distintos análisis microbiológicos realizados en pescado, agua y superficie.	65
<b>Tabla 4</b> Microorganismos evaluados en la dorada, medios de cultivos empleados y condiciones de incubación.	67
<b>Tabla 5</b> Atributos evaluados durante la evaluación sensorial de filetes de dorada frescos.	73
<b>Tabla 6</b> Descripción de los diferentes atributos del producto de dorada <i>sous vide</i> .	77
<b>Tabla 7</b> Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$ SD) de los recuentos microbiológicos (log ufc/ 100 ml) en agua ozonizada antes y después de la inmersión de los filetes de dorada.	89
<b>Tabla 8</b> Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$ SD) para los recuentos microbiológicos (log ufc g <sup>-1</sup> ) en filetes de dorada antes y después de la inmersión durante 10 minutos.	90
<b>Tabla 9</b> Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$ SD) para los recuentos microbiológicos (log ufc/100ml) en agua ozonizada antes y después de la inmersión de los filetes de dorada durante 20 y 40 minutos.	92
<b>Tabla 10</b> Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$ SD) de los recuentos microbiológicos (log ufc g <sup>-1</sup> ) en filetes de dorada antes y después de la inmersión en baños con [O <sub>3</sub> ppm] = 0,30 mg l <sup>-1</sup> durante 20 y 40 minutos.	95
<b>Tabla 11</b> Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$ SD) para los diferentes parámetros de Análisis de Perfil de Textura (TPA) en filetes de dorada analizadas antes y después de la inmersión durante 20 y 40 minutos.	97

<b>Tabla 12</b> Composición proximal (%) del músculo de dorada.	105
<b>Tabla 13</b> Valores medios y desviación estándar ( $\pm$ SD) para el pH, capacidad de retención de agua (CRA), sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARs), Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) y N-Trimetilamina (N-TMA) en filetes de dorada frescos envasadas en aerobiosis (C), vacío (V) y atmósfera modificada (AM) y almacenadas a 3 °C.	107
<b>Tabla 14</b> Concentración de los ingredientes de las tres salsas usadas en el diseño del producto <i>sous vide</i> , expresadas como porcentaje (%).	120
<b>Tabla 15</b> Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$ SD) en los atributos evaluados para la elección de la temperatura de cocinado y la salsa, en la elaboración del plato de dorada <i>sous vide</i> .	125
<b>Tabla 16</b> Valores medios obtenidos en el análisis físico-químico de pH y TBARs (mg MDA kg <sup>-1</sup> ) en platos de dorada <i>sous vide</i> almacenados a 2 $\pm$ 1 °C.	130
<b>Tabla 17</b> Análisis sensorial del plato cocinado <i>sous vide</i> de dorada almacenada a 2 $\pm$ 1 °C durante 62 días.	134-135
<b>Tabla 18</b> Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$ SD) del pH en las muestras envasadas en bolsa (BL) y barqueta (BQ) almacenadas a 2 $\pm$ 1 °C.	141
<b>Tabla 19</b> Correlaciones positivas entre los atributos sensoriales y la calidad global (CG).	149
<b>Tabla 20</b> Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$ SD) de los valores de TBARs (mg MDA kg <sup>-1</sup> ) obtenidos en filetes de dorada cocinados <i>sous vide</i> (C) y sometidos a altas presiones 300 (AP300) y 600 MPa (AP600) almacenados en refrigeración durante 62 días.	159
<b>Tabla 21</b> Análisis de Perfil de Textura (TPA) obtenido en filetes de dorada cocinados mediante <i>sous vide</i> (C) y tratados con altas presiones a 300 (AP300) y 600 MPa (AP600) en el día inicial de almacenamiento.	161
<b>Tabla 22</b> Análisis sensorial del producto <i>sous vide</i> (C) y del producto tratado por altas presiones (AP300, AP600) almacenado a 2 $\pm$ 1 °C durante 62 días.	165-166

<b>Índice Figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Dorada ( <i>Sparus aurata</i> ).	11
<b>Figura 2</b> Distribución porcentual de la producción de dorada de acuicultura de en el área mediterránea y el resto del mundo en 2013 (APROMAR, 2014).	13
<b>Figura 3</b> Distribución porcentual de la producción de dorada en España por CCAA en 2013 (APROMAR, 2014).	14
<b>Figura 4</b> Dorada entera almacenada en hielo de venta en supermercado.	15
<b>Figura 5</b> Diagrama de flujo procesado del pescado hasta su expedición.	15
<b>Figura 6</b> Esquema básico de la oxidación de lípidos (Cheftel y Cheftel, 1976).	20
<b>Figura 7</b> Diagrama de flujo para la elaboración de un plato <i>sous vide</i> .	34
<b>Figura 8</b> Efecto del tratamiento a diferentes presiones en los alimentos.	37
<b>Figura 9</b> Diagrama del espacio de color CIELab (L*, a*, b*).	54
<b>Figura 10</b> Producto cromógeno resultado de la reacción entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA).	56
<b>Figura 11</b> Ecuación de regresión lineal de la curva de calibrado.	57
<b>Figura 12</b> Curva tipo para el Análisis de Perfil de Textura (TPA) (Bourne, 1978).	62
<b>Figura 13</b> Ficha de cata para el análisis sensorial de filetes de dorada crudos.	75
<b>Figura 14</b> Ficha de cata para el análisis sensorial de dorada <i>sous vide</i> .	78

<b>Figura 15</b> Baños experimentales con diferentes concentraciones de ozono.	84
<b>Figura 16</b> Baños experimentales con agua y ozono a los diferentes tiempos de inmersión.	86
<b>Figura 17</b> Evolución en los recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp, Anaerobios, Coliformes y Psicrótrofos de dorada durante el almacenamiento a 3 °C envasado en aerobiosis (C), vacío (V) y atmósfera modificada (AM).	101
<b>Figura 18</b> Evolución de los valores de L*, a* y b* en filetes de dorada fresco envasados en diferentes condiciones: aerobiosis, vacío y atmósfera modificada (AM) (40% CO <sub>2</sub> , 30% N <sub>2</sub> , 30% O <sub>2</sub> ).	113
<b>Figura 19</b> Resultados expresados como porcentajes con respecto a las puntuaciones recibidas en los días 4 y 7 para las muestras control (a), 7 y 14 para los envasados a vacío (b) y en atmósfera modificada (c).	114
<b>Figura 20</b> Evolución de la temperatura interna del producto de dorada <i>sous vide</i> durante el cocinado.	126
<b>Figura 21</b> Evolución de los recuentos en aerobios mesófilos (log ufc g <sup>-1</sup> ) en dorada <i>sous vide</i> durante 62 días almacenado a 2 ± 1 °C.	127
<b>Figura 22</b> Valores de MDA (mg.kg <sup>-1</sup> ) obtenidos en filetes de dorada envasadas en bolsa (BL) y barqueta (BQ) durante el almacenamiento.	142
<b>Figura 23</b> Recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos (log ufc g <sup>-1</sup> ) en ambos envasados (BL y BQ) durante el período de almacenamiento en refrigeración.	144
<b>Figura 24</b> Representación gráfica de las puntuaciones obtenidas en los atributos: olor global (OG), sabor global (SG), firmeza (F), jugosidad (J) y pastosidad (P) en dorada cocinada <i>sous vide</i> en los envasados bolsa (BL) y barqueta (BQ) durante el tiempo de almacenamiento.	146
<b>Figura 25</b> Representación radial de la calidad global (CG) en el producto <i>sous vide</i> en las dos tipos de envasados estudiados: bolsa (BL) y barqueta (BQ) en los días de almacenamiento.	148

<b>Figura 26</b> Equipo NC Hyperbaric Wave 6500/120 en el que se procesaron las muestras.	153
<b>Figura 27</b> Análisis de Perfil de Textura en filete de dorada cocinado <i>sous vide</i> y sometido a tratamiento de altas presiones.	155



**RESUMEN**

La presente Tesis Doctoral está constituida en cinco capítulos, orientados al estudio de estrategias que contribuyen a diversificar la oferta del sector acuícola a través de procesos de conservación y desarrollo de nuevos productos a partir de filetes de dorada.

Los capítulos I y II se centraron en el estudio de diferentes estrategias para mejorar la calidad microbiológica y vida útil de filetes de dorada crudos. En el capítulo I se evaluó el efecto del ozono como agente bactericida en la calidad microbiológica de filetes de dorada frescos. El estudio consistió en la inmersión de los filetes en agua ozonizada con diferentes concentraciones de ozono (0,35, 0,50 y 0,75 mg l<sup>-1</sup>) durante 10 minutos y 20 y 40 minutos con una concentración de 0,30 mg l<sup>-1</sup>. La calidad microbiológica del agua (Recuentos a 22 °C y 36 °C, Coliformes, *E.coli*, Enterococcus y *Clostridium perfringens*) y del pescado (aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *S. Aureus*, Coliformes, *E.coli* y *Pseudomonas spp.*) así como el análisis de perfil de textura (TPA) fueron llevados a cabo en las diferentes muestras para observar los posibles cambios a consecuencia de tal exposición. En base a los resultados obtenidos, el ozono resultó efectivo en la esterilización del agua de la red de una industria acuícola en todas las concentraciones utilizadas, eliminando por completo la carga microbiana. Sin embargo, las concentraciones utilizadas en el agua y los tiempos prolongados de exposición, no redujeron de manera significativa la carga microbiana inicial de los filetes de dorada, no mejorando por tanto la calidad microbiológica de estos.

En el capítulo II se estudió el efecto del tipo de envasado, atmósfera modificada (40 % CO<sub>2</sub>, 30 % N<sub>2</sub>, 30 % O<sub>2</sub>) y vacío, sobre la vida útil de los filetes de dorada. Durante 14 días las muestras estuvieron almacenados en vitrina expositora a 3 ± 1 °C reproduciendo condiciones de comercialización. Se llevaron a cabo análisis físico-químico (pH, CRA, TBARs, NVBT, TMA y color), microbiológico (aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes, *E.coli*, *Pseudomonas spp.*, Psicrófilos y bacterias ácido lácticas) y sensorial de los filetes frescos en los días 0, 4, 7, 11 y 14. Conforme aumentó el tiempo de almacenamiento, los filetes se deterioraron gradualmente, sin embargo a nivel microbiológico, ambos envasados, retrasaron este deterioro. A nivel sensorial los envasados a vacío y atmósfera modificada ayudaron a

mantener durante más tiempo el olor a pescado, color y la textura, respecto a los filetes envasados en aerobiosis, los cuales mostraron un alto grado de deterioro en el día 7 de almacenamiento.

Debido al incremento en el consumo de platos preparados y la necesidad de la diversificación de productos procedentes de la acuicultura, se llevó a cabo en el capítulo III de la presente Tesis Doctoral, el desarrollo de un plato de dorada “listo para consumir” cocinado mediante tecnología *sous vide*. Inicialmente, un panel entrenado seleccionó la temperatura óptima de cocinado y la salsa de los filetes. Elaborados los platos de dorada, se almacenaron en vitrina expositora en refrigeración a  $2 \pm 1$  °C durante 62 días. Los días 0, 7, 17, 34, 48 y 62, se realizaron análisis microbiológico (Aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, Bacterias ácido lácticas, Anaerobios psicrótróficos, Mohos y Levaduras, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*), físico-químico (pH y TBARs) y sensorial del producto cocinado. La temperatura óptima de cocinado resultó ser 60 °C, y la salsa verde fue la escogida como la más idónea para la combinación con la dorada. Destacar que durante todo el tiempo de almacenamiento, las muestras mantuvieron los recuentos microbianos por debajo del rango de valores que se recogen en el RD 3484/2000, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Con las condiciones utilizadas durante el cocinado, se obtuvo un plato de dorada “listo para consumir” de una calidad sensorial aceptable durante 62 días en refrigeración.

Las condiciones y materiales de envasado juegan un papel fundamental durante la elaboración, conservación y comercialización de los alimentos. En el capítulo IV se estudió el efecto del cocinado en bolsa y barqueta sobre el deterioro microbiológico (aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido lácticas, anaerobios totales psicrótrofos, mohos y levaduras, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*) físico-químico (pH y TBARs) y sensorial de filetes de dorada cocinados *sous vide*. Los resultados mostraron que ambos tipos de envasado fueron idóneos para el cocinado *sous vide* y posterior almacenamiento en refrigeración retrasándose en ambos casos el crecimiento microbiano y la oxidación lipídica. Asimismo se mantuvo una alta calidad sensorial de los platos aunque el plato envasado en barqueta mostró mejores puntuaciones en la calidad sensorial.

Por último, el efecto del tratamiento de tecnologías de conservación “altas presiones hidrostáticas” sobre la calidad microbiológica (aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido lácticas, anaerobios totales psicrótrofas, mohos y levaduras, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*), físico-química (pH, TBARs y TPA) y sensorial de un plato de dorada *sous vide*, fue estudiado en el capítulo V. Posterior a la elaboración y cocinado de los platos de dorada *sous vide*, las muestras fueron presurizadas a 300 y 600 MPa durante 5 minutos a 5 °C, mediante sistema de altas presiones industrial. Posteriormente las muestras fueron almacenadas durante 62 días a temperatura de refrigeración ( $2 \pm 1$  °C) realizándose controles microbiológicos, físico-químicos y sensorial del producto. En base a los resultados obtenidos, el tratamiento de altas presiones no eliminó la carga microbiana inicial de aerobios mesófilos de los platos tal y como se esperaba, aunque los valores obtenidos se encontraron dentro del rango que garantizan la seguridad de los platos durante al menos 62 días. Cabe destacar, que los atributos de textura fueron mejorados con el uso de altas presiones (600 MPa), lo que implica una importante mejora en la calidad sensorial del plato *sous vide*.



## SUMMARY

The present thesis is composed of five chapters. The use of strategies to increase the shelf life of fresh seabream (*Sparus aurata*) fillets from the microbiological, physical-chemical and sensory point of view, was studied. In addition, developing of new products with seabream from aquaculture to diversification was investigated.

Chapters I and II focused on the study of different strategies to improve the microbiological, physico-chemical and sensory quality of raw seabream fillets. In Chapter I the effect of ozone as a bactericidal agent in the microbiological quality of fresh seabream fillets were evaluated. The study consisted of immersion the fillets in ozonated water with different ozone concentrations (0.35, 0.50 and 0.75 mg l<sup>-1</sup>) for 10 minutes and extending the time of immersion of the fillets, 20 and 40 minutes with a concentration of 0.30 mg l<sup>-1</sup>. The microbiological quality of water (counts to 22 °C and 36 ° C, Coliforms, *E. coli*, Enterococcus and *Clostridium perfringens*) and fish (total viable counts, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, Coliforms, *E. coli* and *Pseudomonas spp.*) and analysis texture profile (TPA) were carried out in the different samples to observe any changes as a result of such exposure. Based on the results obtained, ozone was effective in sterilizing the water network of an aquaculture industry in all the concentrations used, completely eliminating the microbial load. However, the concentrations used in the water and prolonged exposure times, do not significantly reduced the initial microbial load in seabream fillets, not thereby improving the microbiological quality of the fillets.

In Chapter II, the effect of the type of packaging, modified atmosphere (40% CO<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub>, 30% O<sub>2</sub>) and vacuum packaging, in order to increase the shelf life of seabream fillets was studied. During 14 days of storage, the samples were stored in display case at 3 ± 1 ° C reproducing marketing conditions. During the control days, were carried out physical-chemical analysis (pH, WHC, TBARs, TVBN, TMA and colour), microbiological (total viable counts, *Enterobacteriaceae*, Coliforms, *E.coli*, *Pseudomonas spp.*, anaerobic, Psychrotrophic and lactic acid bacteria) and sensory analysis of fresh fillets. As storage time increased, the fillets gradually deteriorated, however microbiological level, both packaged studied, and they slow down this deterioration. A sensory level packaged in vacuum and modified atmosphere helped

keep the odour of fish, the colour of fish muscle and texture, about fillets packaged aerobically, which showed a high degree of deterioration in the 7 day of storage.

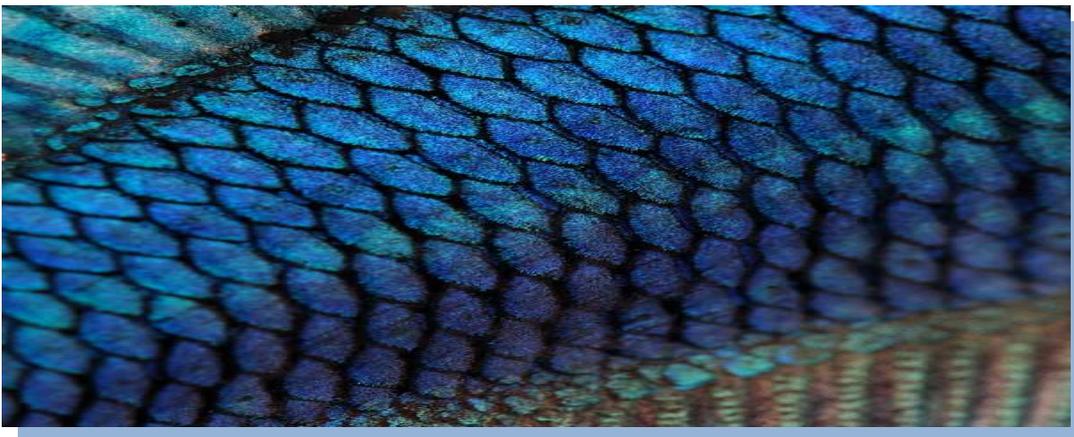
Due to the increased consumption of prepared meals and the need for diversification of products from fish aquaculture, the chapter III of the present Thesis, studied the development of a seabream dish "ready to eat" cooked by *sous vide* technology. Prior to the study, the panelists chose the ideal temperature for cooked fillets and the sauce accompanying the dish. *Sous vide* product was stored in refrigerated display cabinet for 62 days at  $2 \pm 1$  °C. In the control days (0, 7, 17, 34, 48 and 62), physico-chemical (pH and TBARS), microbiological (aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, lactic acid bacteria, psychrotrophic, anaerobes, molds and yeasts, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*) and sensory analysis, were performed. The optimum temperature of 60 °C proved to be cooked, and the green sauce was chosen as the most suitable for combination with the seabream. During the storage time, the samples maintained the microbial counts below the range of values listed in RD 3484/2000, laying down hygiene rules for the production, distribution and sale of prepared foods are established. With the conditions used during cooking, seabream *sous vide* product obtained an acceptable sensory quality for 62 days under refrigeration conditions.

Packaged, is very important during the preparation of meals, storage and marketing of food. In Chapter IV, the effect of cooking on bag and tray on microbiological spoilage (aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, lactic acid bacteria, psychrotrophic total anaerobes, molds and yeasts, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*) physico-chemical (pH and TBARS) and sensory analysis, was studied in *sous vide* product. The results showed that both packaged, were suitable for packaging the cooked *sous vide*, later refrigerated storage and delayed in both microbial growth and lipid oxidation. Also, remained high sensory quality of the dishes but the dish packed in tray, showed better scores on the sensory quality.

Finally, the treatment effect of technologies "high hydrostatic pressure" on the microbiological quality (aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, lactic acid bacteria, psychrotrophic total anaerobes, molds and yeasts, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*), physical chemistry (pH, TBARs and TPA) and sensory analysis in *sous vide* product, was studied in Chapter V. After the preparation and *sous vide* cooked, the samples were pressurized to 300 and 600 MPa for 5 minutes at 5 ° C by Industrial high system pressures. The samples were stored for 62 days at refrigeration temperature ( $2 \pm 1$  ° C) performing microbiological, physico-chemical and sensory analysis. Based on the results, the high pressure treatment did not eliminate the initial microbial load of mesophylic aerobic of the *sous vide* product, as expected, although the values obtained were within the range that guarantee the safety of food for at least 62 days. Curiously, the texture attributes were enhanced with the use of high pressure (600 MPa), which means a significant improvement in sensory quality of the *sous vide* product.



# *INTRODUCCIÓN*





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La dorada (*Sparus aurata*)

La dorada (*Sparus aurata*) (Linnaeus, 1758) (**Figura 1**) es un teleósteo perteneciente a la familia *Sparidae* y orden Perciformes conformado por 29 géneros y unas 100 especies. Esta especie marina posee un cuerpo oval, más bien profundo y comprimido, una banda dorada entre los ojos (que resulta más notable en individuos adultos), bordeada por dos áreas oscuras. Puede alcanzar hasta 70 cm, siendo su talla más común entre 20 y 50 cm (FAO, 2010). *Sparus aurata* es una especie común en el mar Mediterráneo, la costa Este Atlántica, que comprende desde Gran Bretaña a Senegal, y más desconocida en el mar Negro. Es una especie eurihalina y euriterma, por lo que puede vivir en ambientes marinos o salobres, como lagunas costeras y zonas estuáricas, particularmente durante las primeras fases de su ciclo de vida (MAGRAMA, 2008).



**Figura 1.** Dorada (*Sparus aurata*).

Nace en mar abierto entre los meses de octubre y diciembre y los juveniles migran al principio de la primavera hacia las aguas costeras protegidas, donde pueden encontrar abundantes recursos tróficos y temperaturas más suaves. Muy sensibles a las bajas temperaturas (temperatura letal a partir de 4°C), a finales de otoño retornan al mar abierto, allí los peces adultos realizan la puesta. En el mar abierto, las doradas se encuentran usualmente sobre fondos rocosos y campos de algas (*Posidonia oceánica*), pero también son capturadas frecuentemente sobre fondos arenosos. Los peces jóvenes permanecen en áreas relativamente poco profundas (30 m), mientras que los adultos pueden alcanzar aguas más profundas, a partir de 50 m (MAGRAMA, 2008).

Esta especie es hermafrodita protándica. El desarrollo de la madurez sexual se alcanza en machos a los 2 años de edad con un tamaño comprendido entre 20 y 30 cm, y se alcanza en hembras entre los 2 y 3 años. Estas ponen entre 20.000 y 80.000 huevos cada día durante un periodo superior a 4 meses. En cautividad, la inversión sexual se produce por factores sociales y hormonales (MAGRAMA, 2008). Cabe destacar que la dorada puede vivir más de 10 años y su alimentación es principalmente de moluscos, crustáceos y pequeños peces.

La dorada está categorizada como un pescado semigraso, el cual posee un alto contenido en proteínas, bajo contenido en grasas saturadas, alto contenido en ácidos grasos omega-3 y en vitaminas B<sub>3</sub> y B<sub>12</sub>. Además es fuente de los minerales potasio y selenio en un alto contenido (MAGRAMA, 2012a). Por tanto, resulta un pescado extraordinariamente nutritivo y además, muy demandado entre los consumidores. Sin embargo, los recursos naturales del planeta Tierra son limitados y en este sentido, la producción de pesca extractiva alcanzó sus máximos a finales de los años 90, fluctuando desde entonces en torno al mismo nivel. Este dato indica que los océanos están siendo explotados cerca de su producción máxima. Según datos de la FAO, los futuros incrementos en producción de productos pesqueros sólo podrán provenir de la acuicultura (APROMAR, 2004).

## **1.2. Producción acuícola**

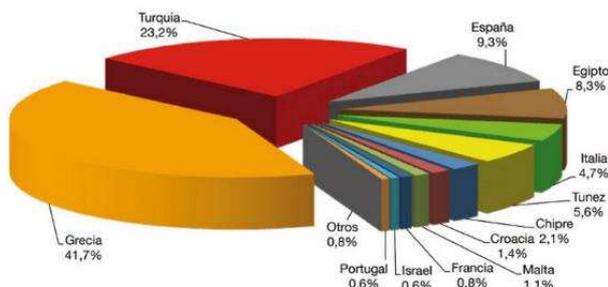
La acuicultura es uno de los sectores productores de alimento con mayor potencial de crecimiento y es la herramienta clave para aumentar la producción mundial de pescado al mismo ritmo que aumenta la población y sin sobreexplotar los recursos pesqueros. Su importancia como fuente de alimento de calidad es creciente en todo el mundo (APROMAR, 2012). La acuicultura es una fuente cada vez más importante de pescado en Europa, sin embargo no es igual para todos los países de la Unión Europea. En algunos su relevancia económica y social supera el valor de la pesca extractiva, como también ocurre en España en algunas Comunidades Autónomas (APROMAR, 2006).

Según la FAO (2004), la contribución de la acuicultura al suministro mundial de productos pesqueros (en peso) ha pasado del 3,9 % en 1970, al 29,9 % en 2002 y con

previsión de alcanzar el 50 % en 2025. Además, se debe resaltar que ya en 2006 casi la mitad de los productos pesqueros destinados al consumo humano directo provenían de la acuicultura. En 2011 en España, se encontraban en funcionamiento un total de 5.120 establecimientos de acuicultura de los cuales, 183 los eran de acuicultura continental (agua dulce) y 4.937 de acuicultura con aguas marinas o salobres (APROMAR, 2013).

España es el estado miembro de la UE con un mayor volumen de producción de acuicultura, con 264.162 t en 2012 (21,0 % del total de la UE), seguido por Francia (16,3 %) y el Reino Unido (16,1 %), resultando la especie de dorada, una de las más producidas, junto a la trucha arco iris y la lubina.

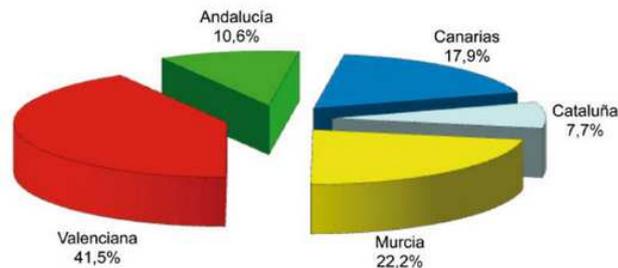
La producción acuícola total de dorada en Europa y el resto del mundo en 2013 se estimó en 179.924 t, según estadísticas de FEAP y APROMAR (2014). Esta cifra es un 11,42 % superior a la de 2012 (166.639 t) y supone un repunte tras la caída en ese ejercicio y el máximo de producción, por encima incluso del record de 2008 de 178.854 t. Existe producción de dorada de acuicultura en 19 países. La mayor parte de la producción mundial procede del Mediterráneo siendo los principales productores, Grecia (41,7 %), Turquía (23,2 %) y España (9,3 %) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Distribución porcentual de la producción de dorada de acuicultura en el área mediterránea y el resto del mundo en 2013 (APROMAR, 2014).

En términos de producción, la dorada constituye la especie piscícola marina más cultivada en España. En concreto, la producción en 2013 fue de 16.795 t, un 13,6 % menos que en el año 2012 (19.430 t). Esta circunstancia supone una nueva caída de la producción de esta especie tras un ligero incremento en 2012. La máxima producción

anual española de dorada tuvo lugar en 2009, con 23.930 t. En 2013, la Comunidad Valenciana encabezó la producción de dorada de acuicultura en España (6.974 t) seguida por Murcia (3.730 t), Canarias (3.016 t), Andalucía (1.786 t) y Cataluña (1.292 t) (**Figura 3**) (APROMAR, 2013).



**Figura 3.** Distribución porcentual de la producción de dorada en España por CCAA en 2013 (APROMAR, 2014).

Atendiendo al panel de Consumo de la Dirección General de la Industria Alimentaria (MAGRAMA, 2012b), en los hogares españoles se consumieron 32.400 t de dorada en 2012, un 19,0 % más que en 2011. A nivel global, el principal mercado para la dorada sigue siendo Italia, donde se consumen más de 52.000 t anualmente. Los siguientes tres mercados son España, Turquía y Grecia.

APROMAR realizó una estimación aparente (producción + importaciones - exportaciones) de 24.660 t en España en el año 2012. La producción nacional de esta especie mediante acuicultura alcanzó 19.430 t, y la pesca, 1.230 t; a la vez se exportaron aproximadamente 4.000 t y se importaron 8.000 t. Con ello se estima que la producción nacional cubre aproximadamente el 62,4 % del mercado español de dorada (APROMAR, 2013).

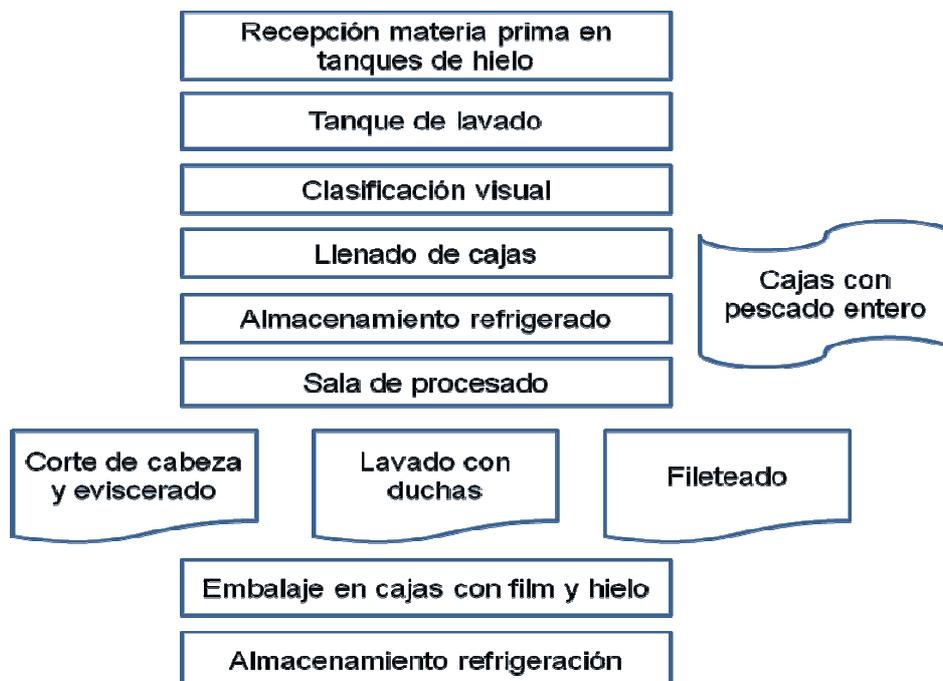
Datos de MAGRAMA (2012b) indicaron que son los jóvenes independientes los que más han incrementado el consumo de productos pesqueros con un crecimiento de un 6,6 %. No obstante, se mantiene como perfil de consumidores intensivos, los hogares que conforman familias con hijos medianos y mayores, parejas adultas sin hijos y jubilados.

La comercialización de dorada se produce principalmente a través de supermercados y grandes superficies siendo las pescaderías tradicionales, la tercera vía de venta. Actualmente, la forma habitual de comercialización de la dorada es entera y almacenada en hielo (**Figura 4**), sin embargo, según datos del observatorio de consumo y distribución alimentaria (2009), las preferencias del consumidor son las del pescado fresco pero listo para su cocinado, es decir, eviscerado y fileteado (MAGRAMA, 2009).



**Figura 4.** Dorada entera almacenada en hielo de venta en supermercado.

El diagrama de flujo del procesado del pescado en una industria acuícola hasta su expedición se muestra en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Diagrama de flujo procesado del pescado hasta su expedición.

El pescado es muy perecedero y, a menos que se trate correctamente tras su captura, puede pasar rápidamente a ser no apto para el consumo y posiblemente, peligroso para la salud debido a la proliferación microbiana, a los cambios en la composición química y a la descomposición causada por enzimas endógenas. Establecer medidas de manipulación, elaboración, conservación, embalaje y almacenamiento adecuadas en la industria, son imprescindibles para aumentar la vida útil, garantizar la inocuidad, mantener la calidad y los atributos nutricionales (FAO, 2014).

La ozonización es una de las medidas utilizadas en la Industria Alimentaria como sistema de higienización. Se utiliza para la desinfección, la mejora de la calidad organoléptica general del agua, la eliminación del hierro y el manganeso, la eliminación del color, la oxidación avanzada de los contaminantes persistentes y como reactivo para favorecer la coagulación. La norma europea EN 1278:2010 describe las características del ozono y se especifican los requisitos y los métodos de análisis correspondientes al mismo, proporcionando información sobre su uso en el tratamiento del agua. Así mismo, las aguas utilizadas en la Industria Alimentaria, deben cumplir con unas normas sanitarias establecidas (Real Decreto 140/2003) las cuales garanticen su salubridad, calidad y limpieza, con el fin de proteger la salud de las personas de los posibles efectos adversos derivados de cualquier tipo de contaminación. La microflora que pueden contener las aguas, procede de diversos orígenes como son el suelo y la vegetación, cuya estimación global proporciona información útil para la evaluación y control de la calidad del agua.

Los consumidores son cada vez más exigentes, demandando alimentos conservados de mejor calidad, similares a sus equivalentes frescos naturales, con buenas características nutricionales, saludables y que garanticen su seguridad alimentaria. Debido a ello, la Industria Alimentaria y en este caso la acuícola, se ha visto en la obligación de aumentar las tecnologías del procesado y conservación, para preservar al máximo las características saludables del pescado y prolongar su vida útil. Así, se abre la oportunidad de suministrar nuevos productos, nuevas presentaciones, aprovechando el potencial de colaboración de la pesca con la acuicultura (MAGRAMA, 2014).

Además de ello, el cambio en los estilos de vida como la incorporación de la mujer al trabajo, las nuevas formas de cocinar (tendencia a consumir alimentos crudos o

con tiempos muy cortos de cocinado o preparación), y el incremento de esperanza de vida (aumentando así el sector de la población anciana) ha dado lugar a la necesidad de producir alimentos que resulten fáciles de preparar y no lleven demasiado tiempo en su elaboración así como que resulten prácticos y seguros (Del Olmo, 2012). Los alimentos “listos para consumir” reúnen todas estas características, además de propiedades nutricionales y sensoriales que asemejan lo más posible a los platos cocinados de forma tradicional. Actualmente, la “V gama”, comprende alimentos ya cocinados, sometidos a un tratamiento térmico o pasteurización, elaborados y envasados, que solo requieren un mínimo procesado o calentamiento para su consumo. Los productos pueden ser envasados en atmósfera modificada o a vacío y refrigerados. Dentro de este grupo se engloban los alimentos “listos para consumir” (RTE- “ready to eat”) o también llamados “platos preparados”.

Los platos preparados han experimentado una auténtica revolución y ha supuesto una diversificación entre las opciones existentes para los demandantes. La familia de platos preparados destaca por su enorme variedad y, por tanto, la participación relativa de cada producto resulta diferente. Del total de platos preparados congelados (20,7 % del consumo total) destacan especialmente el pescado (37 %) y la carne (24 %) (Martín, 2012), lo que supone un creciente interés por el consumo de platos “listos para consumir” con una base de pescado.

### **1.3. Deterioro del pescado: cambios microbiológicos, físico-químicos y sensoriales**

Por calidad en el pescado se entiende el conjunto de propiedades que influyen en su aceptabilidad a la hora de ser comprado o consumido. Para lograr una buena calidad, debemos asegurar la conservación de las capturas desde el primer momento debido a que el pescado es uno de los alimentos que pierde rápidamente sus propiedades. Las alteraciones del pescado son un conjunto de cambios producidos por sus propias enzimas, bacterias y diversas reacciones químicas; estos cambios se ralentizan con la acción del frío. La velocidad de la descomposición y la prolongación de la vida útil, dependen de muchos factores que intervienen desde el mismo momento de la captura.

El deterioro de los productos de la pesca se inicia inmediatamente después de la muerte del animal debido al desarrollo de la microflora presente en ellos y a las

reacciones químicas y enzimáticas de degradación. Las características físico-químicas de estos productos, como una elevada actividad de agua y un pH neutro, la composición lipídica y la existencia de enzimas autolíticas y de microorganismos en la superficie corporal, limitan considerablemente su vida útil. Todos estos procesos de deterioro son dependientes de la temperatura. Tanto el crecimiento de la microflora como las reacciones de degradación predominantes varían según este parámetro. Por tanto, la conservación en condiciones óptimas de los productos de la pesca requiere, en la mayoría de casos, un control estricto de la temperatura de almacenamiento.

Una de las causas del deterioro de estos productos es la proliferación bacteriana. El músculo del pescado se contamina durante las etapas de eviscerado y fileteado por los microorganismos procedentes de las branquias, los intestinos y la piel. La práctica higiénica deficiente o incorrecta en estas etapas, reduce su tiempo de vida útil. Además, las reacciones metabólicas de algunas bacterias, originan compuestos causantes del mal olor (trimetilamina y compuestos azufrados) y otras sustancias perjudiciales para la salud como es el caso de la histamina, que puede desencadenar en problemas de alergia (García y col., 2006). Otros procesos que acortan la duración de los productos de la pesca son las reacciones enzimáticas que provocan el reblandecimiento del músculo y la aparición de olores y sabores extraños. Así mismo, la calidad de los productos se ve afectada por las reacciones de oxidación lipídica que dan lugar a sabores y olores a rancio (Sivertsvik y col., 2002). De tal modo, el pescado se altera principalmente por tres reacciones que tienen lugar tras el sacrificio: autólisis, oxidación lipídica y actividad microbiana.

### 1.3.1. Autólisis

Autólisis significa “auto-digestión” y viene determinado por diversas enzimas que se encuentran en el pescado vivo pero que una vez sacrificado, permanecen activas. En el momento de la muerte, el suministro de oxígeno al tejido muscular se interrumpe debido a que la sangre deja de ser bombeada por el corazón y por tanto no circula a través de las branquias donde, en los peces vivos, es enriquecida con oxígeno. Dado que el oxígeno no está disponible para la respiración normal, se restringe la producción de energía a partir de los nutrientes ingeridos. Para la mayoría de los peces teleósteos, la glucólisis es la única ruta posible para la producción de energía en cuanto el corazón

deja de latir. Este proceso, más ineficiente, genera principalmente ácido láctico y ácido pirúvico como productos finales con la consiguiente disminución del pH en el músculo (Huss, 1999).

En general, el músculo de pescado contiene un nivel relativamente bajo de glucógeno, comparado con los mamíferos y por esta razón se genera mucho menos ácido láctico después de la muerte. También el estado nutricional del pez, la cantidad y grado de agotamiento en el momento de la muerte, tienen un efecto marcado en los niveles de glucógeno almacenado y consecuentemente en el pH *post mortem* final. La disminución *post mortem* en el pH del músculo de pescado afecta a las propiedades físicas del músculo. A medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de retener el agua. El músculo en estado de *rigor mortis* pierde su humedad cuando es cocinado y resulta particularmente inadecuado para un procesado posterior que implique calentamiento, puesto que la desnaturalización por calor incrementa la pérdida de agua, siendo esto un efecto perjudicial en la textura del músculo (Huss, 1999).

No hay duda de que la manipulación acelera los cambios autolíticos en el pescado refrigerado. Esto quizá no sea sorprendente, pues se ha demostrado que muchas de las enzimas autolíticas se encuentran en discretos paquetes limitados por membranas, los cuales se rompen cuando están sujetos a un esfuerzo físico, originando la mezcla entre enzimas y sustratos. Presionar el pescado contra el hielo o contra otros pescados puede afectar seriamente la comestibilidad y el rendimiento en el fileteado, incluso para pescados con cargas bacterianas relativamente bajas, lo cual demuestra la importancia de los procesos autolíticos (Huss, 1999).

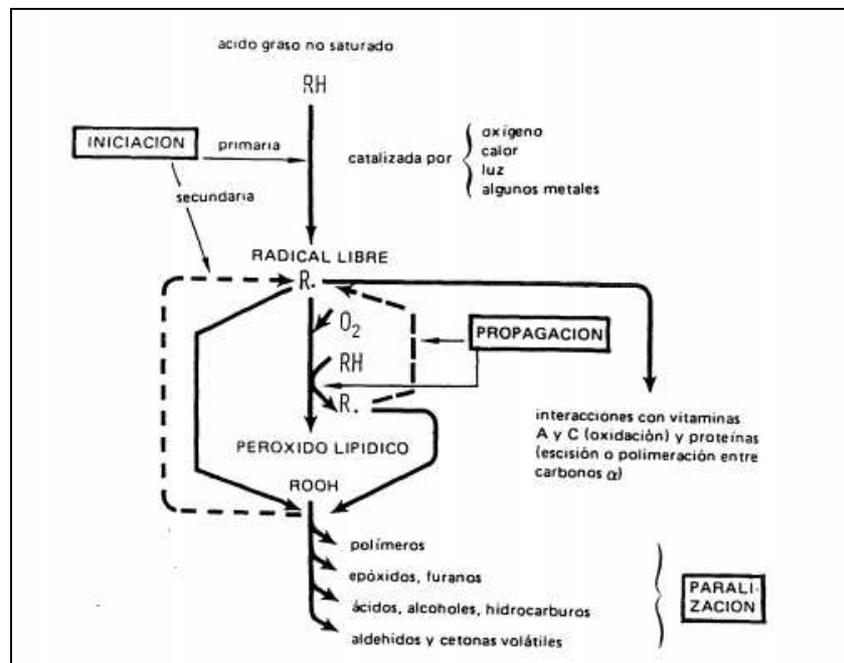
### 1.3.2. Oxidación lipídica

Los lípidos de origen marino, comparados con los lípidos de animales terrestres, presentan una elevada susceptibilidad a la oxidación, como consecuencia del alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Kolakowska y col., 2000).

Diversas reacciones pueden provocar la alteración de los lípidos, siendo las reacciones oxidativas aquellas que tienen una mayor incidencia sobre la calidad y valor

nutritivo de los productos (Aubourg, 1999), originando la aparición de olores y sabores a rancio, con el oxígeno como principal responsable. La formación de compuestos entre lípidos oxidados y proteínas puede influir en la calidad sensorial del aroma (formación de nuevos compuestos aromáticos), color (reacción de pardeamiento) y textura (desnaturalización y entrecruzamiento proteicos).

En la **Figura 6** se muestra un esquema básico de la reacción de oxidación de lípidos, que incluye las distintas etapas de que consta. Como resultado se produce una amplia gama de productos, la mayoría con funciones oxigenadas, que incluyen desde moléculas volátiles hasta compuestos poliméricos.



**Figura 6.** Esquema básico de la oxidación de lípidos (Cheftel y Cheftel, 1976).

Existen múltiples factores que favorecen los procesos auto-oxidativos de los ácidos grasos en materias primas lipídicas. La rancidez oxidativa promueve la formación de compuestos tóxicos impalatables y además destruye nutrientes como la vitamina E, DHA (C22:6 n-3, EPA (C20:5 n-3) (Sutton y col., 2006) y la vitamina A y reacciona con los enlaces sulfidrilo de las proteínas, reduciendo así la calidad de éstas.

### 1.3.3. Actividad microbiana

La actividad microbiana es la principal responsable de la putrefacción en los peces, ya que tan pronto como sobreviene la muerte, las bacterias comienzan a invadir los tejidos a través de las branquias, a lo largo de sus vasos sanguíneos y directamente a través de la piel y de la membrana de la cavidad ventral (Dávalos y col., 2005). La musculatura del pez contiene muy bajas concentraciones de carbohidratos, y además éstas se agotan durante la captura. Este hecho tiene dos consecuencias importantes con respecto a la alteración: en primer lugar, limita el grado de acidificación *post mortem* de los tejidos, de modo que el pH definitivo no suele bajar de 6.0, ejerciendo de ese modo un efecto tamponador, que permite el crecimiento de bacterias sensibles a pH ácido; en segundo lugar, la ausencia de carbohidratos da lugar a que las bacterias existentes en la superficie del pescado recurran inmediatamente a utilizar la mezcla soluble de sustancias nitrogenadas, que son fácilmente asimilables, produciendo olores y sabores desagradables (Adams y Moss, 1997).

Las bacterias en peces de aguas templadas son clasificadas en psicrótrofas y psicrófilas. Mientras que en las aguas cálidas pueden aislarse fundamentalmente microorganismos mesófilos. La microflora en peces de aguas templadas está dominada por bacterias psicrófilas Gram negativas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* y *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Photobacterium* y *Aeromonas*, aunque también existen microorganismos Gram positivos de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Coryneformes*. Por otro lado, en aguas contaminadas pueden encontrarse un elevado número de *Enterobacteriaceae*. En aguas limpias y templadas, estos organismos desaparecen rápidamente. Sin embargo se ha demostrado que *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* pueden sobrevivir durante periodos bastante prolongados de tiempo en aguas tropicales (Zdzislaw, 1990).

Entre la flora bacteriana que se puede identificar en el pescado en conservación, es importante diferenciar entre la “flora del deterioro” y las “bacterias específicas del deterioro”. El primer término describe el total de bacterias que podemos encontrar en un pescado en proceso de deterioro o descomposición, mientras que el segundo se refiere a bacterias que producen olores y sabores desagradables, los cuales se relacionan con el deterioro (Dalgaard, 2003). En el pescado fresco, las bacterias específicas del deterioro

son una porción minoritaria, la cual va creciendo hasta ser la gran mayoría de la flora bacteriana que encontramos a las 2-3 semanas de almacenamiento. Los productos de su metabolismo producen en gran parte los olores y sabores desagradables del pescado deteriorado. Entre las principales bacterias del deterioro del pescado almacenado en hielo se encuentran *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas spp* (Huss, 1995).

Tanto la actividad enzimática, como la microbiana están influenciadas por la temperatura de conservación, siendo su vida útil mayor cuando se almacena el pescado a bajas temperaturas. La práctica más común es almacenar el pescado fresco en hielo a 2 °C (Losada y col., 2004).

#### **1.4. Parámetros para evaluar el deterioro del pescado**

Debido a la gran variedad de especies y de modificaciones bioquímicas existentes, se han propuesto numerosos métodos de evaluación de la frescura y calidad del pescado: físicos-químicos, microbiológicos y sensoriales. Frecuentemente se realizan dos pruebas, una para determinar la pérdida de frescura, si es que se produjo, y otra para detectar el deterioro microbiano (Pons, 2005).

##### **1.4.1. Parámetro físico-químico**

La evaluación físico-química de la calidad de los productos pesqueros está relacionada con la capacidad para establecer estándares cuantitativos. Con ello se establecen niveles de tolerancia a través de indicadores químicos de deterioro, eliminando así las opiniones subjetivas en decisiones de calidad del producto. A su vez los métodos deben mostrar correlación significativa con las evaluaciones sensoriales. Son numerosos los parámetros que se emplean para determinar el grado de deterioro físico-químico del pescado, entre ellos:

- *pH*

En general, el pH del pescado tras su captura es de 7. Posteriormente, comienza a disminuir hasta valores comprendidos entre 6,2-6,5 por el acúmulo de ácido láctico y finalmente aumenta ligeramente debido a la formación de compuestos básicos. El pH influye sobre la velocidad de muchas reacciones químicas y enzimáticas, así como sobre

el desarrollo de microorganismos. La caída del pH afecta la textura de la carne, e incrementa la tendencia al exudo. Con la transformación del óxido de trimetilamina a trimetilamina, el pH puede subir quedando en 8.0 o 7.5 en el pescado pútrido (Pascual, 2000).

- *Color*

Los cambios de color que tienen lugar en el pescado, están asociados en general con el deterioro de la apariencia. La oxidación de lípidos implica cambios en el color, adquiriendo tonalidades grises y amarillentas. La carne del pescado fresco es translúcida, pero el pescado deteriorado, tiende a ser opaca. El mucus existente sobre la piel, que al principio es claro y acuoso, se enturbia, se hace grumoso y adquiere tonalidades diversas como resultado del abundante crecimiento microbiano (Zdzislaw, 1990).

- *Textura*

Los cambios que experimenta la textura del pescado comprenden la disminución de la elasticidad y la pérdida de firmeza, al tiempo que la superficie se torna adhesiva, en la mayoría de los casos, debido al crecimiento microbiano. El ablandamiento del músculo es el resultado de la desintegración estructural consecuencia de la relajación del tejido conjuntivo y de la fragmentación de las miofibrillas (Zdzislaw, 1990).

El principal factor que afecta a la textura del pescado fresco es el pH (Love, 2001). A medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de retención de agua. La pérdida de agua tiene un efecto perjudicial en la textura del músculo, ya que existe una relación inversamente proporcional entre la dureza del músculo y el pH (Huss, 1999).

La firmeza es un factor muy importante para evaluar la calidad de la carne de pescado y fundamental en el momento de su comercialización (Suárez y col., 2007), siendo el ablandamiento sinónimo de pérdida de calidad. Es por tanto indispensable entender los mecanismos que provocan éste fenómeno y así desarrollar estrategias capaces de prevenirlo (con la consecuente calidad de la carne).

- *Capacidad de retención de agua (CRA)*

La capacidad de retención de agua es la propiedad inversa al líquido exudado por el músculo del pescado durante su almacenamiento en refrigeración (Olsson y col., 2003). Está estrechamente relacionada con el pH, manteniendo el valor más alto cuanto mayor es el valor de pH. Con los cambios autolíticos se produce la hidrólisis del glucógeno y las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas sufren alteraciones, lo que da lugar a una disminución de la capacidad de ligar agua del músculo y tiene consecuencia sobre la textura y la apariencia.

- *Índice del ácido tiobarbitúrico (TBARs)*

El test del ácido tiobarbitúrico (TBARs), con sus diferentes modificaciones, es el método más utilizado para evaluar la extensión de la oxidación lipídica en pescados (Krzymien y Elias, 1990). El método se basa en la reacción entre el malondihaldehído (MDA), uno de los principales productos secundarios formado en la oxidación de los ácidos grasos insaturados y el ácido tiobarbitúrico para formar el complejo MDA-TBA de tonalidad rosácea. Raharjo y Sofos (1993) demostraron la existencia de correlaciones significativas entre los valores de TBARs y la intensidad de las notas desagradables de olor y *flavor*.

- *N-Trimetilamina (N-TMA)*

La Trimetilamina (expresada como nitrógeno de Trimetilamina N-TMA) es un compuesto básico volátil que no se encuentra en el pescado vivo. En el pescado fresco este compuesto se encuentra en cantidades muy pequeñas, pero es con el paso del tiempo y con el deterioro del pescado cuando tiene lugar un incremento como resultado de la reducción bacteriana del óxido de Trimetilamina (O-TMA) mediante la enzima OTMA-reductasa (Pons, 2005). El OTMA y su derivado N-TMA, conjuntamente con las sustancias grasas del pescado, dan lugar al conocido “olor a pescado” que es un indicador del deterioro bacteriano del mismo. Este olor tan característico provoca el rechazo del consumidor (Krzymien y Elias, 1990).

El OTMA es transformado en TMA por parte de numerosas bacterias, especialmente por *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreum*. No todas las bacterias son responsables del mal olor y sabor del pescado, lo son los microorganismos específicos del deterioro (MED) que producen H<sub>2</sub>S y reducen el

OTMA. *Shewanella putrefaciens* pertenece al grupo de MED del pescado de aguas templadas almacenadas en hielo. Por otro lado, si el producto es envasado a vacío, en presencia de CO<sub>2</sub>, el responsable de su deterioro es *Photobacterium phosphoreum* (Huss, 1995).

- *Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT)*

En el músculo de las especies marinas existen compuestos nitrogenados no proteicos que se usan como índices de calidad (Montecinos, 2006). Estos corresponden al contenido de bases volátiles totales, OTMA y TMA. El contenido de NBVT aumenta al producirse deterioro por acción bacteriana o enzimática y es usado como índice de calidad en productos marinos.

#### 1.4.2. Parámetros microbianos

El objetivo fundamental del análisis microbiológico en pescado es ofrecer información acerca de la calidad higiénica que presenta el producto durante la manipulación, elaboración o almacenamiento, así como la posible presencia de microorganismos de importancia para la Salud Pública (Morales y col., 2006).

El recuento de aerobios mesófilos resulta útil para conocer el grado general de contaminación bacteriana o el nivel de higiene aplicado durante su manipulación (Huss, 1995).

La determinación de *Enterobacteriaceae* es utilizada como indicador fecal y para la evaluación de las buenas prácticas en procesados y elaboraciones de productos alimentarios.

El término habitual de coliformes comprende *E.coli* y diversas especies pertenecientes a *Enterobacteriaceae*. *E. coli* es huésped constante del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente. Por su especificidad, está considerado como un buen índice de contaminación fecal. Tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extra entérico, por lo que su presencia en alimentos indica contaminación reciente. Se destruye a temperatura de pasteurización y también durante

el almacenamiento en frío, sobre todo a temperatura de congelación. Aunque no suele ser patógeno, existen cepas enteramente patógenas para el hombre (Pascual, 2000).

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram-negativa ampliamente distribuida en la naturaleza. Todas las cepas resultan patógenas para el hombre. Este microorganismo se encuentra en bajas concentraciones en los alimentos. Resulta ser un problema en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración, al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas (Hardalo y Edberg, 1997).

Dentro de la familia *Micrococcaceae* se encuentran los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*. A esta última pertenece la especie *Staphylococcus aureus*, la cual se caracteriza por ser gram positivo, catalasa positivo, no formador de esporas y con tendencia a agruparse en racimos especialmente cuando crece en medios sólidos. Es aerobio y anaerobio facultativo, cualidad que le distingue del género *Micrococcus*. Dentro del grupo de bacterias psicrófilas se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 7 °C o por debajo en las condiciones establecidas.

Los recuentos de anaerobios psicrótrofos incluyen, por lo general, no solamente las bacterias anaerobias obligadas, sino también microorganismos anaerobios facultativos pertenecientes a *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* fecales y *Staphylococcus*, al menos que se utilicen medios selectivos. Los recuentos de bacterias anaerobias mesófilas son útiles como indicadores de la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de organismos anaerobios productores de intoxicaciones alimentarias, tales como *Clostridium perfringens*.

Las bacterias ácido lácticas constituyen un amplio conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. La presencia de estas bacterias depende del pH del producto y de la eficiencia de la barrera de oxígeno del envase.

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, por lo que son frecuentes en la microbiota habitual de muchos alimentos; se dispersan fácilmente por el aire y el polvo. Ciertas especies de hongos y levaduras son

útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo también pueden ser causantes de la descomposición. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde las condiciones no favorecen el crecimiento bacteriano, por ejemplo: pH ácido, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, presencia de antibióticos u otros antibacterianos. Como grupo indicador son útiles para evidenciar grado general de contaminación en alimentos con estas características o cuando los mesófilos aerobios no son útiles, como en alimentos fermentados. También son indicadores del riesgo de desarrollo de hongos toxigénicos en alimentos como frutos secos, especias, cereales y otros granos, y sus derivados.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y, actualmente, se divide en 2 especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*. *Salmonella* es un bacilo Gram negativo, mesófilo y anaerobio facultativo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo el hombre y los animales los principales reservorios. Existen muchos estudios llevados a cabo sobre la incidencia de *Salmonella* spp. en carnes frescas, huevos, aguas contaminadas, etc. pero pocos son los datos en pescado y productos pesqueros porque la incidencia es muy baja (Feldhusen, 2000). Este hecho puede atribuirse a que, normalmente, el crecimiento de *Salmonella* se reduce sustancialmente a temperaturas inferiores a los 15 °C y se inhibe por debajo de los 7 °C (ICMSF, 2002), que son temperaturas demasiado elevadas para la conservación de los productos de la pesca.

A pesar de que *Listeria monocytogenes* es un microorganismo no esporulado, es resistente a las condiciones adversas ambientales. Es resistente al frío y al calor. Crece en condiciones óptimas a una temperatura de 30-37 °C, pero se diferencia de otras bacterias en que es capaz de crecer a la temperatura de refrigeración de los alimentos (4-10° C). Es capaz de desarrollarse en un amplio espectro de pH: crece a pH 4,4 y puede sobrevivir a pH inferior a 4,3 (Aguado y col., 2005). La resistencia a condiciones ambientales adversas permite que esté ampliamente distribuida en la naturaleza y que sea capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en alimentos, lo que supone un riesgo importante para cualquier producto envasado (Shineman y Harrison, 1994). Los alimentos más frecuentemente implicados en la transmisión de *L. monocytogenes*

son las carnes frescas y los productos cárnicos, los productos lácteos, las hortalizas y los productos derivados del pescado (Farber y Peterkin, 1991).

#### 1.4.3. Parámetros sensoriales

Los cambios sensoriales son los que percibimos a través de los sentidos, como son la apariencia, el olor, la textura y el sabor en el alimento. La comprobación organoléptica de la frescura supone determinar el grado de desarrollo alcanzado por los cambios post-mortem en el pescado, haciendo uso de los sentidos y aplicando un código que contiene los requerimientos mínimos y frecuentemente los criterios característicos de cada categoría de calidad. Los cambios físico-químicos y microbiológicos que ocurren en el pescado desde el momento de la muerte conllevan una serie de cambios sensoriales, de forma que, una estimación de frescura se puede obtener mediante la definición de criterios relacionados con el cambio en atributos como la apariencia, el olor, el color y la textura, que pueden ser medidos y cuantificados por métodos sensoriales o instrumentales (Olafsdottir y col., 2004).

Los primeros cambios sensoriales del pescado durante el almacenamiento están relacionados con la apariencia y la textura. Inmediatamente después de la muerte, el músculo está totalmente relajado y la textura es flexible y elástica. Tras algunas horas el músculo se contrae y se torna duro y rígido, de forma que todo el cuerpo se vuelve inflexible. Esta condición se mantiene hasta que se resuelve el *rigor*, que el músculo se relaja nuevamente y recupera la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al *rigor* (Huss, 1995). Posteriormente, durante el almacenamiento, la degradación del músculo provoca el ablandamiento de la carne (Ayala y col., 2010).

La firmeza es una de las características importantes para evaluar la calidad de la carne del pescado y fundamental en el momento de su comercialización. Cuando se requiere un criterio de calidad durante el almacenamiento del pescado refrigerado, se puede llevar a cabo una evaluación sensorial del pescado cocinado. Se puede detectar un patrón característico del deterioro del pescado almacenado en hielo, el cual puede ser dividido en las cuatro fases siguientes (Huss, 1999):

Fase 1. El pescado es muy fresco y tiene un sabor a alga marina, dulce y delicada. El sabor puede ser ligeramente metálico.

Fase 2. Hay una pérdida del olor y del gusto característico. La carne es neutra pero no tiene olores extraños. La textura se mantiene agradable.

Fase 3. Aparecen signos de deterioro y, dependiendo de la especie y del tipo de deterioro (aeróbico o anaeróbico), se producen una serie de compuestos volátiles de olor desagradable, como la TMA que tiene un olor a "pescado" muy característico. Al inicio de esta fase pueden aparecer olores y sabores ligeramente ácidos, afrutados y ligeramente amargos, especialmente en peces grasos. En los últimos estadios de esta fase se desarrollan olores nauseabundos, dulces, como a col, amoniacaes, sulfurosos y rancios. La textura se torna suave y aguada, o dura y seca.

Fase 4. Los signos de deterioro son más que evidentes en apariencia y olor. El pescado puede caracterizarse como deteriorado y pútrido.

### **1.5. Estrategias para la conservación y diversificación del pescado de acuicultura**

El pescado es un alimento muy perecedero, por ello el hombre ha tratado de prolongar su vida útil para aprovechar al máximo esta excelente fuente de nutrientes. Actualmente, la refrigeración y la congelación son los métodos más utilizados para la conservación de los productos de la pesca, además del tratamiento térmico, salazón, ahumado, escabechado, etc. El proceso de descomposición progresiva que sufren los pescados y mariscos desde el momento de su captura es irreversible y su velocidad está directamente relacionada con la temperatura de conservación. Por tanto y en primera instancia, la aplicación de frío como estrategia principal en la conservación del pescado, debe comenzar en los barcos donde tiene lugar la captura de los peces, tan pronto como sea posible, manteniendo la denominada "cadena de frío" en todas las etapas de la distribución hasta llegar al consumidor. Sin embargo, los cambios en el estilo de vida en los países industrializados han impulsado la aparición de nuevas tendencias en el consumo de alimentos debido a que existe un gran interés por los productos frescos y sin aditivos, que conserven sus propiedades nutritivas y organolépticas.

### 1.5.1. Envasado

El envase tiene un papel fundamental en la conservación de los alimentos debido a que desde el principio de los tiempos, el hombre ha necesitado almacenar, transportar y conservar los alimentos del algún modo. La estabilidad y seguridad de la mayoría de los alimentos se basa en la combinación de varios factores que no deberían ser vencidos por los microorganismos, garantizando así su seguridad e inocuidad, sin modificar sus propiedades nutritivas ni sus características organolépticas (Provincial, 2013). Así, en las últimas décadas, se han realizado considerables innovaciones en lo referente a materiales y sistemas de envasado, con indudable relevancia en la comercialización de alimentos más seguros, saludables y apetecibles (Herrero y Romero de Ávila, 2006).

El propósito consiste en proteger al producto de cualquier tipo de deterioro, bien sea de naturaleza química, microbiológica, biológica o física. En este sentido, las tecnologías de barrera, permiten mejorar la seguridad y calidad de los alimentos. Las barreras más comúnmente usadas son las altas o bajas temperaturas, la disminución de la actividad de agua, la acidez, el potencial redox, microorganismos competitivos y conservantes. Otros métodos que pueden mejorar la estabilidad y/o calidad de dichos productos son la aplicación de la alta o baja tensión de oxígeno, las atmósferas modificadas, el uso de altas o bajas presiones, radiación, etc. (Murno, 2003).

Los sistemas de envasado a vacío y el empleo de atmosferas modificadas representan una de las estrategias a utilizar por las industrias para satisfacer las necesidades del consumidor en este sector.

La utilización de atmósferas ha permitido, prolongar la vida útil de alimentos refrigerados o la comercialización de productos con mejor calidad organoléptica (Herrero y Romero de Ávila, 2006). Aunque el envasado en atmósfera modificada sea una estrategia actualmente muy extendida en la comercialización de alimentos de diversa naturaleza, es todavía una línea importante de investigación en los productos de la pesca (Herrero y Romero de Ávila, 2006).

El envasado a vacío representa un medio eficaz para inhibir las reacciones oxidativas pero es un método sólo moderado para inhibir la velocidad de crecimiento de

la flora anaerobia. La reducción de la concentración de oxígeno por sí misma no implica la inhibición de la velocidad de crecimiento microbiano hasta que la concentración de oxígeno se sitúa por debajo del 1% y se mantiene a dicho nivel. Es uno de los métodos de envasado más sencillos y económicos puesto que no hay consumo de gases en él (Brody, 2003). A su vez este tipo de envasado retiene los compuestos volátiles responsables del aroma, aspecto muy apreciado por el consumidor. Por otro lado, gracias a la barrera de humedad que se forma entre el material de envasado y el producto, impide las quemaduras por frío y la formación de cristales de hielo en el alimento envasado (García y col., 2006).

### 1.5.2. Cocinado *sous vide*

Otra de las técnicas empleadas en la conservación de alimentos y que representan el desarrollo de un sector que está actualmente en auge, el de las comidas preparadas, es el cocinado *sous vide*.

El cocinado *sous vide* “bajo vacío” en español, fue desarrollado por George Pralus a finales de 1960 en Francia, a partir de una técnica culinaria denominada *en papillote* que permitía mejorar el sabor y la textura de los alimentos cocinados. El cocinado *sous vide* o cocinado a vacío es definido como: “alimentos crudos que son cocinados bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura dentro de bolsas termoestables envasadas a vacío” (Schellekens y Martens, 1992). Este tipo de cocinado presenta las siguientes ventajas: no existe peligro de recontaminación del producto después del envasado; la transferencia de calor en el cocinado es uniforme en todo el producto; las pérdidas de sabores, aromas y nutrientes son bajos y la oxidación de los alimentos se previene debido a la eliminación del aire (99,9 %) (Church y Parsons, 2000; Baldwin, 2012; Batt, 2014).

La aplicación de la tecnología *sous vide* en la industria del catering permite la reducción de costes, aumento de la productividad, empleo de personal menos cualificado y mayor variedad y disponibilidad de platos cocinados (Creed, 2001). Los suaves tratamientos térmicos y el envasado a vacío, hacen de la tecnología *sous vide* un método de cocinado capaz de obtener alimentos con alta calidad nutricional (Schellekens, 1996).

El sistema *sous vide* implica diferentes fases donde los alimentos crudos o precocinados son envasados a vacío en bolsas herméticamente cerradas y estables al calor, son cocinados utilizando combinaciones moderadas de temperatura (65-90 °C) y tiempos largos (2-8 horas), enfriados rápidamente (a 3 °C en el centro del producto en 90 min) y almacenados en refrigeración (0-3 °C) durante varios meses. De esta forma se permite reducir la pérdida de agua del producto durante la cocción, conservar la calidad sensorial y nutricional de los alimentos y extender la vida comercial del producto con respecto a otros métodos de cocinado-refrigerado (Díaz, 2009).

Las temperaturas utilizadas en el cocinado de carne y pescado están situadas por debajo de 70 °C. El pescado es un ingrediente popular en el cocinado *sous vide*, sin embargo, para mantener la calidad intrínseca, el pescado debe ser cocinado a bajas temperaturas (Schellekens, 1996). El principal objetivo de muchos chefs es obtener una textura específica, la cual requiere temperaturas más bajas que las establecidas en la industria del catering. Desafortunadamente, utilizar temperaturas por debajo de 70 °C, puede no eliminar todos los microorganismos (Picouet y col. 2011).

La tecnología actual de fabricación de platos cocinados, no esterilizados, se basa en el denominado cocinado y enfriado o "*Cook and Chill*". En el caso de platos destinados a restauración diferida, es necesario además aplicar técnicas de envasado eficaces que garanticen una vida útil lo suficientemente amplia para acometer con garantía la comercialización del producto. El empleo de temperaturas de refrigeración o congelación contribuyen a alargar la vida comercial de los platos cocinados. El uso de equipos de enfriamiento cada vez más eficaces, como los abatidores de temperatura, permite obtener platos cocinados con una vida comercial de varios meses siendo los sistemas de cocinado-enfriado los más empleados en la industria del catering para la producción a gran escala de platos preparados.

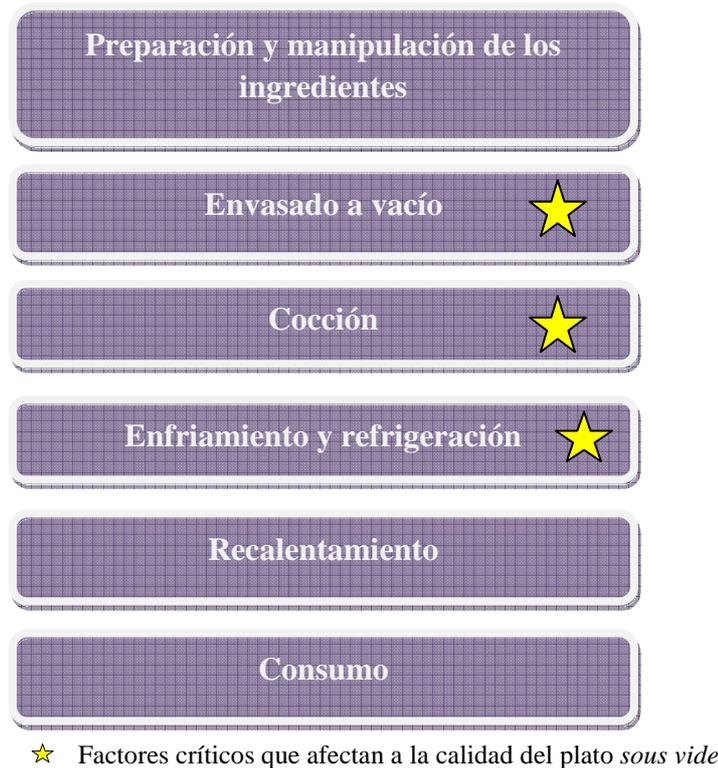
La principal desventaja del cocinado *sous vide* se centra en el empleo de bajas temperaturas de cocinado que no son capaces de destruir las esporas presentes en el alimento. De los microorganismos esporulados, el *Clostridium botulinum* representa el principal riesgo en los alimentos *sous vide*, debido a las condiciones de anaerobiosis. La principal estrategia para evitar la presencia de *Clostridium botulinum* es el

almacenamiento refrigerado, el cual debe estar por debajo de 3 °C (UNE-EN 167014:2014).

El Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, establece las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. En él se contemplan las nuevas directrices surgidas en las distintas comunidades y en el «Codex Alimentarius», así como las nuevas modalidades de elaboración y venta de comidas preparadas. Las normas microbiológicas para platos preparados, comprenden el control de aerobios mesófilos totales y *Enterobacteriaceae*, testigos de falta de higiene como son *E.coli* y *Staphylococcus aureus* y los patógenos, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

En la actualidad, existe un creciente interés por la Seguridad Alimentaria por parte de los consumidores. Por este motivo, se ha hecho imprescindible el desarrollo de normas cada vez más enfocadas a la seguridad, legalidad y calidad de los productos alimenticios tales como la norma UNE 167014 (2014) denominada “Hostelería. Requisitos de seguridad alimentaria y de procedimiento para unidades centrales de producción y distribución en línea fría completa”, incluye el texto íntegro de las normas UNE 167012:2010 y UNE-EN ISO 22000:2005, que representan los principales sistemas de gestión aplicados a la restauración colectiva. Esta norma establece los requisitos y recomendaciones para la calidad, la seguridad alimentaria y los procedimientos en Línea Fría para operadores que participen en uno o ambos de los siguientes procesos de la cadena: producción de platos elaborados y tratamiento en centros de destino.

**Figura 7** muestra el diagrama de fases del proceso de cocinado y enfriado de un plato cocinado *sous vide*.



**Figura 7.** Diagrama de flujo para la elaboración de un plato *sous vide*.

Existe gran variedad de envases para alimentos cocinados como son: envases de porciones individuales, bolsas para envasado a vacío, bandejas para alimentos congelados y refrigerados, bolsas flexibles (Brody, 2003), barquetas y bolsas termoresistentes para cocinado e incluso envases capaces de generar calor mediante reacciones químicas (óxido de calcio y agua). Los envases más utilizados en el cocinado *sous vide* están fabricados de materiales poliméricos. Estos materiales deben presentar determinadas propiedades barrera al paso de gases y vapor de agua, entre otros. Aparte de esta característica básica, es deseable que reúnan otras propiedades desde el punto de vista técnico, comercial, legal, etc.

Las bolsas son el recipiente más utilizado en el cocinado *sous vide*. Los distintos tipos de bolsas se diferencian en parámetros tales como su composición, espesor, retraction, resistencia mecánica, elongación, transparencia, brillo, permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, entre otros. Las bolsas retráctiles sujetan mejor el producto, disminuyen la exudación y mejoran la transmisión de calor, mientras que las bolsas de esterilización soportan mejor el tratamiento térmico, son más resistentes y más

duraderas y adecuadas para alimentos cocinados a los que se quiere proporcionar un largo periodo de caducidad.

Otro tipo de envase empleado en el cocinado de platos preparados son las barquetas plásticas termoselladas. El envasado en barquetas se puede realizar a vacío o en atmósfera modificada con el fin de evitar el colapso de las mismas. En los dos casos, implica el uso de *films*, los cuales deben cumplir los mismos requisitos que las bolsas plásticas.

Los materiales más utilizados para la fabricación, tanto de bolsas como *films*, son: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliamida (PA), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), policloruro de vinilideno (PVDC), copolímero etilenoacetato de vinilo (EVA), polietileno ionómeros y combinaciones entre ellos para aprovechar cada una de las propiedades individuales (Gómez y col., 2001). La elección de los materiales plásticos resulta crucial en el cocinado *sous vide*.

La conservación de los alimentos cocinados en envases plásticos, a vacío o en atmósfera modificada, no es comparable con la alcanzada por las conservas, donde existe una hermeticidad total y un proceso de esterilización. Los plásticos son permeables a diferentes cantidades de un determinado gas y vapor de agua, generalmente O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, que favorecen con el tiempo la proliferación de microorganismos patógenos y alterantes, así como una alteración de los alimentos por reacciones de oxidación química y enzimática (Díaz, 2011).

Otra característica importante, es su resistencia a la temperatura. En el cocinado *sous vide*, los alimentos envasados sufren tratamientos térmicos que, a pesar de emplearse temperaturas cercanas a la de pasteurización, se aplican durante varias horas. Debido a esto, los envases deben ser resistentes a altas temperaturas para evitar cambios en sus propiedades de barrera durante el cocinado prolongado, almacenamiento refrigerado y posterior regeneración (Díaz, 2011).

## 1.6. Tecnologías de conservación: Altas presiones

El tratamiento de altas presiones (*High Pressure Processing*) también denominado pascalización, presurización o simplemente alta presión, es una tecnología no térmica que permite aumentar la seguridad microbiológica de los alimentos y alargar su vida útil (Téllez-Luis y col., 2001). Está clasificado como pasteurización no térmica o procesado mínimo. Generalmente se realiza a temperaturas entre 5 y 12 °C y tiene como principal objetivo la inactivación de microorganismos y enzimas aunque puede ser usada también en la creación de nuevas texturas, conceptos y productos (Nunes y Grébol, 2011).

El procesado de alimentos por altas presiones es llevado a cabo mayoritariamente en el producto ya envasado, para eliminar los riesgos asociados a una posible recontaminación posterior a la elaboración y previa a la distribución.

El uso de las altas presiones se inició en la industria química, cerámica, metalúrgica y plásticas. Su aplicación a los alimentos fue experimentada por primera vez en la conservación de la leche (Hite, 1899), frutas y vegetales. Pero no fue hasta la década de los 80 cuando realmente se investigó de forma exhaustiva las relaciones entre las altas presiones y los alimentos. Las investigaciones sobre matrices alimentarias comenzaron en USA en 1982 con alimentos procesados de tipo ácido, como zumos y derivados de frutas (Ledward y col., 1995). No fue hasta el año 1990 cuando se estableció en Japón la empresa pionera en el uso de las altas presiones en alimentos, Meidi-ya, lanzando al mercado mermeladas, jaleas de frutas y salsas vegetales, envasadas y procesadas en frío (Thakur y Nelson, 1998). Aún tardaron unos años en aparecer las primeras aplicaciones comerciales de las altas presiones en la industria, en países como Francia, EE.UU. y España, pero éstas han irrumpido con fuerza. En España, en 1997, la empresa Espuña, pionera en este tipo de tecnología, lanzó el producto “jamón cocido loncheado”, tratado por HPP.

La presión afecta a las biomoléculas y a los microorganismos y para explicarlo existen dos principios teóricos y científicos, en primer lugar, el Principio de Pascal (1651), el cual afirma que “la presión aplicada sobre un fluido contenido en un recipiente se transmite por igual en todas las direcciones y a todas partes del recipiente”;

y el segundo, el principio de Châtelier (1884), que enuncia que “los fenómenos que acompañan a una reducción de volumen son favorecidos por un aumento de la presión, y viceversa”. La aplicación de la alta presión desplaza el equilibrio hacia la rotura/formación de enlaces.

El procesado de alta presión consiste en mantener el alimento bajo presión entre 100 y 1000 MPa normalmente, durante un cierto tiempo. La unidad de presión en el Sistema Internacional es el Pascal que equivale a  $10^{-5}$  bar. Esta unidad de medida es muy pequeña, por tanto se suele trabajar con MPa ( $10^6$  MPa) (Aparicio, 2009). Industrialmente se puede llegar a la presión de 6000 bares (600 MPa), usando agua como medio transmisor. Las presiones utilizadas habitualmente en la Industria Alimentaria se sitúan en el intervalo de 300 a 700 MPa (Ordóñez y col., 2004). La presión aplicada a los alimentos actúa de forma instantánea y uniforme en todos los puntos del producto independientemente de sus dimensiones y de su forma (Nunes y Grébol, 2011).

Según las diferentes presiones a las que son sometidas los productos, los resultados obtenidos en los componentes de los alimentos varían (**Figura 8**).

Presión (MPa)	Resultados
> 200	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cambios en la cinética enzimática.</li> <li>- Modificación en las propiedades físicas de las proteínas.</li> <li>- Alteración de la membrana de los microorganismos.</li> </ul>
> 300	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inactivación enzimática irreversible.</li> <li>- Muerte de los microorganismos.</li> </ul>
> 400	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gelificación del almidón.</li> <li>- Desnaturalización de las proteínas.</li> </ul>
> 500	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inactivación de esporas de mohos y levaduras.</li> <li>- Inactivación de las enzimas.</li> </ul>

(Fuente: [www.alimentosargentinos.gob.ar](http://www.alimentosargentinos.gob.ar)).

**Figura 8.** Efecto del tratamiento a diferentes presiones en los alimentos.

Además de factores intrínsecos, existen factores extrínsecos que pueden influir en el nivel de inactivación microbiana, de tal modo que depende del tipo de microorganismo, la fase de crecimiento durante el cual es procesado, de la presión aplicada, del tiempo de procesado, de la composición del alimento, temperatura, pH y actividad de agua (Tewari y col., 1999).

Las altas presiones producen cambios de tipo morfológico en las células vegetativas, en las cuales se ha observado y se pueden enumerar: compresión del gas de las vacuolas (a 0.6 MPa puede colapsarse), alargamiento de las células y formación de filamentos, separación de la membrana celular, contracción de la pared celular con la formación de poros, modificaciones del citoesqueleto, modificaciones de los núcleos y de los orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares fuera de la célula (Cheftel, 1995; Téllez y col., 2001).

Se establece la siguiente escala de resistencia a microorganismos a la alta presión: en el caso de levaduras y mohos, su inactivación sobreviene a presiones comprendidas entre los 200-400 MPa. Las bacterias gramnegativas son menos resistentes que las grampositivas, para las que se necesitan presiones del orden de los 500 a 600 MPa (ejemplo: *S. aureus*). Este fenómeno es explicable esencialmente por la diferencia estructural entre sus paredes: las bacterias grampositivas poseen una pared que contiene altas proporciones de peptidoglicanos y muy bajas de lípidos y proteínas, esta proporción se invierte en el caso de las gramnegativas. Los peptidoglicanos están formados por enlaces covalentes resistentes a la presión, al contrario que las proteínas y los lípidos, que se ven fuertemente afectados (Delacour y col. 2002).

Tanto para los mohos como para las bacterias, sus formas esporuladas son más resistentes que sus formas vegetativas. Las esporas bacterianas poseen el récord de tolerancia a la presión, presentando un problema en muchos de los protocolos de esterilización por altas presiones (esporas de *Bacillus* spp.), ya que no dejan de ser viables hasta presiones superiores a 1 GPa. Su inactivación necesita de la puesta en marcha de nuevas estrategias (combinación de presión con temperatura o agentes químicos, repeticiones de ciclos de presurización-despresurización) (Delacour y col. 2002). La mayoría de los autores coinciden en que las esporas bacterianas son las

formas de vida más resistentes a la presurización (Farkas y Hoover, 2011) y en algunos casos se requieren valores de hasta 1500 MPa a temperatura ambiente (Smelt, 1998).

Además de la inactivación microbiológica, otros componentes del alimento se ven afectados por el uso de las altas presiones, como es el caso de las enzimas, proteínas, carbohidratos y grasas (Nunes y Grébol, 2011). Las enzimas que pueden degradar los alimentos, son susceptibles de ser inactivadas mediante la modificación de la superficie de interacción substrato-enzima, modificando o anulando su funcionalidad, evitando pérdidas de calidad del producto y garantizando la estabilidad de sus propiedades a lo largo de su vida comercial (ejemplo: color, textura, etc. ).

Así mismo, las proteínas sufren igualmente ligeros cambios de estructura, por deformaciones y fragmentación de su estructura, que pueden influir en diferencias en la textura final. Algunos carbohidratos pueden gelificar en frío cuando son sometidos a altas presiones. El nivel y tipo de gelificación va a depender de la naturaleza del carbohidrato así como la presión aplicada (Butz y Tauscher, 2002).

Actualmente existen varias empresas del sector cárnico usando esta tecnología en el mundo (Japón, EEUU, Italia, España, Alemania y Australia). La aplicación más común es la higienización post-proceso, después del envasado. España fue la empresa pionera en todo el mundo en la aplicación industrial de esta tecnología a los productos cárnicos. Productos cárnicos procesados son actualmente mediante altas presiones, manteniendo el sabor fresco y las propiedades sensoriales del producto durante toda una vida comercial extendida, y reduciendo muy significativamente los riesgos asociados a microorganismos patógenos (Morales y col., 2006; Garriga y col., 2004).

Ensaladas, zumos de frutas, mariscos, carnes, pescados o lácteos, son algunos de los productos que, gracias al procesado por altas presiones, pueden comercializarse en el mercado como la alternativa de conservación más natural. También las empresas que se dedican a procesar pescados y mariscos han descubierto en esta técnica un importante aliado para comercializar y alargar la vida de los productos del mar. Las principales aplicaciones de las altas presiones en este campo están enfocadas a la apertura de moluscos. Este tipo de tecnologías no térmicas están ayudando a que las empresas de

alimentación sean capaces de poner en el mercado productos más frescos, mínimamente procesados y sin conservantes ni ingredientes artificiales (Spain Technology, 2011).

Diversos autores (Morata, 2008; Yaldagard y col., 2008) han descrito las principales ventajas e inconvenientes del uso de altas presiones en el procesamiento de los alimentos

Ventajas:

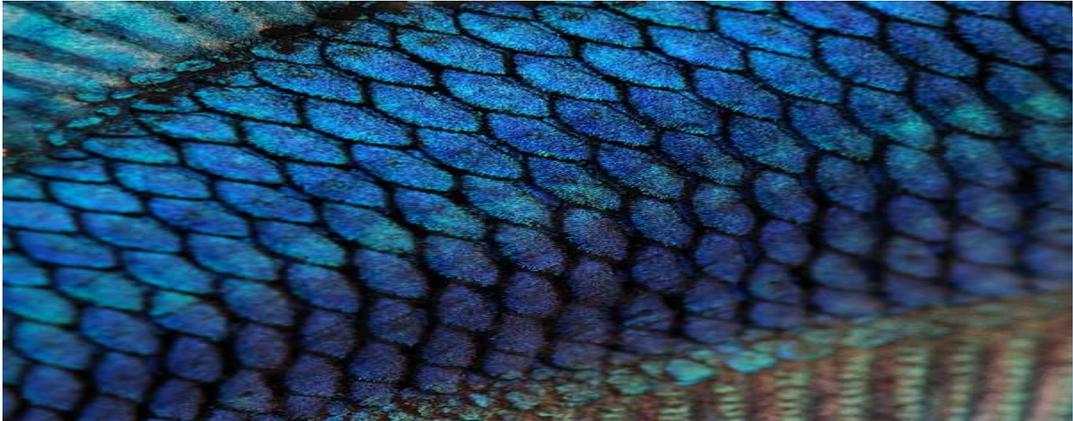
- La transferencia de presión a todo el sistema es instantáneo, lo que reduce el tiempo de procesamiento, independientemente del tamaño y geometría del alimento.
- La inactivación enzimática y la muerte microbiana puede producirse a temperatura ambiente, mejorando la calidad de los alimentos y reduciendo la cantidad de energía térmica necesaria en el procesamiento convencional.
- No rompe enlaces covalentes, por lo que se evita el desarrollo de olores y sabores extraños en el producto, manteniendo una alta calidad organoléptica y además el deterioro de nutrientes y vitaminas es escaso.
- Al ser un proceso isostático, es decir, uniforme en todo el alimento, la preservación es homogénea, sin partes que no resulten adecuadamente tratadas.
- Resulta útil para alimentos ácidos en los cuales las esporas no pueden germinar, ya que éstas no se ven afectadas por el procesamiento con altas presiones.
- En el caso de productos líquidos es posible el tratamiento sin envasado previo.
- El proceso puede considerarse respetuoso con el medio ambiente ya que solo necesita energía eléctrica y no se generan residuos.

Desventajas:

- Las enzimas y esporas de bacterias son muy resistentes a la presión y requieren presiones muy elevadas para su inactivación, por lo que puede decirse que la esterilización completa es complicada con esta tecnología.
- Puede existir actividad enzimática residual y oxígeno disuelto, dando lugar a la degradación enzimática y oxidativa de algunos componentes del alimento.
- La mayoría de alimentos procesados por altas presiones necesitan conservación y distribución a baja temperatura para retener sus propiedades sensoriales y nutricionales.
- La aplicación de esta tecnología supone elevados costes de inversión.



## *OBJETIVOS*





## 2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue la aplicación de estrategias y tecnologías en la conservación para incrementar la vida útil de filetes de dorada (*Sparus aurata*) frescos y cocinados.

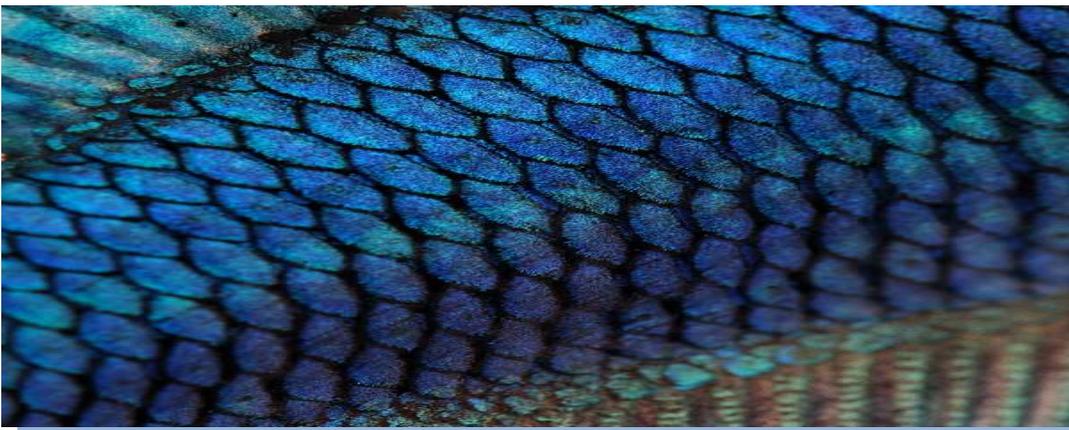
### 2.1. Objetivos específicos

Para llevar a cabo este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos.

- Evaluar el efecto del tiempo y de la concentración de ozono durante la inmersión de filetes de dorada en agua ozonizada sobre la calidad microbiológica y la textura del pescado.
- Evaluar el efecto del envasado (vacío y atmósfera modificada) sobre la calidad microbiológica, físico-químico y sensorial de filetes de dorada almacenados en refrigeración.
- Desarrollar un nuevo producto con base de dorada cocinada mediante tecnología *sous vide*.
- Estudiar el efecto del envasado (bolsa y barqueta) sobre la calidad microbiológica, físico-química y sensorial de dorada cocinada *sous vide*.
- Evaluar el efecto del tratamiento de altas presiones sobre la calidad microbiológica, físico-química y sensorial de dorada *sous vide*.



## *MATERIAL Y MÉTODOS*





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se detalla el material y los métodos generales utilizados en la presente Tesis Doctoral. Cada sección será ampliada de forma específica en cada capítulo correspondiente.

#### 3.1. Muestras

Las doradas (*Sparus aurata*) empleadas en la presente Tesis Doctoral procedían de la empresa acuícola Culmarex S.A., ubicada en Águilas (Murcia). Se utilizaron peces de talla comercial con un peso medio de  $460 \pm 20$  g. El sacrificio se llevó a cabo por hipotermia mediante inmersión de los peces en agua fría, donde el cambio brusco de temperatura genera el choque térmico.

#### 3.2. Análisis Físico-Químicos

##### 3.2.1. Composición proximal

###### 3.2.1.1. Cenizas

La determinación de cenizas se realizó gravimétricamente por incineración a 550 °C (ISO 936:1998).

Se pesaron 5 g de muestra ( $P_m$ ) en crisoles previamente pesados ( $P_i$ ). Posteriormente los crisoles con la muestra se introdujeron en una mufla a temperatura de 550 °C durante un tiempo de 8 horas. Una vez finalizado el proceso, se realizó el pesado de los crisoles en balanza de precisión obteniendo el peso final ( $P_f$ ). Para el cálculo del % de cenizas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = ((P_f - P_i) / (P_m)) * 100$$

### 3.2.1.2. Humedad

La determinación de la humedad (ISO 1442: 1997) del producto se realizó pesando 10 g de muestra en placas petri de vidrio previamente taradas y desecadas en estufa a 105 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se dejaron enfriar en desecador y se volvieron a pesar.

El porcentaje de humedad se calculó:

$$\text{Humedad} = ((P1 + P2) - (P3 / P2)) / * 100$$

Donde:

P1: peso de las placas desecadas 24 horas en estufa

P2: peso de la muestra

P3: peso final correspondiente a la placa más carne de pescado seca

### 3.2.1.3. Grasa Total

La determinación del porcentaje de grasa se realizó mediante extracción con éter de petróleo según el método Soxhlet (ISO 1443:1979) en unidad extractora büchi (Labortechnik AG, Switzerland).

La extracción de la grasa de las muestras, tuvo lugar en vasos de vidrio los cuales habían sido previamente pesados para conocer el peso del vaso vacío. Se pesó 1 g de la muestra de pescado desecado (procedente del análisis de humedad) y totalmente picado en papel de filtro de 8x8 cm aproximadamente.

Los vasos se llenaron con 100 ml de éter de petróleo 40-60 °C (Panreac Quimica SAU, Barcelona) y fueron colocados en cada una de sus posiciones del aparato extractor büchi. En la parte superior del aparato se colocaron las muestras con el papel de filtro y se procedió al proceso de extracción. Dicho proceso es automático y consta de cuatro

pasos en los cuales se produce el calentamiento del disolvente (éter de petróleo), la evaporación del mismo, y la extracción de la grasa de la muestra. Una vez finalizado el proceso, los vasos de recogida se retiraron de la unidad de extracción y se dejaron en estufa (105°C) durante media hora.

Transcurrido este tiempo, se sacaron los vasos y fueron colocados en desecador. Finalmente se pesaron en balanza de precisión.

La cantidad de grasa total en la muestra se obtuvo mediante la ecuación:

$$\% \text{ Grasa} = [\text{peso vaso con grasa} - \text{peso vaso vacío} / \text{peso muestra}] * 100$$

Este resultado implica la grasa total en materia seca para expresarlo en materia húmeda, se realiza la siguiente transformación:

$$\% \text{ Grasa MH} = [\% \text{ grasa MS} * (100 - \% \text{ humedad de la muestra})] / 100$$

MS= materia seca

MH= materia húmeda

#### 3.2.1.4. Proteínas

Para la determinación del nitrógeno proteico se siguió el método de Kjeldahl (ISO 937:1981). Este método consta de dos fases, una digestión previa de las proteínas en medio ácido y una posterior destilación del producto de la digestión.

La digestión de las proteínas, se basa en la hidrólisis ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) de las proteínas utilizando un catalizador para acelerar la reacción. Durante la digestión, el nitrógeno de la muestra se convierte en sulfato de amónico de acuerdo con la reacción:



Posteriormente tiene lugar la destilación del nitrógeno y valoración. Mediante la destilación en medio fuertemente básico el amonio se transforma en gas amoniaco, el cual es recogido en ácido bórico. La posterior titulación con ácido clorhídrico permite el cálculo de nitrógeno presente en la muestra.

Para realizar todo lo descrito anteriormente, se pesaron 0,25 g de muestra en la balanza de precisión sobre un papel absorbente, se envolvió la muestra y se colocó todo en un tubo de digestión. Se añadieron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y catalizador de proteínas  $\text{CuTiO}_2$ . Los tubos se colocaron en el digestor (Digestión unit, Büchi 426, Suiza) y el proceso duró hasta que el contenido de los mismos quedó completamente transparente y de color verde azulado (proceso duración aproximadamente 6 horas). Una vez completada la digestión se procedió a la destilación en destilador (Büchi 323, Flawil, Suiza). Los parámetros del destilador fueron: 25 ml de agua/ 75 ml NaOH al 40 % / 0 s/ 3 min destilación. El producto fue recogido en vaso de precipitado de 250 ml con 25 ml de ácido bórico al 4% con indicador mixto.

Posteriormente se procedió a la valoración con valorador automático (702 SM Titrino, Metrohm, Herisau, Suiza). Dicha valoración fue realizada con HCl 0,1 N.

El porcentaje de nitrógeno total lo calculamos en la siguiente fórmula:

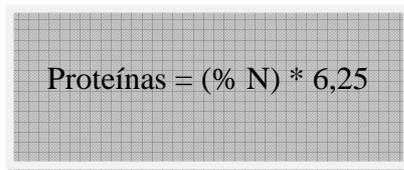
$$\% \text{ Nitrógeno total} = V * 0,14/P$$

Donde:

V= Volumen de ácido clorhídrico empleado en la valoración

P= Peso de la muestra

Esta fórmula está introducida en el valorador, el resultado que se obtiene directamente es el de % NT, por tanto la proteína se calcula multiplicando este valor por 6,25.

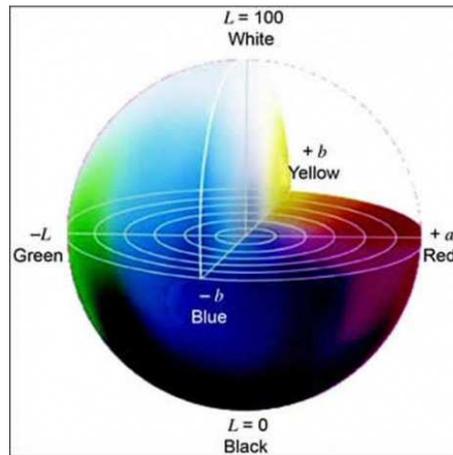

$$\text{Proteínas} = (\% \text{ N}) * 6,25$$

### 3.2.2. Color CIELab

Los cambios de color de los filetes de dorada fresca se evaluaron por reflectancia utilizando un Chroma Meter CR-400/410 (Konica Minolta, Osaka, Japón) de acuerdo al sistema CIELab.

Para la evaluación del color en los filetes de dorada, se realizaron tres medidas sobre la superficie de cada filete, en puntos distintos y posteriormente se realizó el valor medio de las distintas medidas efectuadas.

Los valores se basan en el espacio cromático L\* a\* b\* (**Figura 9**) en donde L\* es la luminosidad, la cual puede variar entre 0 (negro) y 100 (blanco); b\* representa el índice amarillo y varía entre las coordenadas amarillo (+50) y azul (-50) y a\* representa el índice rojo y varían desde el rojo (+50) al verde (-50) (Lambertsen y Braekkan, 1971).



**Figura 9.** Diagrama del espacio de color CIELab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ).

### 3.2.3. pH

El pH se determinó por homogenización del músculo de dorada sin piel con agua destilada (ISO 2917:1999). Se pesaron 5 gramos de dorada y se adicionaron 10 ml de agua destilada. Durante unos minutos se agitó la mezcla con una varilla de vidrio. La muestra se dejó reposar 5 minutos y a continuación se realizó la medida de pH con un pHmetro (Crison pH Meter GLP21), calibrado con patrones de cloruro de potasio de 4.01 y 7.00.

### 3.2.4. Capacidad de retención de agua (CRA)

La técnica para la determinación de la capacidad de retención de agua es la descrita por Grau y Hamm, (1953).

Para la determinación de la capacidad de retención de agua, se pesaron 0.3 g de muestra de músculo de pescado, previamente picado. La muestra se colocó en el centro del papel de filtro (Whatman nº 540), previamente pesado, entre dos placas petri. A continuación, se depositó suavemente sobre la placa superior un peso de 1 kg y se dejó durante 10 minutos, pasados los cuales, se retiró el peso.

Para conocer el porcentaje de agua libre de la muestra de carne se realizaron los siguientes cálculos:

$$\% \text{ agua libre} = (P1 - P0 / P) * 100$$

Donde:

P1 = Peso final papel

P0 = Peso inicial de papel

P = Peso de la muestra

La capacidad de retención de agua es calculada de la siguiente forma:

$$\text{CRA} = 100 - \% \text{ agua libre}$$

### 3.2.5. Índice de TBARs

La valoración del grado de oxidación lipídica de la carne fresca o cocinada de dorada, se realizó mediante el método descrito por Botsoglou y col. (1994).

Se pesaron 2 gramos de la muestra de dorada fresca o cocinada (sin piel) y se homogeneizaron con 8 ml de la disolución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) (5%) (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, España) y 5 ml de butilhidroxitolueno (BHT) (0.8%) (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, España) en hexano (Mallinckrodit Baker B.V. Deventer, Holanda) con Ultra-Turrax T25 durante 1 minuto a 9500 r.p.m. Los tubos con el homogenizado se centrifugaron en centrifuga (Kubota 2010, Kubota Corporation, Tokio, Japón) durante 10 minutos a 3000 r.p.m. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante de los tubos y se recogió el extracto ácido en los tubos de vidrio

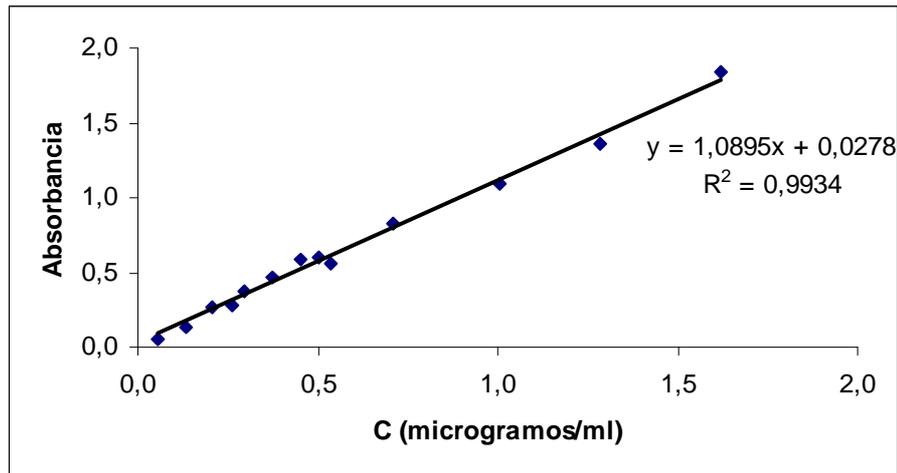
graduados. Los tubos se enrasaron hasta 10 ml con solución acuosa de TCA (5%) y se sometieron a otra centrifugación a 3000 r.p.m durante 10 minutos. Se recogieron alícuotas de 2,5 ml del extracto por duplicado y se introdujeron en tubos de vidrio pirex con tapón de rosca, añadiéndoles 1,5 ml de la disolución de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0.8% (Acros Organics Geel, Bélgica). Los tubos cerrados fueron introducidos en un baño de agua a 70 °C durante 30 minutos. Posteriormente, fueron enfriados rápidamente en un baño de agua a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) durante 5 minutos.

La concentración de TBARs (**Figura 10**) se cuantificó mediante espectrofotometría (UNICAM UV/Vis Spectrometer, Spectronic Unicam, Nueva York, Estados Unidos) midiendo a 532 nm frente a un blanco que contenía 2,5 ml de TCA (5%) + 1,5 ml TBA (0,8%).



**Figura 10.** Producto cromógeno resultado de la reacción entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA).

La cantidad de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARs) se calculó a través de una recta de calibrado, la cual se construyó utilizando la disolución del estándar TEP (tetra-etoxipropano) (**Figura 11**). La disolución de trabajo de MDA (22,5  $\mu\text{g/ml}$ ) fue diluida hasta una concentración de 4,5  $\mu\text{g/ml}$  a partir de la cual se prepararon sucesivas diluciones, manteniendo el procedimiento de extracción similar al detallado para las muestras.



**Figura 11.** Ecuación de regresión lineal de la curva de calibrado.

La fórmula final empleada para el cálculo de la TBARs expresada en mg MDA Kg<sup>-1</sup> se muestra a continuación.

$$\text{TBARs} = 4,5892A_{532} - 0,1275 \text{ [mg MDA / Kg]}$$

### 3.2.6. Nitrógeno de Trimetilamina (N-TMA)

En primer lugar se pesó 10 g de cada muestra de pescado triturado sin piel. La muestra fue homogeneizada con 20 ml de ácido tricloroacético al 7,5 % (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, España). Posteriormente la mezcla se filtró.

Se tomó 1 ml del filtrado y se transfirió a un tubo de ensayo Pyrex con tapón de rosca. Además de dicha alícuota se añadió 4 ml de agua destilada, 1 ml de formaldehído 37-38 % (Panreac Quimica SAU, Barcelona), 10 ml de tolueno (Panreac Quimica SAU, Barcelona), y 3 ml de la disolución de carbonato potásico (Panreac Quimica SAU, Barcelona). Toda la mezcla fue agitada vigorosamente.

A continuación, se tomaron 5 ml de la fase de tolueno y se transfirieron a un tubo de ensayo con 0,3 g. de sulfato sódico anhidro. Se cerró el tubo con el tapón de polietileno y se agitó suavemente durante unos minutos para deshidratar el tolueno. El contenido se decantó sobre otro tubo de ensayo seco y se añadieron 5 ml de la disolución de trabajo de ácido pícrico.

Una vez realizado todo lo anterior, se midió la absorbancia de la muestra a 410 nm mediante un espectrofotómetro (UNICAM UV/Vis Spectrometer, Spectronic Unicam, New York, USA) y se calculó el nitrógeno trimetilamina (N-TMA) en 100 g de pescado con referencia a una curva patrón. El blanco contenía 5 ml de tolueno y 5 ml de ácido pícrico.

Para la realización de la curva de calibrado se preparó una solución patrón de trimetilamina, 1 mg N-TMA/ml: La solución de trabajo de trimetilamina 0,01 mg N-TMA/ml consistió en la disolución de 1 ml de la solución patrón de trimetilamina 1 mg N-TMA/ ml en 100 ml con agua destilada. Se agregó 1 ml de HCl 1:3 antes de enrasar.

Con esta solución final de trabajo, se adicionó la cantidad correspondiente de 0 ml, 1 ml, 2 ml y 3 ml respectivamente en 4 tubos con rosca, adicionándoles un volumen determinado de agua destilada tal y como muestra la siguiente **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Curva de calibración para la determinación de N-Trimetilamina.

mg N-TMA Nominal	Volumen (ml) de solución 0,01 mg N-TMA/ml	Volumen (ml) de agua destilada
Blanco	0	4
0,01	1	3
0,02	2	2
0,03	3	1

Se agregaron los cuatro tubos con volúmenes finales de 4 ml descritos en el cuadro de arriba: 1 ml formaldehído, 10 ml de tolueno y 2 ml de solución de carbonato potásico.

Una vez se adicionaron estas cantidades, se taparon los tubos y se agitaron vigorosamente. A continuación, se siguió el mismo procedimiento que la metodología descrita arriba.

El paso final correspondió a la lectura de absorbancia de los estándares de calibración a 410 nm contra el blanco. Para la obtención de los resultados, estos fueron expresados a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{N-TMA mg/ 100 g} = (\text{mg (N-TMA)} * 50 * 100) / (4 * M)$$

Donde:

mg (N-TMA): valor correspondiente a la absorbancia de cada muestra dividida por el valor de la pendiente obtenida en la recta de calibrado (absorbancia/pendiente).

M: peso de la muestra en gramos.

### 3.2.7. Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT)

La determinación del nitrógeno básico volátil total en las muestras de pescado se determinó pesando 10 g de muestra de pescado sin piel triturado. Se mezcló con 90 ml de ácido perclórico 70-72 % (J.T. Baker, Holland), para así obtener la desproteínización de la muestra. La mezcla se homogeneizó durante 2 minutos con Ultraturrax, posteriormente se filtró. Se tomaron 50 ml del filtrado y se añadieron varias gotas de fenoltaleína para comprobar posteriormente que el extracto está suficientemente alcalinizado. Tras añadir unas gotas de agente antiespumante de silicona (Merck Kgoa, Germany), se añadió 8 ml de solución de hidróxido sódico (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, España) y se inició automáticamente la destilación por arrastre de vapor.

Se reguló la destilación de modo que se produjeron unos 150 ml de destilado en 4 minutos. El tubo de salida se sumergió en un recipiente con 100 ml de solución de ácido bórico (Panreac Química SAU, Barcelona), a la que se le añadieron de 3 a 5 gotas de la solución indicadora (indicador Tashiro) (Panreac Química SAU, Barcelona). Al cabo de 4 minutos, se cortó la destilación. La determinación de las bases volátiles contenidas en la solución receptora, se realizó mediante valoración con una solución patrón de ácido clorhídrico 0,01 N (Panreac Química SAU, Barcelona). A su vez se preparó un blanco utilizando 50 ml de solución de ácido perclórico.

El Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) expresado en mg/100 g muestra, fue expresado mediante la fórmula siguiente.

$$\text{NBVT} = ((V * 0,14 * 2 * 100) / M)$$

Donde:

V: volumen en ml de solución de ácido clorhídrico 0,01 N por muestra

M: peso de la muestra en gramos

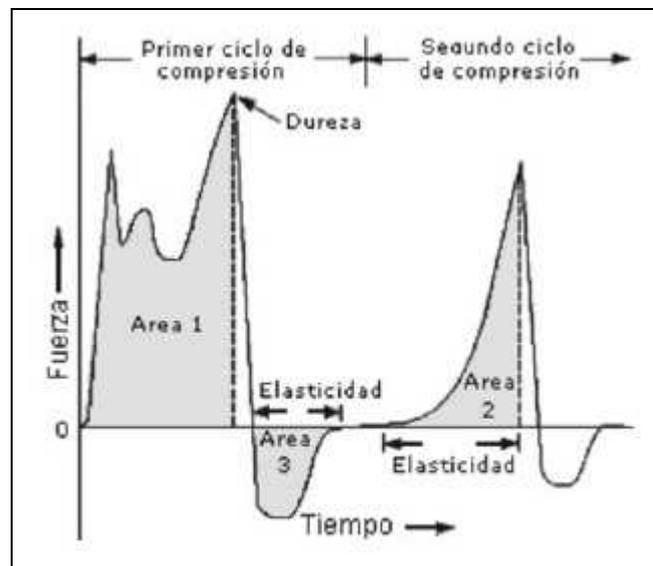
### 3.2.8. Perfil de Textura (TPA)

La textura de los filetes de dorada frescos y cocinados fueron evaluados instrumentalmente mediante un analizador de textura QTS-25 (Brookfield CNS Farnell, Borehamwood, Hertfordshire, Inglaterra) equipado con una célula de carga de 25 kg y el programa Texture Pro v. 2.1.

En ambos ensayos se realizó el Análisis del Perfil de Textura (TPA), cuyo fundamento es la doble comprensión, evaluándose en cada uno de ellos los parámetros que vienen definidos en la **Tabla 2** por Bourne (1978) y representado en la **Figura 12**.

**Tabla 2.** Definición de dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad según Bourne (1978).

Parámetro	Unidad	Definición
Dureza	N	Fuerza máxima correspondiente al primer ciclo.
Adhesividad	Ns	Energía necesaria para superar las fuerzas de atracción de la superficie en contacto con la sonda (A3).
Elasticidad	mm	Altura de recuperación de la muestra durante el tiempo transcurrido desde el final del primer ciclo y comienzo del segundo.
Cohesividad	-	Energía mecánica necesaria para destruir la estructura interna de la muestra. ( $A_2 / A_1$ ).
Gomosidad	N	Energía requerida para desintegrar una muestra semisólida a un estado adecuado para su deglución. (Dureza x Cohesividad).
Masticabilidad	N.mm	Energía requerida para masticar la muestra. (Gomosidad x Elasticidad).



**Figura 12.** Curva tipo para el Análisis de Perfil de Textura (TPA) (Bourne, 1978).

### 3.3. Análisis de ozono en agua

Mediante colorimetría se realizó el análisis de ozono en las diferentes muestras de agua. Para ello se utilizó el test de ozono HI38054 “Ozone Test Kit with Checker Disc” (Hanna Instruments). Dicho kit estaba compuesto por:

- HI 93711.0 Reactivo Cloro Total, paquetes (100 uds)
- Agua Desionizada, 1 botella (500 ml)
- 1 checker disc (contiene disco 38054)
- 2 viales de vidrio con tapas
- 1 pipeta de plástico (3 ml)

El rango de medición de ozono con este kit está entre 0 a 2,3 mg/l (ppm) de ozono. La metodología consiste en la reacción entre el ozono y el reactivo HI, el cual origina una coloración rosa en la muestra que es proporcional a la concentración de ozono.

El kit contiene dos viales de cristal los cuales se llenaron con 5 ml de la muestra a analizar. Uno de los viales situado en el lado izquierdo del Checker disc, resultó ser el blanco durante el test. Al vial utilizado para la medición con la cantidad de muestra a analizar, se le añadieron 5 ml de agua desionizada, se tapó y se agitó. A continuación, se le añadió un sobre del reactivo HI 93711-0, se cerró la tapa y de nuevo se mezcló la muestra. Transcurridos 2 minutos el vial se colocó en el orificio derecho del Checker Test. Para una correcta lectura resultó indispensable situar el Checker Test de forma que la luz incidiera en las muestras. Haciendo girar el disco y encontrando el color coincidente, se tomó lectura del valor en la ventana de resultados directamente en mg/l (o ppm) de ozono.

### 3.4. Análisis microbiológicos

En la **Tabla 3** se resumen cada uno de los microorganismos evaluados en las diferentes muestras de dorada (dorada fileteada cruda, dorada fileteada almacenada en atmósfera modificada, dorada fileteada envasada a vacío, dorada fileteada tratamiento inmersión en agua con ozono, dorada fileteada y cocinada *sous vide*), agua y superficie, de los diferentes ensayos realizados en la presente Tesis Doctoral.

**Tabla 3.** Cuadro resumen de los distintos análisis microbiológicos realizados en pescado, agua y superficie.

Microorg. Muestras	AM	EN	CO	PSE	EC	SA	PSI	AN	BAL	ML	S	LM	ENT	CO/EC	RC 22 °C RC 36 °C	CP
Dorada fileteada (AM)	■	■	■	■	■		■		■							
Dorada fileteada (a vacío)	■	■	■	■	■		■		■							
Dorada fileteada inmersión O <sub>3</sub>	■	■	■	■	■	■										
Plato dorada <i>sous vide</i>	■	■						■	■	■	■	■				
Salsa verde cruda	■	■	■						■							
Aguas													■	■	■	■
Superficie	■															

AM. Aerobios mesófilos; EN: *Enterobacteriaceae*; CO: Coliformes; EC: *E.coli*; PSE: *Pseudomonas* spp.; SA: *Staphylococos Aureus*; PSI: Psicrófilos; AN: Anaerobios; BAL: Bacterias Ácido Lácticas; ML: Mohos y Levaduras; S: *Salmonella*; LM: *Listeria monocytogenes*; ENT: Enterococos; CO/EC: Coliformes y *E.coli* totales; RC 22°C y RC 36 °C: Recuentos de colonias a 22 y 36 °C; CP: *Clostridium Perfringes* (incluidas esporas).

### 3.4.1. Pescado

La metodología llevada a cabo para el análisis microbiológico de la dorada fue la misma en todos los casos. El proceso de siembra tuvo lugar en campana de flujo laminar (Telstar, BIO-II-A, España). Se pesaron 10 g de musculatura del pescado libre de piel y espinas en condiciones asépticas en bolsa de *Stomacher*. Se añadieron 90 ml de agua de peptona tamponada (0,1 %) (Bio Rad, Marnes-la-Coquette, Francia, Marnes-la-Coquette, Francia) y la mezcla fue homogeneizada en un triturador de paletas “Stomacher” (IVL-Instruments) durante 1 a 4 minutos constituyendo esta mezcla la dilución inicial  $10^{-1}$ . A partir de esta dilución, se realizaron las diluciones seriadas pertinentes tomando 1 ml de la primera dilución y mezclándola con los siguientes tubos conteniendo 9 ml de agua de peptona. De tal forma se obtuvieron las diluciones:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , o bien 1/100, 1/1000 y 1/10000, etc. (ISO 4833-1:2014).

Una vez realizadas todas las diluciones, se tomó 1 ml de cada dilución con pipeta estéril y se realizaron los diferentes tipos de siembra (en masa, doble capa, etc.) según las especificaciones para cada tipo de microorganismo. Una vez sólido el medio de cultivo, las placas fueron incubadas en las condiciones de tiempo, temperatura, aerobiosis/anaerobiosis según los requerimientos para cada microorganismo.

El número de unidades formadoras de colonias (ufc) se determinó según el recuento manual en placas, considerando únicamente aquellas en las que crecieron entre 30 y 300 colonias. Los resultados fueron expresados en log ufc/g. Todos los medios de cultivo utilizados y materiales empleados fueron esterilizados en autoclave (Steam Sterilizer, Raypa) previamente a su uso, a 121 °C durante 20 minutos de acuerdo a las indicaciones de cada producto.

A continuación, se detallan en la **Tabla 4** los microorganismos analizados, los medios de cultivo empleados y las condiciones de temperatura de incubación para cada uno de los microorganismos estudiados.

**Tabla 4.** Microorganismos evaluados en la dorada, medios de cultivos empleados y condiciones de incubación.

Microorganismos	Medio de cultivo	Casa comercial	Condiciones de incubación
Aerobios mesófilos	Plate Count Agar	Scharlau, Madrid, España	37 °C- 48 h
<i>Enterobacteriaceae</i>	Rojo Bilis Violeta Agar	Conda Pronadisa, Madrid, España	30 °C- 48 h
Coliformes totales	Medio cromogénico <i>E.coli</i> -Coliformes	Conda Pronadisa, Madrid, España	45 °C- 24 h
<i>Pseudomonas</i> spp	Pseudomonas Agar Base +	Oxoid Basingstoke, Hampshire, Reino Unido	37 °C-24 h
	CFC Suplemento Selectivo para Pseudomonas +	Conda Pronadisa, Madrid, España	
<i>Staphylococos Aureus</i>	Glicerina Baird Parker Agar; +	Panreac, Castellar del Vallés, España	37 °C-48 h
	Suplemento emulsión yema de huevo con telurito	Bior Rad, Marnes-la-Coquette, Francia	
Bacterias psicrófilas	Plate Count Agar	Scharlau, Madrid, España	4 °C-7 días
Anaerobios psicrótrofos	Triptona Soja Agar	Conda Pronadisa, Madrid, España	4 °C- 7 días- jarra anaerobiosis
Bacterias ácido lácticas	Agar M.R.S	Conda Pronadisa, Madrid, España	30 °C-48 h
Mohos y levaduras	Agar rosa bengala con cloranfenicol	Bior Rad, Marnes-la-Coquette, Francia	20 °C-5 días

### *Salmonella*

*Salmonella* fue evaluada en el producto *sous vide*, tomando una muestra de 25 g (pescado y salsa), la cual fue homogeneizada con 225 ml de agua de peptona tamponada y la adición de un suplemento para el crecimiento de la bacteria (RAPID`*Salmonella* Capsule, Bio Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) (ISO 6579:2002). La bolsa de Stomacher con el pre-enriquecimiento, fue incubada a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se tomó con asa de siembra una muestra procedente de la bolsa del pre-enriquecimiento y se realizó siembra en triple estría en placas RAPID`*Salmonella* Agar (Bio Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.

### *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* se determinó en los productos *sous vide* de la misma manera que *Salmonella*, homogeneizando 25 g de muestra con 225 ml de Caldo de enriquecimiento para *Listeria* (Fraser Broth, Bio Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) en bolsa de Stomacher (ISO 11290-2:1998). Las bolsas fueron incubadas a 30 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, con asa de siembra se tomó muestra del pre-enriquecimiento y se realizó siembra en triple estría en placas con Agar selectivo para *Listeria* base según Ottaviani y Agosti (Bio Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) e incubadas a 30 °C durante 24 h.

#### 3.4.2. Agua

Filtración por membrana fue la metodología aplicada para el análisis microbiológico de aguas. Este método consiste en hacer pasar un volumen determinado (100 ml) de la muestra líquida a través de un filtro de membrana estéril (diámetro 4,5 cm; poro 0.45 µm), colocado en un equipo de filtración). Después de enjuagar con disoluciones estériles apropiadas (agua estéril y alcohol), se retira el filtro y se coloca, boca arriba, sobre la superficie de una placa de petri con el medio de cultivo adecuado según el tipo de microorganismos a analizar. Finalmente, se incuba a la temperatura indicada en cada caso.

Las aguas suministradas en recipientes cerrados, incluyendo las aguas minerales naturales, se analizaron en las 12 h siguientes al embotellado, manteniendo una temperatura de  $(5 \pm 3)$  °C durante este período.

Se analizaron los siguientes parámetros definidos según el Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios de la calidad del agua.

- *Detección y recuento de enterococos intestinales*

El método para el aislamiento de enterococos intestinales empleado fue el indicado en UNE-EN ISO 7899-2. En él se aislan *Enterococos faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae*. Además pueden determinarse otras especies de *Enterococcus* y algunas especies del género *Streptococcus* (en particular *S. bovis* y *S. equinus*).

El medio de cultivo empleado para el aislamiento de enterococos intestinales es Slanetz y Bartley (Scharlau, Madrid, España) con suplemento de cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTC) (Conda Pronadisa, Madrid, España). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

En el caso de observarse crecimiento de colonias típicas, sería necesaria una etapa de confirmación por transferencia de la membrana, con todas las colonias, sobre agar biliar de esculina y azida, precalentado a 44 °C. En este medio, los enterococos intestinales hidrolizan la esculina en 2 h. El producto final, la 6,7-dihidroxicumarina se combina con los iones hierro (III) para formar un compuesto de color marrón a negro, que se difunde en el medio. La placa se lee inmediatamente. Se consideran que todas las colonias típicas que muestren un color de marrón a negro, en el medio circundante, dan reacción positiva y se recuentan como enterococos intestinales.

- *Detección y recuento de E. coli y de bacterias coliformes*

La detección y el recuento de *E. coli* y bacterias coliformes se realizó siguiendo las directrices indicadas en ISO 9308-1:2001. El medio de cultivo empleado fue Agar Chapman TTC (Agar TTC con Lactosa y Tergitol 7) (Conda Pronadisa, Madrid,

España). Las condiciones de incubación fueron de 36 °C-21 h para Coliformes fecales y 44 °C-21 h para *E.coli*.

Las colonias sospechosas son capaces de fermentar la lactosa con la consiguiente producción de ácido, provocando un cambio de color del medio de verde a amarillo.

Así mismo otros crecimientos pueden ser observados:

- E.coli* y *Citrobacter spp* presenta colonias amarillas con centro de color naranja.
- Enterobacter spp* forma colonias rojas y amarillo fuerte con centro naranja. El medio es amarillo.
- Klebsiella spp* forma colonias rojas o amarillas, pero sin color en el centro. El medio es amarillo.
- Bacterias lactosa no fermentativas crecen con colonias violetas y el medio cambia a azul.
- Especies de *Klebsiella* y *Enterobacteria* pueden producir colonias amarillo-verdes.

En el caso de observarse colonias sospechosas, deben ser confirmadas mediante la prueba de la oxidasa y del indol. Son consideradas coliformes todas las colonias características que son oxidasa negativa. Las colonias oxidasa negativas e indol positivas son consideradas *Escherichia coli*.

- *Recuento de colonias a 22 °C y 37 °C*

El recuento de colonias a 22 y 36 °C en aguas fue realizado siguiendo la normativa (UNE EN ISO 6222:1999). El medio de cultivo que se empleó es el Extracto de levadura Agar (Conda Pronadisa, Madrid, España).

Se utilizó la técnica de la siembra en masa, haciéndose dos series de 2 placas cada una. En una de las series se depositó 1 ml de muestra en cada placa (realizándose las diluciones pertinentes en tubos con 9 ml de agua de peptona). Una vez fundido y aatemperado el medio ( $45 \pm 1$ ) °C, se vertió sobre la muestra en cada placa.

Según la norma ISO, las placas se incuban a dos temperaturas: una placa de cada serie a  $(36 \pm 2)$  °C durante  $(44 \pm 4)$  horas y las otras a  $(22 \pm 2)$  °C durante  $(68 \pm 4)$  horas. El cálculo tiene lugar contando el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro (ml) de la muestra, a partir del número de colonias formadores en el medio. Si no hay colonias en las placas sembradas con los volúmenes de ensayo de la muestra sin diluir, los resultados son expresados como: no detectado en un mililitro. Si hay más de 300 colonias en las placas sembradas con las mayores diluciones utilizadas, los resultados se expresan como: > 300 o solamente como valores aproximados.

- *Clostridium perfringes (incluidas las esporas)*

La evaluación de *Clostridium Perfringes* se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas en el Real Decreto 140/2003. El medio de cultivo empleado fue Clostridium Perfringes Agar base (m-CP) (Conda Pronadisa, Madrid, España). En el medio se adicionaron los siguientes suplementos: Vial A (D-dicloserina, Plimixina-B-sulfato y Indoxil- $\beta$ -D-glucopiranosido); Vial B (Fenolftaleína difosfato) y Vial C (Fe  $Cl_3 \cdot 6H_2O$ ).

Una vez se tuvieron las placas, estas se incubaron en condiciones de anaerobiosis durante  $(44 \pm 1)$  horas a  $(21 \pm 3)$  °C.

Los clostridios hidrolizan la sacarosa formando colonias de color amarillo considerándose por tanto, colonias sospechosas. Para la confirmación de las mismas, las placas se sometieron a los efectos de los vapores de hidróxido amónico durante un periodo de 20-30 segundos. Se contaron todas aquellas colonias que siendo amarillas cambiaron de color rosa o rojo.

### 3.4.3. Superficies

Para la toma de muestras de superficie se utilizaron hisopos estériles (Ecouvillons Irradiés ATL avec Peptone sel et neutralisant, La Chapelle-sur-Erdre, France) y una plantilla de aluminio estéril de dimensión  $10 \text{ cm}^2$ . Se determinó recuentos de Aerobios Mesófilos (AM) utilizando como medio de cultivo Plate Count Agar.

El procedimiento de toma de muestra de superficie consistió en delimitar la zona de muestreo mediante la plantilla estéril, humedeciendo el hisopo estéril en la solución salina que contiene, se realizó barrido por toda la superficie delimitada, de arriba abajo y de derecha a izquierda. Una vez realizado el hisopo es introducido en el tubo con solución salina estéril hasta su análisis.

Hasta el análisis, las muestras se conservaron en refrigeración. El inicio del análisis consistió en agitación del tubo con fuerza de manera que los microorganismos que hayan quedado atrapados en el algodón pasen al diluyente. Lo ideal es utilizar un agitador de tubos excéntrico. Se realizó diluciones seriadas debido a la contaminación de la muestra.

Para ello se depositó 1 ml del tubo con diluyente e hisopo en un tubo que contenían 9 ml de diluyente estéril, se agitó y se pipeteó 1 ml a otro tubo con 9 ml de diluyente estéril y así sucesivamente. A partir de la muestra (tubo con diluyente e hisopo) y de cada una de las diluciones (si ha sido necesario), se sembró por duplicado en placas de petri mediante el método de homogenización en masa. Una vez las placas solidificadas, fueron invertidas e incubadas en estufa a 37 °C durante 24-48 h.

### **3.5. Análisis sensorial**

Para realizar el análisis sensorial de los filetes de dorada frescos y cocinados y evaluar así la calidad y el deterioro en el pescado debido a las condiciones de envasado y tiempo de almacenamiento, se entrenó un panel formado por 8 catadores (6 mujeres y 2 hombres), pertenecientes al área de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Murcia, de acuerdo a la norma ISO 8586-2:2008.

Las catas se realizaron en una sala estandarizada del Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia, cumpliendo con las condiciones que debe tener una instalación de estas características (ISO 8589:2010).

A continuación se detallan el análisis sensorial llevado a cabo en el producto fresco y cocinado.

## 3.5.1. Filetes de dorada frescos

Se realizaron 6 sesiones de entrenamiento teórico-práctico de aproximadamente 1 hora de duración. Para ello se utilizaron filetes de dorada frescos almacenados en las mismas condiciones de estudio. Las sesiones tuvieron como objetivo estudiar los atributos de apariencia de la carne (color, apariencia del músculo, brillo), olor (fresco, rancio, ácido, amoniacal, pútrido) y textura táctil (elasticidad y adhesividad) de los filetes de dorada frescos. Se identificaron, seleccionaron y cuantificaron los atributos mediante una escala de 5 puntos. La calificación comprendía desde 1: débil a 5: fuerte.

Las muestras fueron sacadas de sus envases 10 minutos antes de la evaluación sensorial y se colocaron en bandejas. A cada bandeja se le asignó un código de tres dígitos.

Los atributos sensoriales evaluados aparecen recogidos en la **Tabla 5** y la hoja de cata utilizada por los panelistas se muestra en la **Figura 13**.

**Tabla 5.** Atributos evaluados durante la evaluación sensorial de filetes de dorada frescos.

Parámetros evaluados		Puntuaciones	
<b>Olor</b>	Pescado fresco	1: Débil	5: Intenso
	Amoniacal	1: ND	5: Intenso
	Rancio	1: ND	5: Intenso
	Ácido	1: ND	5: Intenso
	Pútrido	1: ND	5: Intenso
<b>Apariencia del músculo</b>	Color	1: Débil	5: Intense
	Brillo	1: Mate	5: Muy brillante
	Musculo	1: Seco, miotomos separados	5: Hidratados, miotomos adheridos
<b>Textura</b>	Adhesividad	1: No adhesivo	5: Muy adhesivo
	Elasticidad	1: No elástico	5: Muy elástico

ND. No detectado

Los filetes de dorada usados para el entrenamiento fueron envasados en condiciones de aerobiosis y almacenados bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y tiempo descritos en la sección experimental. Una muestra de aceite de pescado rancio fue utilizada por los panelistas durante los entrenamientos, como patrón de “rancidez” en el caso de que los filetes pudieran mostrar ciertos olores a rancio debido al transcurso del tiempo de almacenamiento. Durante la fase de entrenamiento, los panelistas apreciaron los cambios que se produjeron en los filetes de pescado como consecuencia del deterioro durante su almacenamiento en refrigeración: separación de los miotomos y pérdida de brillo (apariencia), aumento de la adhesividad y elasticidad (utilizando el dedo índice para hacer una pequeña depresión en el músculo del filete).

ANÁLISIS SENSORIAL DE FILETES DE DORADA CRUDOS				
Nombre	Puntuación de cada muestra			
Fecha	Código	Código	Código	Código
Atributo	_____	_____	_____	_____
<b>Olor a pescado fresco</b> 1: débil- 5: fuerte				
<b>Olor Ácido</b> 1: ND - 5: fuerte				
<b>Olor Rancio</b> 1: ND - 5: fuerte				
<b>Olor Amoniaco</b> 1: ND - 5: fuerte				
<b>Otros olores anómalos</b> 1: ND - 5: Intenso				
<b>Color Carne</b> 1: débil -5: intenso				
<b>Brillo</b> 1: mate -5: muy brillante				
<b>Apariencia músculo</b> 1: miotomos separados y secos -5: miotomos hidratados y juntos				
<b>Elasticidad músculo</b> 1: no elástico - 5: muy elástico				
<b>Adherencia</b> 1: no adhesivo -5: muy adhesivo				

**Figura 13.** Ficha de cata para el análisis sensorial de filetes de dorada crudos.

### 3.5.2. Dorada cocinada *sous vide*

La evaluación de la calidad y vida útil de los productos de dorada cocinados *sous vide* fue realizado por el mismo panel de cata entrenado que llevó a cabo el análisis sensorial de las muestras de dorada fresca, siendo en este caso el número total de panelistas, siete.

Los panelistas se sometieron a un entrenamiento específico correspondiente a 6 sesiones teóricas y prácticas con 1 hora de duración en cada una de ellas. En las dos primeras sesiones se evaluó las características sensoriales de los platos cocinados *sous vide*. Las cuatro siguientes sesiones se destinaron a seleccionar los atributos que describen al plato de dorada *sous vide* (**Tabla 6**) así como las puntuaciones de los mismos.

Finalizado el entrenamiento se realizó un análisis descriptivo cuantitativo (QDA) (**Figura 14**). Para la cuantificación se utilizó una escala no estructurada de 10 cm (UNE-ISO 4121: 2006), cuyos extremos correspondían a mínimo/máximo.

**Tabla 6.** Descripción de los diferentes atributos del producto de dorada *sous vide*.

<b>Atributos</b>	<b>Abrev.</b>	<b>Descripción</b>
<i>Apariencia de la salsa</i>		
<b>Brillo</b>	B	En relación con la cantidad de luz que incide sobre un alimento y lo que es capaz de reflejar
<b>Color</b>	CS	La salsa debe tener un color oro verde
<b>Emulsión</b>	E	La salsa debe mostrar la integración de todos sus componentes con ninguna separación de fases (aceite-agua)
<b>Viscosidad</b>	V	Fuerza necesaria para mover un líquido desde la cuchara a la boca, para tragar o extender sobre un soporte
<i>Producto Sous vide</i>		
<b>Color del pescado</b>	CP	Color intrínseco de pescado cocinado
<b>Olor global</b>	OG	Incluye el olor global del producto. El ácido acético, el ajo y el olor picante
<b>Otros olores</b>	OO	Olor rancio, a pescado y otros olores
<b>Olor ácido acético</b>	OAA	Olor a ácido acético
<b>Olor ajo</b>	OA	Olor a ajo
<b>Olor Albahaca</b>	OAL	Olor a albahaca seca
<b>Sabor global</b>	SG	Incluye el sabor general del producto (pescado, ácido acético, ajo, albahaca)
<b>Otros sabores</b>	OS	Sabores inapropiados del producto, tales como rancio, amargo y otros
<b>Sabor ácido acético</b>	SAA	Sabor a ácido acético
<b>Sabor ajo</b>	SA	Sabor a ajo
<b>Sabor albahaca</b>	SAL	Sabor a albahaca
<i>Textura del pescado</i>		
<b>Jugosidad</b>	J	Cantidad de líquido que se libera cuando se mastica la muestra
<b>Firmeza</b>	F	Resistencia a la deformación por aplicación de una fuerza, y registrado después de la primera masticación
<b>Pastosidad</b>	P	Sensación pastosa en la boca después de la primera masticación
<b>Calidad Global</b>	CG	Incluye todos los parámetros

**APARIENCIA DE LA SALSA**

Brillo

Color (amarillo/verde)

Emulsión

Viscosidad

**APARIENCIA DEL PESCADO**

Color

**OLOR PLATO COCINADO**

Olor global

Olor anómalo

Olor ácido acético

Olor ajo

Olor especiado

Olor pescado

**SABOR PLATO COCINADO**

Sabor global

Sabor anómalo

Sabor ácido acético

Sabor albahaca

Sabor ajo

**TEXTURA**

Jugosidad

Firmeza

Pastosidad

**CALIDAD GLOBAL**

The figure shows a series of horizontal lines for sensory evaluation, grouped by category. Each line is flanked by vertical bars at both ends, indicating a scale. The categories are: APARIENCIA DE LA SALSA (4 items), APARIENCIA DEL PESCADO (1 item), OLOR PLATO COCINADO (6 items), SABOR PLATO COCINADO (5 items), TEXTURA (3 items), and CALIDAD GLOBAL (1 item).

**Figura 14.** Ficha de cata para el análisis sensorial de dorada *sous vide*.

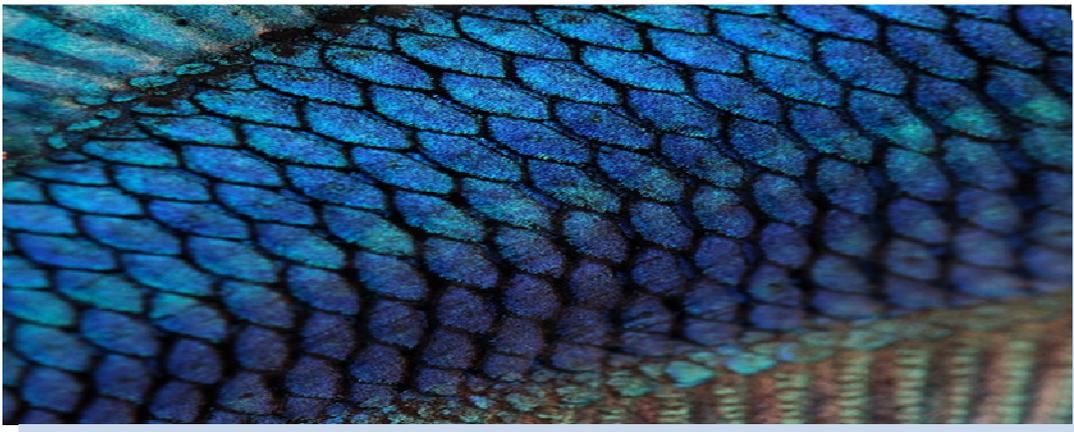
### **3.6. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en cada uno de los capítulos, fueron tratados y procesados estadísticamente a través del programa SPSS 15.0 versión para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL).

En primer lugar se realizó el análisis de varianza (ANOVA), este procedimiento se utilizó para comparar varios grupos de variable cuantitativa. Se usó con el fin de establecer la influencia del tipo de envasado, procesado o tratamiento así como el tiempo de almacenamiento en las distintas variables analizadas, con un nivel de confianza del 95 %. Así mismo, se utilizó el test de “Tukey”, que consiste en un test de comparaciones múltiples.



## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*





## **CAPITULO I. EFECTO DEL OZONO EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE FILETES DE DORADA.**

### **I.1. OBJETIVO**

El objetivo de este capítulo fue determinar el efecto de la concentración de ozono del agua y el tiempo de inmersión sobre la calidad microbiológica y la textura de filetes de dorada (*Sparus aurata*).

### **I.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **I.2.1. Muestras y tratamiento con ozono**

El estudio se llevó a cabo en la empresa acuícola Culmárex S.A, la cual dispone de un generador de ozono.

Se utilizaron doradas frescas con un peso medio de  $460 \pm 20$  g. Los peces fueron recibidos en la planta después de su captura, a las 7:00 h. Una vez allí, se realizó el lavado de los pescados dentro de la planta acuícola con unos sistemas de ducha. Posteriormente, los peces fueron colocados en cajas de poliestireno con hielo y almacenados en cámara de refrigeración. A continuación, se llevaron a la sala de fileteado donde fueron eviscerados y fileteados por operarios siguiendo correctas pautas de higiene y manipulación.

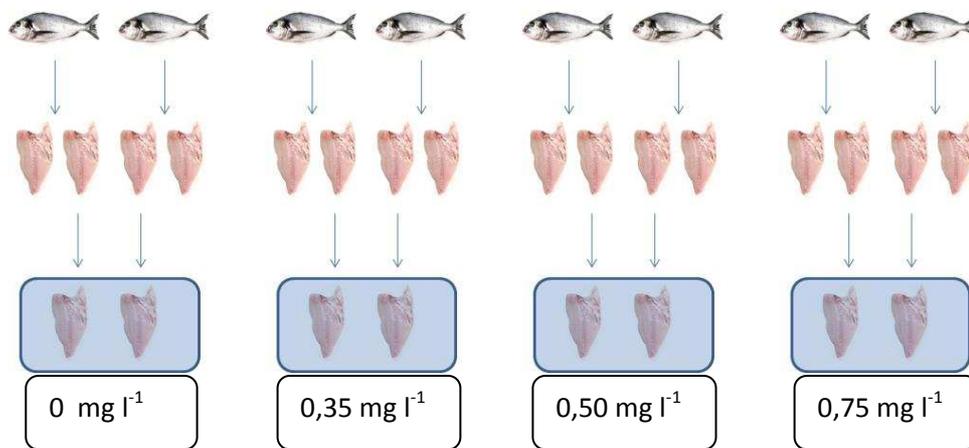
Una vez obtenidos los filetes, en la misma sala se procedió a realizar la inmersión de los mismos en agua con ozono valorando concentración y tiempo de inmersión. La producción del ozono fue mediante un generador (NPO GL2-A, GEO3 INT., Vigo, España) que la planta acuícola posee en sus instalaciones. La aplicación fue en forma de mezcla de gases mediante inyección en el agua. La concentración de ozono se expresó como  $[O_3] = \text{mg l}^{-1}$ .

Para ambos ensayos los baños experimentales utilizados fueron preparados de la misma manera, con un contenido de 5 l de agua y un ratio agua e hielo 80/20. El hielo fue añadido con el fin de mantener baja la temperatura del agua ( $5 \pm 1$  °C) y minimizar

así el crecimiento microbiano, además, la baja temperatura favorece la solubilidad del ozono.

### I.2.2. Efecto de la concentración de ozono

Dieciséis filetes de dorada fueron utilizados para estudiar el efecto de la concentración de ozono sobre la calidad microbiológica de los filetes. El tiempo de inmersión empleado fue de 10 minutos (Bono y Badalucco, 2012). Para ello se prepararon tres baños con diferentes concentraciones de ozono (0,35, 0,50 y 0,75 mg l<sup>-1</sup>). Se utilizó un baño de agua sin ozono (0 mg l<sup>-1</sup>) como control (**Figura 15**).



**Figura 15.** Baños experimentales con diferentes concentraciones de ozono.

Con el fin de conocer la calidad microbiológica inicial de los filetes de dorada, un filete de cada uno de los lotes experimentales fue envasado en una bolsa de plástico estéril, para su posterior análisis. Los restantes filetes de cada lote, fueron introducidos en sus respectivos baños durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, los filetes fueron sacados de los baños y colocados en bolsas estériles, situadas en cajas de poliestireno con placas de hielo y transportadas al Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia para sus correspondientes análisis.

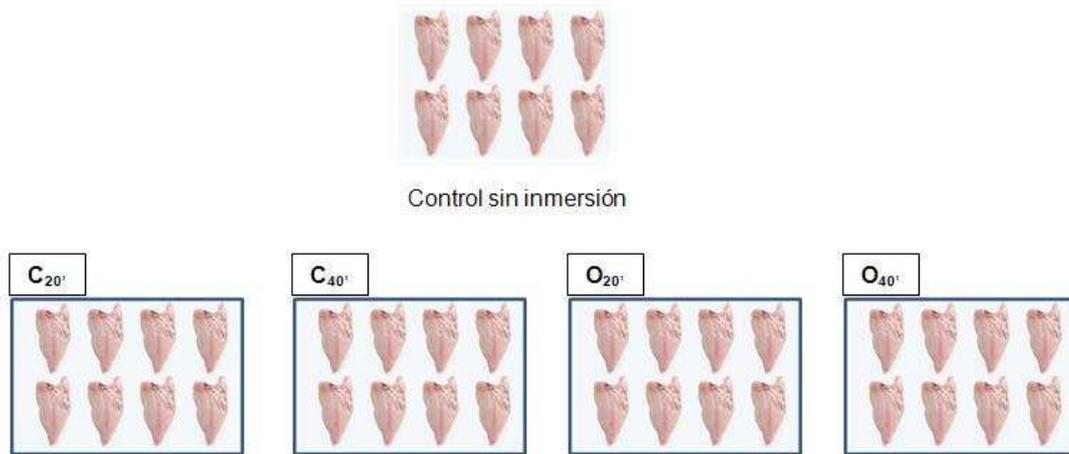
Se tomaron muestras de agua de los diferentes baños, antes y después de la inmersión de los filetes, en botellas estériles (Deltalab, España) con una capacidad de 1000 ml y se almacenaron en refrigeración hasta su análisis.

Se midió la concentración de ozono del agua en todos los baños tal y como se describe en la sección 3.3 del apartado de Material y Métodos. Además se determinó la concentración del ozono residual y la temperatura del agua.

El ensayo fue realizado por duplicado. Todos los análisis correspondientes a agua y pescado, se realizaron en el mismo día.

### **I.2.3. Efecto del tiempo de inmersión**

Cuarenta filetes de dorada fueron utilizados para estudiar el efecto del tiempo de inmersión en la calidad microbiológica y textura de los filetes. En cada baño se introdujeron ocho filetes, de los cuales, tres se destinaron al análisis microbiológico y cinco al análisis de textura. Los tiempos de inmersión estudiados fueron 20 y 40 minutos (Fukunaga y col., 1991) y la concentración de ozono usada para ambos baños fue de  $0,30 \text{ mg l}^{-1}$  (**Figura 16**), concentración suministrada por el generador de ozono de la planta acuícola en el momento de trabajo. Dos baños de agua sin ozono ( $0 \text{ mg l}^{-1}$ ) con los tiempos de inmersión a estudiar fueron utilizados como control ( $C_{20}$  y  $C_{40}$ ).



**Figura 16.** Baños experimentales con agua y ozono a los diferentes tiempos de inmersión.

El ensayo se realizó por duplicado. Todos los análisis llevados a cabo sobre el pescado y el agua se realizaron en el mismo día.

#### **I.2.4. Análisis microbiológico**

##### **I.2.4.1. Análisis microbiológico del agua mediante la técnica de filtración por membrana**

El recuento de los diferentes microorganismos del agua tratada con ozono antes y después de la inmersión de los filetes, se llevó a cabo mediante el método de filtración por membrana. En el apartado 3.4.2 de la sección de Material y Métodos, se detallan los materiales y la metodología empleada en el análisis.

##### **I.2.4.2. Microbiología del pescado**

El análisis microbiológico de los filetes de dorada se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 3.4.1 de Material y Métodos.

#### **I.2.4.3. Análisis instrumental de textura**

Se realizó el Análisis de Perfil de Textura (TPA) a los filetes sometidos a tiempos de inmersión prolongado (20 y 40 minutos). Los filetes de dorada sin inmersión en agua ozonizada se utilizaron como control.

Las medidas se realizaron en la parte dorsal de los filetes, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.8 de la sección de Material y Métodos.

#### **I.2.4.4. Análisis estadístico**

El efecto de la concentración de ozono sobre la microbiología del agua y los filetes de dorada, así como el efecto del tiempo de inmersión se determinaron estadísticamente tal y como se indica en el apartado 3.6 (Análisis estadístico) de Material y Métodos.

### **I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **I.3.1. Efecto de la concentración de ozono en la calidad microbiológica del agua**

En todos los casos, la concentración de ozono utilizada en este estudio fue  $< 1 \text{ mg l}^{-1}$ , máxima concentración proporcionada por el generador de ozono de la empresa. Las tres concentraciones utilizadas fueron 0,35, 0,50 y 0,75  $\text{mg l}^{-1}$  y los valores residuales después de la inmersión resultaron: 0,15, 0,30 y 0,30  $\text{mg l}^{-1}$  respectivamente (datos no mostrados). Por tanto, la concentración de ozono decreció después del tiempo de inmersión. La temperatura del agua en los diferentes baños se mantuvo en  $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Los recuentos obtenidos en R22, R36 y CL en el agua sin ozono, indicaron la contaminación de la misma (**Tabla 7**). En cambio, los recuentos de EC, ETC y CP mostraron valores  $< 1 \text{ log ufc g}^{-1}$  es decir, por debajo del límite de detección. Estos resultados son satisfactorios ya que estos microorganismos son usados como indicadores de calidad del agua y han conducido históricamente al concepto de protección de la Salud Pública (Rompré y col., 2002). También la contaminación de las esporas enterotoxigénicas *Clostridium Perfringes* en las superficies de contacto con los alimentos, supone una grave preocupación para la Industria Alimentaria, debido a su

alta resistencia a los diferentes métodos de conservación típicamente aplicados para el control de patógenos (Udompijitkul y col., 2013).

Los recuentos microbiológicos iniciales en todos los baños de agua con ozono, mostraron valores  $< 1 \log \text{ufc g}^{-1}$ , con diferencias estadísticamente significativas para R22 ( $P < 0,001$ ), R36 ( $P < 0,05$ ) y CL ( $P < 0,001$ ) respecto al agua control. Por tanto, el poder bactericida del ozono se vio reflejado en la calidad microbiológica del agua, observándose su efecto con independencia de la concentración empleada.

La inmersión de dorada durante 10 minutos supuso la contaminación del agua, resultando similar para todos los baños (con y sin tratamiento de ozono) aumentando significativamente los recuentos de colonias R22, R36 y CL en el caso de los baños de agua con ozono y recuento en R36 en el baño de agua sin ozono. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) en los recuentos EC, ETC y CP, siendo en todos los casos inferiores al límite de detección.

Hay que destacar que el tratamiento del agua en la industria, con una concentración de ozono de  $0,35 \text{ mg l}^{-1}$  en el agua, resultó suficiente para la completa eliminación de microorganismos, por tanto y de acuerdo con Selma y col. (2008), el empleo del ozono es una buena opción para la desinfección del agua de lavado en la industria alimentaria, un sistema alternativo a la cloración, ya que el ozono se descompone espontáneamente en productos no tóxicos (Restaino y col., 1995). Sin embargo, la hipercloración de las aguas residuales con un alto contenido en carbono orgánico podría producir inaceptables niveles de trihalometanos y otros productos cancerígenos de desinfección (Fawell, 2000).

**Tabla 7.** Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$  SD) de los recuentos microbiológicos (log ufc/ 100 ml) en agua ozonizada antes y después de la inmersión de los filetes de dorada.

	[O <sub>3</sub> ] (mg l <sup>-1</sup> )	R22	R36	CL	EC	ETC	CP
Antes	0	3,54 $\pm$ 0,09 <sup>x</sup>	3,06 $\pm$ 0,16 <sup>x,b</sup>	3,53 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup>	<1	<1	<1
	0,35	<1 <sup>y,b</sup>	<1 <sup>y,b</sup>	<1 <sup>y,b</sup>	<1	<1	<1
	0,50	<1 <sup>y,b</sup>	<1 <sup>y,b</sup>	<1 <sup>y,b</sup>	<1	<1	<1
	0,75	<1 <sup>y,b</sup>	<1 <sup>y</sup>	<1 <sup>y,b</sup>	<1	<1	<1
	<b>Significancia</b>	***	*	***	NS	NS	NS
Después	0	4,26 $\pm$ 0,37	3,73 $\pm$ 0,02 <sup>x,a</sup>	3,46 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup>	<1	<1	<1
	0,35	4,03 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	3,65 $\pm$ 0,05 <sup>x,a</sup>	2,78 $\pm$ 0,06 <sup>y,a</sup>	<1	<1	<1
	0,50	4,01 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	2,86 $\pm$ 0,25 <sup>y,a</sup>	2,35 $\pm$ 0,14 <sup>y,a</sup>	<1	<1	<1
	0,75	3,79 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,68 $\pm$ 0,14 <sup>x</sup>	2,65 $\pm$ 0,17 <sup>y,a</sup>	<1	<1	<1
	<b>Significancia</b>	NS	*	**	NS	NS	NS
<i>Significancia 0</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
<i>Significancia 0,35</i>	***	***	***	NS	NS	NS	
<i>Significancia 0,50</i>	*	**	**	NS	NS	NS	
<i>Significancia 0,75</i>	***	*	**	NS	NS	NS	

**R22:** Recuentos a 22 °C; **R36:** recuentos a 36 °C; **CL:** Coliformes; **EC:** *E.coli*; **ETC:** Enterococcus; **CP:** *Clostridium perfringens*.

**x, y, z:** Efecto de la concentración del ozono en la calidad microbiológica del agua antes y después de la inmersión de los filetes de dorada:

**a, b:** Efecto de la inmersión de los filetes de dorada en la calidad microbiológica del agua:

**NS.** No significancia; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

### I.3.2. Efecto de las diferentes concentraciones de ozono en filetes de dorada

Los valores medios obtenidos en los recuentos microbiológicos de los filetes de dorada inmersos en agua con diferentes concentraciones de ozono (0,35, 0,50 y 0,75 mg l<sup>-1</sup>) durante 10 minutos, se muestran en la **Tabla 8**. Los recuentos obtenidos en AM, EN y PSE de los filetes frescos antes de la inmersión, probablemente se deben a las condiciones de evisceración y manipulación del pescado. Sin embargo, los recuentos estuvieron por debajo del límite establecido en el Real Decreto 1521/1984 para productos frescos procedentes del pescado donde el límite microbiológico es 10<sup>6</sup> y 10<sup>3</sup> ufc g<sup>-1</sup> para aerobios mesófilos y *Enterobacteriaceae*, respectivamente. Además, CL y SA estuvieron por debajo de 1 log ufc g<sup>-1</sup>.

**Tabla 8.** Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$  SD) para los recuentos microbiológicos ( $\log$  ufc  $g^{-1}$ ) en filetes de dorada antes y después de la inmersión durante 10 minutos.

Microorganismos		Recuentos microbiológicos iniciales			
Antes	AM	3,93 $\pm$ 0,45			
	EN	2,99 $\pm$ 0,58			
	PSE	4,41 $\pm$ 0,30			
	CL	<1			
	SA	<1			
		0 mg l <sup>-1</sup>	0,35 mg l <sup>-1</sup>	0,50 mg l <sup>-1</sup>	0,75 mg l <sup>-1</sup>
		[O <sub>3</sub> ]	[O <sub>3</sub> ]	[O <sub>3</sub> ]	[O <sub>3</sub> ]
Después	AM	3,15 $\pm$ 0,31	3,59 $\pm$ 1,07	2,96 $\pm$ 0,51	3,51 $\pm$ 0,19
	EN	3,71 $\pm$ 0,25	3,08 $\pm$ 0,44	2,24 $\pm$ 0,55	3,19 $\pm$ 0,37
	PSE	3,95 $\pm$ 0,18	4,29 $\pm$ 0,38	4,25 $\pm$ 0,23	4,14 $\pm$ 0,31
	CL	<1	<1	<1	<1
	SA	<1	<1	<1	<1
<b>Significancia</b>		NS	NS	NS	NS

AM: Aerobios mesófilos; EN: *Enterobacteriaceae*; PSE: *Pseudomonas* spp.; CL: Coliformes; SA: *Staphylococcus aureus*.  
NS. No significancia.

Los recuentos obtenidos de cada microorganismo en los filetes sometidos a inmersión, determinaron que la concentración de ozono usada, no mejoró la calidad inicial del pescado, lo que demuestra que probablemente las concentraciones de ozono, el tiempo de inmersión o ambos, no fueron suficientes para eliminar o disminuir la carga microbiana inicial del pescado. La concentración de ozono en la industria no pudo ser aumentada, de acuerdo con Da Silva y col. (1998), el uso de bajas concentraciones de ozono, no resulta capaz de disminuir los recuentos microbianos en pescado. Sin embargo, los autores Bono y Badalucco (2012), sí observaron una reducción de la carga microbiana usando una baja concentración (0,3 mg l<sup>-1</sup>) en pescado “salmonete de roca” inmerso durante 10 minutos en agua ozonizada a 5 °C. Los autores Álvarez y col. (2009) también observaron que una baja dosis de ozono (0,2 mg l<sup>-1</sup>) aplicada en filetes de dorada con hielo ozonizado, ralentizó el crecimiento microbiano, aunque por el contrario observaron un efecto pro-oxidante. Son varios los autores que han indicado la necesidad del uso de altas concentraciones de ozono, para así reducir el crecimiento microbiano, tales como Crowe y col. (2012), donde indicaron valores de 1,5 mg l<sup>-1</sup> en la

reducción de los recuentos iniciales de aerobios totales, también Pastoriza y col. (2007) indicaron que cuando las concentraciones de ozono ( $\approx 2 \text{ mg l}^{-1}$ ) son suficientemente elevadas, el efecto del agua y hielo ozonizado pueden mejorar la calidad del pescado refrigerado. Así mismo, Gelman y col. (2005) observaron un efecto claro a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  en la acción bactericida del ozono en pescado, pero no a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . De acuerdo con los autores, probablemente, la temperatura del agua influya en la acción del ozono.

### **I.3.3. Efecto del tiempo de inmersión de los filetes de dorada en la calidad microbiológica del agua**

La concentración de ozono aplicada fue la que el generador proporcionó en ese momento de trabajo en la industria acuícola, que resultó ser de  $0,30 \text{ mg l}^{-1}$  y al final del tiempo de inmersión, el ozono residual fue  $0,10 \text{ mg l}^{-1}$ .

Los recuentos microbianos en el baño control antes de la inmersión mostraron valores  $< 1 \text{ log ufc g}^{-1}$  (**Tabla 9**), ya que el agua utilizada para el estudio en la industria acuícola había sido tratada previamente con una concentración de ozono ( $0,30 \text{ mg l}^{-1}$ ) la cual resultó una vez más, suficiente para asegurar la calidad microbiológica del agua. Sin embargo, la inmersión de los filetes de dorada durante 20 y 40 minutos supuso la contaminación del agua, aumentando significativamente en los recuentos R22, R36 y CL en todos los casos. Por el contrario, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) en los recuentos de EC, ETC y CP, siendo en todos los casos inferiores al límite de detección. En general, el ozono residual del agua no eliminó la carga microbiana obtenida en el agua debido a la inmersión de los filetes, sin embargo, se observó un efecto estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ) en los recuentos de R22 después de 20 minutos en el baño con ozono. Se trata de una pequeña diferencia en los recuentos que pudo ser debida a un efecto bactericida del ozono sobre la carga microbiana.

**Tabla 9.** Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$  SD) para los recuentos microbiológicos (log ufc/100ml) en agua ozonizada antes y después de la inmersión de los filetes de dorada durante 20 y 40 minutos.

Microorganismos	Antes	Antes inmersión (t= 20')		Sig.	Después inmersión (t= 40')		Sig.	Sig. Antes/ Después
		C	O <sub>3</sub>		C	O <sub>3</sub>		
<b>R22</b>	<1 <sup>b</sup>	4,07 $\pm$ 0,28 <sup>a,x</sup>	3,59 $\pm$ 0,20 <sup>a,y</sup>	*	3,48 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	4,00 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	NS	***
<b>R36</b>	<1 <sup>b</sup>	2,94 $\pm$ 1,33 <sup>a</sup>	3,28 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	NS	2,82 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	3,62 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	NS	***
<b>CL</b>	<1 <sup>c</sup>	3,87 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	3,82 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	NS	3,85 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	4,04 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	NS	***
<b>EC</b>	<1	<1	<1	NS	<1	<1	NS	NS
<b>ETC</b>	<1	<1	<1	NS	<1	<1	NS	NS
<b>CP</b>	<1	<1	<1	NS	<1	<1	NS	NS

**R22:** recuentos a 22 °C; **R36:** recuentos a 36 °C; **CL:** Coliformes; **EC:** *E.coli*; **ETC:** *Enterococcus*; **CP:** *Clostridium perfringens*.

C: baño control; O<sub>3</sub>: baño agua ozonizada.

a, b: Efecto de la inmersión de filetes de dorada en la calidad microbiológica del agua.

x, y: Efecto de la concentración de ozono para los tiempos 20 y 40 minutos.

Sig. Significancia; NS. No significancia; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

#### **I.3.4. Efecto del tiempo en la calidad microbiológica de los filetes de doradas inmersos**

La **Tabla 10** muestra los valores medios de los recuentos microbiológicos ( $\log \text{ufc g}^{-1}$ ) en filetes de dorada antes y después de la inmersión durante los tiempos de exposición, 20 y 40 minutos.

Inicialmente, los recuentos obtenidos en los filetes (AM, EN y PSE) reflejaron una contaminación bacteriana como resultado del proceso de eviscerado y manipulación de los pescados. Los microorganismos estudiados, CL y SA, mostraron recuentos por debajo de los niveles de detección ( $< 1 \log \text{ufc g}^{-1}$ ).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) antes y después de la inmersión en la calidad microbiológica de los filetes durante el tiempo experimentado. Los resultados obtenidos antes y después mostraron que la inmersión durante 20 y 40 minutos, no mejoró la calidad microbiológica. Los autores Manousaridis y col. (2005) observaron una reducción en aerobios mesófilos de  $0,7 \log \text{ufc g}^{-1}$  en mejillones sin concha inmersos durante un tiempo prolongado (60 y 90 minutos) en agua ozonizada ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) y una reducción de  $0,5-1,1 \log \text{ufc g}^{-1}$  después de 90 minutos en *Pseudomonas* spp. Nerantzaki y col. (2005) también observaron una reducción de  $1-1,2 \text{ ufc g}^{-1}$  en bacterias aerobias mesófilas en filetes de trucha arco iris sumergidos durante 60 y 90 minutos en agua con ozono.

Los autores Chawla y col. (2007) observaron una reducción en los niveles microbianos de camarón pelado, al aplicar en el agua de lavado, altas concentraciones de ozono (2 y 3 ppm) y durante un largo tiempo de exposición. Por otro lado, Fukunaga y col. (1991) observaron un efecto pro-oxidante en las branquias de la especie de pescado “japanese charr” durante 30 minutos en agua con ozono ( $0,7 \text{ mg l}^{-1}$ ). Por tanto, y de acuerdo con Da Silva y col. (1998), el efecto bactericida fue mostrado dependiendo de la concentración de ozono usada, así como los diferentes periodos de contacto y las diferentes metodologías usadas.

Sin embargo, otros análisis deberán llevarse a cabo en profundidad tanto a nivel físico-químico como sensorial para observar posibles cambios debido a la exposición prolongada de los productos.

**Tabla 10.** Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$  SD) de los recuentos microbiológicos ( $\log$  ufc  $g^{-1}$ ) en filetes de dorada antes y después de la inmersión en baños con  $[O_3 \text{ ppm}] = 0,30 \text{ mg l}^{-1}$  durante 20 y 40 minutos.

Microorganismos	Antes	Después inmersión		Sig.	Después inmersión		Sig.	Significancia
		(t= 20')			(t= 40')			
		C	O <sub>3</sub>		C	O <sub>3</sub>		
AM	3,12 $\pm$ 0,98	3,06 $\pm$ 0,71	3,26 $\pm$ 0,63	NS	2,33 $\pm$ 1,17	2,21 $\pm$ 1,03	NS	NS
EN	1,77 $\pm$ 0,71	1,33 $\pm$ 0,84	1,85 $\pm$ 0,73	NS	1,27 $\pm$ 0,32	1,16 $\pm$ 0,28	NS	NS
PSE	2,38 $\pm$ 1,51	3,52 $\pm$ 1,27	3,13 $\pm$ 1,73	NS	1,90 $\pm$ 1,40	3,07 $\pm$ 1,13	NS	NS
CL	<1	<1	1,39 $\pm$ 0,82	NS	<1	<1	NS	NS
SA	<1	<1	<1	NS	<1	<1	NS	NS

AM: aerobios mesófilos; EN: *Enterobacteriaceae*; PSE: *Pseudomonas* spp.; CL: Coliformes; SA: *Staphylococcus aureus*.

C: baño control; O<sub>3</sub>: baño agua ozonizada.

a, b: Efecto de la inmersión de los filetes de dorada.

x, y: Efecto de la concentración de ozono para un determinado tiempo.

NS. No significancia.

### **I.3.5. Efecto del tiempo de inmersión de los filetes mediante Análisis de Perfil de Textura**

Inicialmente, los valores medios obtenidos en los filetes frescos de dorada antes de la inmersión resultaron de: 34,07 N, 12,02 N, -0,42 N.s, 0,35, 57,96 N.mm y 4,84 mm, para los parámetros D, G, AD, C, MA y E, respectivamente (**Tabla 11**). Estos valores en los filetes frescos de dorada, coinciden con los obtenidos por Peso-Echarri y col. (2012). Un efecto de la inmersión, estadísticamente significativo, fue observado en los parámetros de dureza ( $P < 0,001$ ) y gomosidad ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos y tiempo de exposición al ozono. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) para los restantes parámetros estudiados (AD, C, MA y E).

Los filetes de dorada sumergidos en agua sin ozono durante 40 minutos, experimentaron un ablandamiento (27,79 N) comparado con los filetes que no habían sido sumergidos (34,07 N) ( $P < 0,001$ ). Sin embargo, la inmersión en agua ozonizada para el mismo tiempo no causó ningún cambio en los parámetros de textura. Contrariamente, Feng y col. (2012) observaron un incremento en los valores de dureza en dorada entera inmersa en ozono ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) durante 9 minutos con una temperatura del agua de  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Sería aconsejable en futuros estudios aumentar el muestreo en el análisis de textura, debido a la gran variabilidad que existe y la heterogeneidad de las muestras.

**Tabla 11.** Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$  SD) para los diferentes parámetros de Análisis de Perfil de Textura (TPA) en filetes de dorada analizadas antes y después de la inmersión durante 20 y 40 minutos.

parámetros TPA	Antes	Después inmersión (t= 20')			Después inmersión (t= 40')			Sig. Antes después
		C	O <sub>3</sub>	Sig.	C	O <sub>3</sub>	Sig.	
<b>D</b>	34,07 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup>	33,55 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup>	33,20 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	NS	27,79 $\pm$ 2,76 <sup>b,x</sup>	37,22 $\pm$ 4,09 <sup>a,y</sup>	*	***
<b>G</b>	12,02 $\pm$ 1,26 <sup>ab</sup>	11,70 $\pm$ 1,47 <sup>ab</sup>	11,95 $\pm$ 1,00 <sup>ab</sup>	NS	10,02 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	12,72 $\pm$ 1,94 <sup>a</sup>	NS	*
<b>AD</b>	-0,42 $\pm$ 0,32	-0,48 $\pm$ 0,35	-0,47 $\pm$ 0,23	NS	-0,56 $\pm$ 0,26	-0,51 $\pm$ 0,48	NS	NS
<b>C</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,03	NS	0,36 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,04	NS	NS
<b>MA</b>	57,96 $\pm$ 14,91	54,87 $\pm$ 9,87	57,39 $\pm$ 5,40	NS	53,27 $\pm$ 10,96	62,70 $\pm$ 21,48	NS	NS
<b>E</b>	4,84 $\pm$ 1,24	4,78 $\pm$ 1,27	4,85 $\pm$ 0,80	NS	5,32 $\pm$ 1,11	4,90 $\pm$ 1,34	NS	NS

**D:** Dureza (N); **G:** Gomosidad (N); **AD:** Adhesividad (N.s); **C:** Cohesividad; **MA:** Masticabilidad (N.mm); **E:** Elasticidad (mm).

**C:** baño control; **O<sub>3</sub>:** baño agua ozonizada

**a, b:** Efecto de la inmersión de los filetes de dorada en la calidad de la textura.

**x, y:** Efecto de la concentración de ozono para un tiempo particular en la textura.

**Sig.** Significancia; **NS.** No significancia; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.



## **CAPITULO II. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL DE FILETES DE DORADA (*Sparus aurata*) ENVASADOS EN ATMÓSFERA MODIFICADA Y VACÍO ALMACENADOS EN REFRIGERACIÓN.**

### **II.1. OBJETIVO**

El objetivo del presente capítulo fue determinar el efecto del envasado a vacío y en atmósfera modificada sobre la calidad microbiológica, físico-química (pH, CRA, TBARs, NBVT, TMA y color) y sensorial de filetes de dorada almacenadas a  $3 \pm 1$  °C durante 14 días en vitrina expositora.

### **II.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

Las doradas procedían de la empresa Culmárex S.A (Águilas, Murcia). Transcurridas cinco horas postmortem, los peces fueron fileteados, envasados en cajas de poliestireno con hielo y transportados a la Planta Piloto del Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia para su posterior estudio.

Los filetes de dorada utilizados como control fueron envasados en condiciones de aerobiosis en bandejas transparentes (C) (Reynolds Food Packaging, Barcelona) cubiertas con film permeable al oxígeno ( $650 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  en 23 h) en envasadora R-RE (Industrias Raelma, S.L., Madrid). Los filetes a vacío (V) fueron colocados en bolsas BB3050 (Cryovac) (ratio transmisión oxígeno  $0,83 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  en 24 h) y envasados en envasadora discontinua INELVI VISC 500 (Industrial Eléctrica Vilar, Barcelona, España), eliminando el oxígeno del envase. Los filetes envasados en atmósfera modificada (AM) fueron colocados en bandejas transparentes de plástico y estas a su vez introducidas en bolsas BB3050 (Cryovac), en las cuales se inyectó la mezcla de gases (40% CO<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub>, 30% O<sub>2</sub>) (EAP20 Carburos Metálicos, Barcelona, España).

Las muestras fueron almacenadas en condiciones de refrigeración ( $3 \pm 1$  °C) en cabina expositora (Helkama, Finland) con luz fluorescente (620 lux) reproduciendo las condiciones de comercialización. La composición de los gases en el interior de los

envases fue medida mediante un medidor de gases (Witt Gasetechnik, Witten, Germany) en el día inicial del ensayo.

Se realizaron análisis microbiológicos, físico-químicos y sensoriales de todas las muestras en los días de control establecidos 0, 4, 7, 11 y 14. Por cada día de control y tipo de envasado, se tomaron cuatro peces. De cada pez se obtuvieron dos filetes. El filete derecho fue destinado para el análisis sensorial (QDA) y físico-químico (proteínas, humedad, grasa, cenizas, pH, CRA, TBARs, NBVT, TMA y color), mientras que el filete izquierdo fue destinado para el análisis microbiológico (Aerobios mesófilos, Psicrótrofos, *Pseudomonas* spp, Bacterias ácido lácticas, coliformes/ *E.coli*, bacterias anaerobias y *Enterobacteriaceae*). El procedimiento utilizado así como los materiales empleados en cada caso se describe en las diferentes secciones de Material y Métodos.

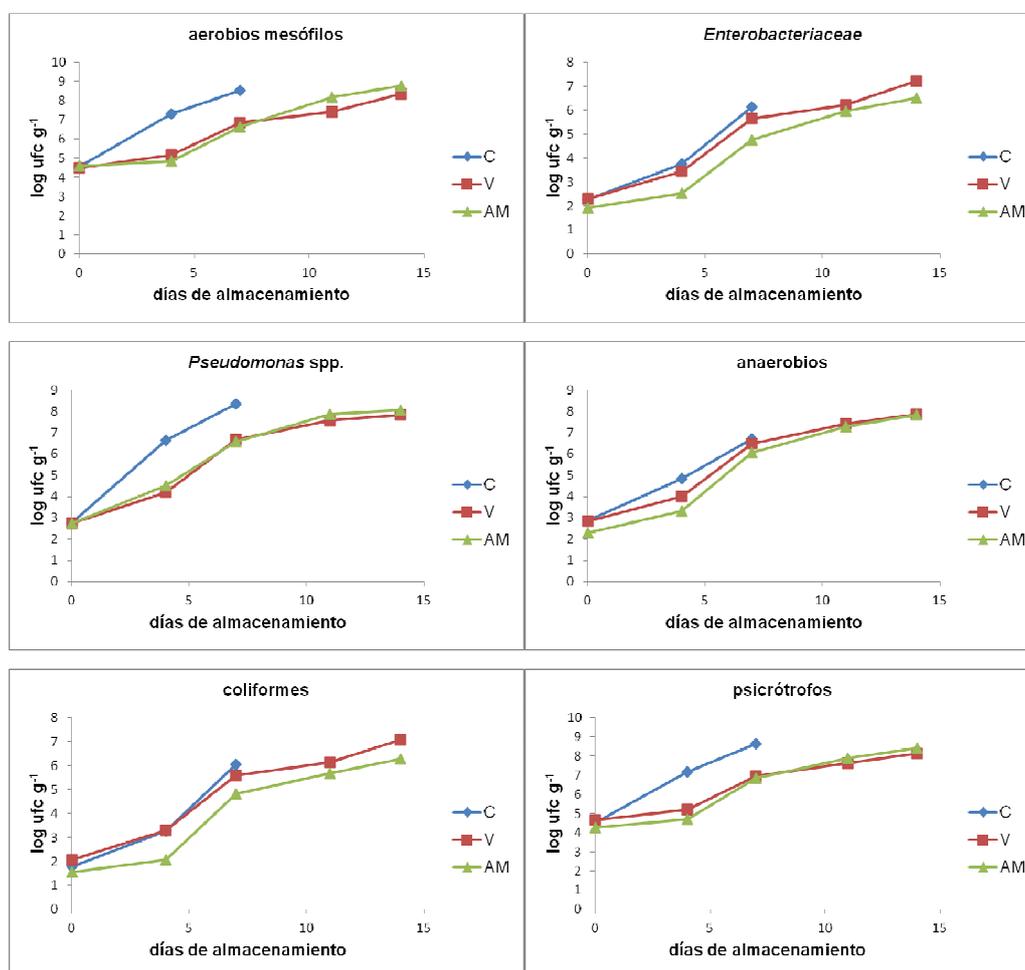
ANOVA fue utilizado para determinar el efecto del tipo de envasado y tiempo de almacenamiento sobre la calidad de los filetes de dorada. En orden a detectar diferencias significativas entre grupos, los valores fueron comparados utilizando “Tukey test”. Las diferencias fueron consideradas significativas a nivel  $P < 0,05$  (Sección 3.6 Material y Métodos).

## II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### II.3.1. Análisis microbiológico

La evolución de los recuentos para los distintos microorganismos durante el periodo de almacenamiento se muestra en la **Figura 17**. Los microorganismos aerobios mesófilos y psicrótrofos mostraron una evolución similar durante los 14 días de almacenamiento. Los valores iniciales de ambos microorganismos fueron más elevados que los citados por algunos autores (Cakli y col., 2007; Hernández y col., 2009; Kostaki y col., 2009) pero similares a los mencionados por Chouliara y col. (2004) y Provincial y col. (2010), quienes mostraron recuentos iniciales de aerobios mesófilos de  $4 \log \text{ufc g}^{-1}$ .

Los resultados mostraron un efecto estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ ) del tiempo de almacenamiento en todos los envasados estudiados. Los recuentos de aerobios mesófilos en muestras C en el día 4 de almacenamiento excedieron de  $7 \log \text{ufc g}^{-1}$ , límite establecido en ICMSF (2002), mientras que las muestras a vacío (V) y en atmósfera modificada (AM) no alcanzaron este límite hasta el día 11. Por lo tanto, ambos tipos de envasado utilizados, fueron capaces de retrasar el crecimiento microbiano de los filetes de dorada. Masniyom y col. (2005) también encontraron bajos valores de aerobios mesófilos en filetes de dorada almacenados en atmósfera modificada. Sin embargo, Kenar y col. (2010) obtuvieron una vida útil de 5 días para filetes de sardina envasadas a vacío.



**Figura 17.** Evolución en los recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp, Anaerobios, Coliformes y Psicrótrofos de dorada durante el almacenamiento a 3 °C envasado en aerobiosis (C), vacío (V) y atmósfera modificada (AM).

Aunque las muestras alcanzaron los límites microbiológicos máximos permitidos según ICMSF (2002) en los días 4 (C) y 11 (V y AM), se decidió mantener el pescado hasta el último día de almacenamiento debido a la apariencia aceptable de los filetes, con el objetivo de profundizar en el efecto del tipo de envasado en los parámetros físico-químicos y sensoriales.

Diferencias estadísticamente significativas fueron detectadas en los tres envasados en los días 4 ( $P < 0,001$ ) y 7 ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, las diferencias entre V y AM no resultaron significativas en los días 11 y 14, aunque los recuentos fueron más bajos en las muestras V. Sivertsvik y col. (2002) también encontraron que el envasado a vacío inhibe el crecimiento de aerobios mesófilos en filetes de salmón.

El retraso en el crecimiento de diferentes microorganismos en el envasado AM se asocia a niveles de  $\text{CO}_2$ . Torrieri y col. (2006) observaron un retraso en el crecimiento de aerobios mesófilos en muestras de lubina envasadas en atmósfera modificada con una alta concentración de  $\text{CO}_2$  (50-70 %). Sivertsvik y col. (2002) sugirieron que el efecto bacteriostático del  $\text{CO}_2$  está directamente relacionado con la rotura de las membranas celulares y los cambios físico-químicos en las propiedades de las proteínas. Giménez y col. (2004) también justificaron los bajos valores en los recuentos microbiológicos de filetes de dorada envasadas en atmósfera modificada debido al efecto inhibitorio del  $\text{CO}_2$ , un efecto que está directamente relacionado con la proporción del gas.

Los recuentos iniciales obtenidos para *Enterobacteriaceae* en los filetes de dorada fueron 2,27, 2,31 y 1,93 log ufc  $\text{g}^{-1}$  para las muestras C, V y AM respectivamente. Estos resultados coinciden con Taliadourou y col. (2003) quienes encontraron valores de 2 log ufc  $\text{g}^{-1}$  para muestras de lubina entera y fileteada. Estos valores fueron incrementándose gradualmente con el tiempo de almacenamiento ( $P < 0,001$ ). Sin embargo, el crecimiento de *Enterobacteriaceae* fue inhibido en las muestras AM y V comparado con las muestras C.

En todo momento, las muestras AM mostraron los menores recuentos, pero después de 7 días las diferencias entre V y AM no resultaron estadísticamente

significativas. Los valores iniciales fueron similares a los encontrados en los filetes de lubina envasados en AM por Kostaki y col. (2009).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) indicó que los recuentos de bacterias psicrótrofas, como *Pseudomonas*, son usualmente menores en pescado almacenado en atmósferas de CO<sub>2</sub> que en pescado almacenado en aerobiosis. El presente estudio confirma esta afirmación, así las muestras almacenadas bajo condiciones de vacío y atmósfera modificada mostraron recuentos de psicrótrofos y *Pseudomonas* spp en el día 14, similares a los obtenidos en las muestras control en el día 7 de almacenamiento. Esto significa que ambos tipos de envasado inhiben el crecimiento microbiano, ya sea a través de la ausencia de oxígeno o a la disminución parcial de O<sub>2</sub> y/o la presencia de CO<sub>2</sub>. Resultados similares fueron obtenidos por Chouliara y col. (2004) quienes encontraron altos recuentos de *Pseudomonas* spp en filetes de dorada envasadas en aerobiosis.

Los recuentos iniciales de bacterias anaeróbicas en los diferentes tipos de envasado mostraron un valor medio de 2-3 log ufc g<sup>-1</sup>, recuentos que posteriormente se incrementaron hasta alcanzar valores de 6-7 log ufc g<sup>-1</sup> en muestras C (día 7) y 8 log ufc g<sup>-1</sup> en muestras V y AM (día 14). La escasez de estudios que evalúen el crecimiento de microorganismos anaerobios en pescado refrigerado ha imposibilitado la comparación de los resultados obtenidos. Sólo en determinados estudios se ha evaluado el crecimiento de microorganismos aerobios facultativos, como *Shewanella putrefaciens*, en filetes de corvina (Hernández y col., 2009).

Contrariamente a lo esperado, se detectaron microorganismos anaerobios en muestras control. Este crecimiento puede corresponderse con ciertas bacterias causantes del deterioro en el pescado como pueden ser *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreum* (Huss, 1999).

Los recuentos iniciales de bacterias coliformes fueron bajos y se incrementaron significativamente en el día 7 de almacenamiento. Estos resultados coinciden con los de Kenar y col. (2010) donde los valores de coliformes totales se incrementaron en filetes de sardina refrigeradas envasadas a vacío. En todas las muestras (C, V y AM) y días de almacenamiento, los valores de *Escherichia coli* resultaron < 1 log ufc g<sup>-1</sup> (datos no

mostrados), cumpliendo por tanto con los criterios establecidos por la Comisión Reguladora (EC) N° 1441/2007 en el pescado, que establece un mínimo de 1 log ufc g<sup>-1</sup> y un máximo de 10 log ufc g<sup>-1</sup>.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) mostraron un valor inicial por debajo del límite de sensibilidad del método (<1 log ufc g<sup>-1</sup>) en los tres tipos de envasado estudiados. Este valor se mantuvo constante en muestras C durante el periodo de almacenamiento pero tuvo un incremento significativo en las muestras V y AM en los días 11 y 14. Kostaki y col. (2009) también obtuvieron recuentos iniciales de bacterias lácticas en filetes de lubina, aunque otros autores (Kykkidou y col., 2009) encontraron altos recuentos de bacterias lácticas en especies de pescado refrigeradas.

El uso del envasado en atmósfera modificada no siempre inhibe el crecimiento de bacterias ácido lácticas, depende de la composición exacta de la atmósfera utilizada. Sin embargo, la composición del envasado en atmósfera modificada (60% CO<sub>2</sub> /30% N<sub>2</sub>/ 10% O<sub>2</sub>), retrasa el crecimiento de bacterias lácticas durante el tiempo de almacenamiento, manteniendo bajos niveles (2 log ufc g<sup>-1</sup>) (Kostaki y col., 2009).

La refrigeración es una de las estrategias más importantes para retrasar el crecimiento bacteriano en el pescado fresco, y si el envasado a vacío y AM es combinado con temperaturas bajas, la vida útil del producto puede ser extendida (Randell y col., 1999). Basado en nuestros resultados, ambos envasados V y AM influyeron en los recuentos microbiológicos, retrasando el crecimiento bacteriano, e incrementando la estabilidad microbiológica y la vida útil del pescado fresco.

### II.3.2. Análisis físico-químico

La composición proximal de la carne de dorada en el día inicial 0, se muestra en la **Tabla 12**. El contenido en grasa de la dorada de acuicultura resultó más baja con respecto a los contenidos en grasa obtenidos por otros autores, sin embargo el resultado coincide con el de Huidobro y col. (2001) (3 %) y Senso y col. (2007) (2,5-3,4 %). Los resultados de proteínas, humedad y cenizas obtenidas son similares a los obtenidos por Goulas y Kontominas (2007).

**Tabla 12.** Composición proximal (%) del músculo de dorada.

<b>Composición proximal</b>	<b>Valor medio (%)</b>
Proteínas	21.20 ± 0.41
Grasa	3.06 ± 0.06
Humedad	76.30 ± 0.06
Cenizas	1.26 ± 0.01

El valor inicial de pH en filetes de dorada fresco en el día 0 estuvo comprendido entre 6,23-6,26 (**Tabla 13**), similar al obtenido por Goulas y Kontominas (2007). El pH se incrementó ( $P < 0,001$ ) con el tiempo de almacenamiento en los tres tipos de envasado, especialmente en las muestras C. En nuestro estudio, el pH aumentó en el día 7 de almacenamiento. Masniyom y col. (2005) encontraron que el pH en lubina almacenada bajo condiciones de aerobiosis se incrementó hasta 7,1 después de 9 días de almacenamiento, un incremento que los autores atribuyeron a la producción de compuestos básicos resultado del deterioro bacteriano del pescado, posiblemente debido a la formación de compuestos nitrogenados de carácter básico como consecuencia del deterioro.

En el día 7 de almacenamiento se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre los tres tipos de envasados. El menor valor de pH fue observado en muestras V seguido por muestras AM y C. También se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) entre las muestras V y AM en el día 14. Como se puede observar, la ausencia de oxígeno retrasó la proliferación de microorganismos productores de compuestos básicos, como son el amonio y otras aminas biógenas, retrasando así el deterioro.

Respecto a la capacidad de retención de agua (CRA) (**Tabla 13**), se mostraron diferencias estadísticamente significativas para muestras C ( $P < 0,001$ ) y para muestras V y AM ( $P < 0,05$ ) debido al tiempo de almacenamiento en los tres tipos de envasado, aunque los cambios producidos en las muestras V y AM resultaron leves. Hernández y col. (2009) no obtuvieron diferencias significativas en CRA en muestras de corvina durante el almacenamiento en refrigeración. Es notable la diferencia en las muestras C ( $P < 0,001$ ) en comparación con V y AM en el día 7 de almacenamiento.

Provincial y col. (2010) observaron que muestras de lubina envueltas en film, presentaron una mayor pérdida por goteo que muestras envasadas en atmósfera modificada. Estos resultados indicaron una baja capacidad de retención de agua en las muestras envueltas, en comparación con las muestras envasadas en atmósfera modificada. Álvarez y col. (2012) también encontraron un efecto del almacenamiento en los valores de capacidad de retención de agua en filetes de dorada envasados en aerobiosis. Este hecho probablemente esté relacionado con el estado de deterioro del pescado el cual dio lugar a un incremento en la pérdida de agua de los filetes. Estos autores afirmaron que la habilidad de los filetes de retener agua es considerada un parámetro básico de calidad, por tanto un valor bajo de porcentaje en CRA, indica una pérdida de calidad en el filetes.

**Tabla 13.** Valores medios y desviación estándar ( $\pm$  SD) para el pH, capacidad de retención de agua (CRA), sustancias reactivas con el ácido Tiobarbitúrico (TBARs), Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) y N-Trimetilamina (N-TMA) en filetes de dorada frescos envasadas en aerobiosis (C), vacío (V) y atmósfera modificada (AM) y almacenadas a 3 °C.

Parámetro	Envasado	Días de almacenamiento					Significancia
		0	4	7	11	14	
pH	C	6,23 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup>	6,57 $\pm$ 1,19 <sup>w</sup>	6,83 $\pm$ 0,18 <sup>av</sup>	ne	ne	***
	V	6,26 $\pm$ 0,03 <sup>w</sup>	6,47 $\pm$ 0,15 <sup>vw</sup>	6,49 $\pm$ 0,24 <sup>bv</sup>	6,45 $\pm$ 0,17 <sup>vw</sup>	6,32 $\pm$ 0,15 <sup>vw</sup>	*
	AM	6,26 $\pm$ 0,05 <sup>w</sup>	6,69 $\pm$ 0,18 <sup>v</sup>	6,60 $\pm$ 0,11 <sup>abv</sup>	6,63 $\pm$ 0,19 <sup>v</sup>	6,68 $\pm$ 0,19 <sup>v</sup>	***
	Significancia	NS	NS	***	NS	**	
CRA	C	80,21 $\pm$ 2,98 <sup>v</sup>	78,45 $\pm$ 5,16 <sup>v</sup>	23,50 $\pm$ 9,06 <sup>bw</sup>	ne	ne	***
	V	76,32 $\pm$ 4,04 <sup>w</sup>	7,38 $\pm$ 2,42 <sup>vw</sup>	80,99 $\pm$ 7,21 <sup>avw</sup>	82,37 $\pm$ 3,71 <sup>v</sup>	77,72 $\pm$ 1,85 <sup>vw</sup>	*
	AM	75,83 $\pm$ 4,79 <sup>vw</sup>	77,79 $\pm$ 2,64 <sup>vw</sup>	72,91 $\pm$ 5,58 <sup>aw</sup>	81,58 $\pm$ 1,20 <sup>v</sup>	78,53 $\pm$ 5,12 <sup>vw</sup>	*
	Significancia	NS	NS	***	NS	NS	
TBARs (mg MDA kg <sup>-1</sup> )	C	0,02 $\pm$ 0,06 <sup>bw</sup>	0,24 $\pm$ 0,11 <sup>bw</sup>	0,42 $\pm$ 0,29 <sup>bv</sup>	ne	ne	***
	V	0,10 $\pm$ 0,05 <sup>aw</sup>	0,09 $\pm$ 0,10 <sup>bw</sup>	0,23 $\pm$ 0,35 <sup>bw</sup>	0,52 $\pm$ 0,23 <sup>v</sup>	0,31 $\pm$ 0,09 <sup>vw</sup>	***
	AM	0,03 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	1,04 $\pm$ 0,42 <sup>axy</sup>	3,38 $\pm$ 1,28 <sup>awx</sup>	5,67 $\pm$ 0,73 <sup>xvw</sup>	6,17 $\pm$ 3,49 <sup>v</sup>	***
	Significancia	*	***	***	***	***	
NBVT (mg N 100 g <sup>-1</sup> )	C	15,80 $\pm$ 1,62 <sup>bw</sup>	19,38 $\pm$ 1,30 <sup>w</sup>	49,87 $\pm$ 6,61 <sup>av</sup>	ne	ne	***
	V	19,38 $\pm$ 2,26 <sup>ax</sup>	18,66 $\pm$ 1,84 <sup>x</sup>	20,73 $\pm$ 1,41 <sup>bx</sup>	31,86 $\pm$ 3,16 <sup>w</sup>	37,09 $\pm$ 2,71 <sup>v</sup>	***
	AM	17,79 $\pm$ 1,75 <sup>bx</sup>	18,37 $\pm$ 1,27 <sup>x</sup>	21,20 $\pm$ 1,38 <sup>bw</sup>	22,66 $\pm$ 1,25 <sup>w</sup>	27,91 $\pm$ 2,17 <sup>v</sup>	***
	Significancia	*	NS	***	***	***	
N-TMA (mg N 100 g <sup>-1</sup> )	C	2,19 $\pm$ 0,91 <sup>w</sup>	4,07 $\pm$ 2,35 <sup>abvw</sup>	6,11 $\pm$ 3,37 <sup>av</sup>	ne	ne	**
	V	2,67 $\pm$ 0,49 <sup>x</sup>	2,18 $\pm$ 0,55 <sup>bx</sup>	2,27 $\pm$ 0,49 <sup>bx</sup>	4,38 $\pm$ 1,44 <sup>w</sup>	6,62 $\pm$ 1,31 <sup>v</sup>	***
	AM	2,73 $\pm$ 0,81 <sup>x</sup>	5,70 $\pm$ 1,14 <sup>aw</sup>	3,22 $\pm$ 0,91 <sup>bx</sup>	5,72 $\pm$ 0,26 <sup>w</sup>	7,46 $\pm$ 1,90 <sup>v</sup>	***
	Significancia	NS	***	**	*	NS	

**a,b:** Diferentes letras dentro de la misma columna (diferente envasado); **v,w,x,y:** Diferentes letras dentro de la misma fila (diferente periodo de almacenamiento).

**NS.** no significancia; **ne.** no evaluado. \*P < 0,005; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Los valores de oxidación de lípidos (TBARs) en los filetes de dorada almacenados en diferentes condiciones de envasado se muestran en la **Tabla 13**. Los valores obtenidos en el día 0 (C, V, AM) coinciden con los mencionados por otros autores (Masniyom y col., 2002; Masniyom y col., 2005; Goulas y Kontominas, 2007; Hernández y col., 2009; Provincial y col., 2010; Álvarez y col., 2012) en diferentes especies de pescado y condiciones de almacenamiento. Por el contrario, Taliadourou y col. (2003) obtuvieron altos valores de malondialdehído (MDA) en el día 1 en el estudio en filetes de lubina almacenada en hielo.

Los valores de TBARs se incrementaron en todas las muestras, conforme aumentó el tiempo de almacenamiento ( $P < 0,001$ ). Este incremento en la oxidación lipídica, ha sido observado por un largo número de autores (Masniyom y col., 2002; Taliadourou y col., 2003; Chouliara y col., 2004; Masniyom y col., 2005; Hernández y col., 2009). Sin embargo, en filetes de dorada C y V, los valores de TBARs fueron más bajos que los obtenidos en las muestras AM. Los bajos valores de TBARs encontrados en la bibliografía (Giménez y col., 2004) en muestras envasadas en atmósfera modificada, están atribuidos a la ausencia de  $O_2$  en la atmósfera utilizada en el pescado y la adición de antioxidantes.

Koral y Köse (2012) afirmaron en un estudio llevado a cabo con bonito del Atlántico (*Sarda sarda*) entero y fileteado, que el proceso del fileteado parece incrementar la oxidación lipídica. Giménez y col. (2004) concluyeron que la exposición a la luz del pescado durante su almacenamiento en vitrinas expositoras, influye de manera decisiva en la vida útil de los filetes de dorada envasado en atmósfera modificada.

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en los valores de TBARs entre las muestras AM y las muestras V y C siendo más bajos los valores de TBARs en estas últimas. De acuerdo con Castro y col. (2006) estos valores de TBARs observados en C podrían explicarse por el alto recuento de microorganismos obtenidos, especialmente cuando las muestras fueron almacenadas durante más de ocho días, los cuales podrían haber consumido una elevada cantidad de oxígenos en las muestras C (decreciendo la habilidad de oxidación lipídica). Los bajos valores observados en V podrían ser debidos a la ausencia de oxígeno, principal precursor de las reacciones de

oxidación lipídica. Resultados similares fueron reportados en bibliografía (Masniyom y col., 2002; Masniyom y col., 2005) en filetes de lubina (*Later calcarifer*) en atmósfera modificada. En ambos estudios los valores de TBARs resultaron más altos que los recogidos en el presente estudio en muestras envasadas en aerobiosis. Los autores señalan que este hecho se debe probablemente, a que el ácido carbónico formado puede inducir la desnaturalización de las proteínas musculares, lo cual conducen a la liberación de hierro hemo libre, un potencial pro-oxidante en el sistema muscular.

Los cambios observados en los valores de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) en las diferentes muestras envasadas se presentan en la **Tabla 13**. Al principio (día 0), los valores de NBVT fueron similares para todas las muestras estudiadas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por otros autores en dorada fresca en el día 0 (Tejada y Huidobro, 2002; Goulas y Kontominas, 2007). Sin embargo, otros estudios mostraron bajos valores en el día inicial (Kostaki y col., 2009). Niveles comprendidos entre 30-35 mg N/ 100 g pescado son generalmente considerados como límite de aceptabilidad en filetes de pescado (Conell, 1995). Se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) de NBVT entre los tres tipos de envasado durante el tiempo de almacenamiento. Los valores de NBVT se incrementaron en todas las muestras, los cuales están en concordancia con los resultados microbiológicos obtenidos. En el caso del envasado en AM, las muestras mostraron el menor valor debido a las propiedades antibacterianas del CO<sub>2</sub> (Goulas y Kontominas, 2007). En contra, las muestras C mostraron los mayores valores de NBVT (49,87 mg N/100 g) en el día 7 de estudio, excediendo el límite establecido, lo cual podría explicar el estado de deterioro de las muestras C. Masniyom y col. (2005) encontraron que el contenido en NBVT en filetes de lubina estuvo estrechamente relacionado con un incremento del pH, especialmente en las muestras almacenadas en aerobiosis. La misma tendencia fue observada en este estudio.

Se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre las muestras C y los otros dos tipos de envasado en la formación de NBVT en el día 7. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Masniyom y col. (2002) y Masniyom y col. (2005), quienes observaron altos valores de NBVT en muestras almacenadas en aerobiosis y bajos para las muestras envasadas en condiciones de V y AM.

Algunos autores señalaron diferentes causas para los bajos valores de NBVT obtenidos en muestras envasadas en atmósfera modificada comparados con muestras control. La primera causa posible podría ser el pequeño número de bacterias y su habilidad para actuar en la desaminación oxidativa de compuestos nitrogenados no proteicos (Banks y col., 1980). Otra posible explicación propuesta por los autores Soccol y col. (2005) es que las condiciones anaeróbicas en ambos envasados (V y AM) podrían inhibir la desaminación oxidativa debido a la baja cantidad de oxígeno.

El envasado AM produjo los mejores resultados al final del almacenamiento (día 14). Está claro que el envasado en atmósfera modificada reduce la producción de compuestos volátiles que conducen al deterioro de la dorada. Goulas y Kontominas (2007) afirmaron que el envasado en atmósfera modificada tuvo un efecto conservante que redujo significativamente los valores de NBVT en los filetes de dorada. Este efecto puede ser atribuido principalmente al CO<sub>2</sub>, debido a sus propiedades bactericidas.

Los valores iniciales de N-Trimetilamina (N-TMA) en el estudio (**Tabla 13**) estuvieron en un rango comprendido entre 2,19 mg N/ 100 g and 2,73 mg N/100 g, valores que están por encima de los mencionados por otros autores (Taliadourou y col., 2003; Chouliara y col., 2004; Goulas y Kontominas, 2007; Mendes y Gonçalves, 2008;) pero similares a otros estudios (Masniyom y col., 2002; Masniyom y col., 2005).

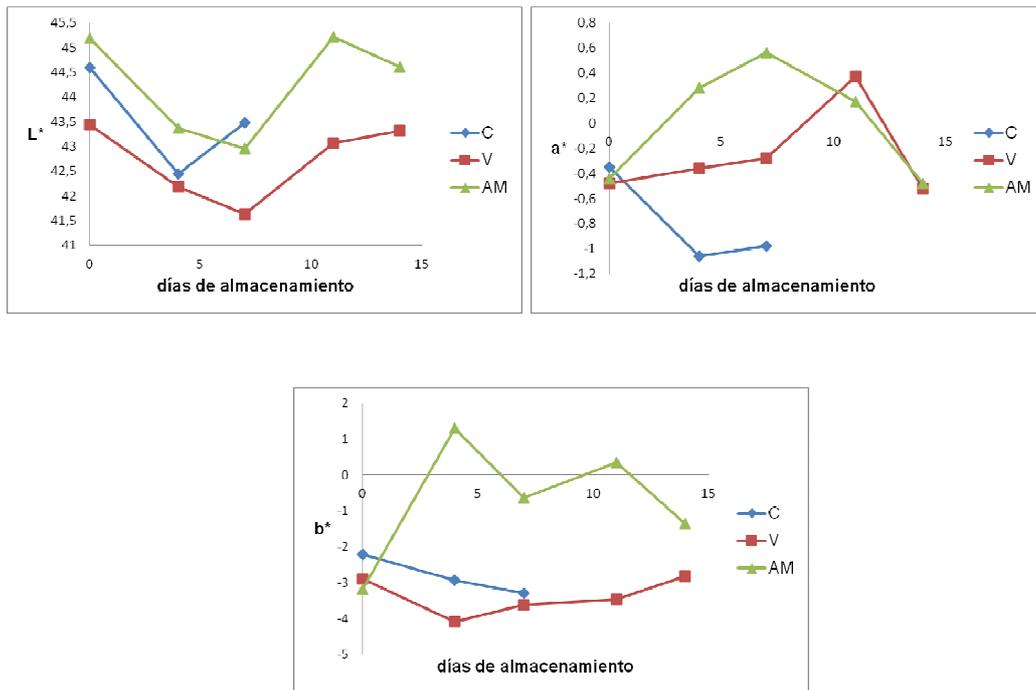
El tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo en los valores de TMA en muestras C ( $P < 0,01$ ) y muestras V y AM ( $P < 0,001$ ). Los valores obtenidos en las muestras C al final del tiempo de almacenamiento (día 7) fue el mismo que el obtenido en las muestras V y AM en el día 14 (en el último día de almacenamiento). Los envasados V y AM, retrasaron claramente el deterioro en los filetes de dorada almacenadas en refrigeración en vitrina expositora, manteniendo su calidad durante más tiempo y proporcionando diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ) respecto a las muestras C. De acuerdo con estos resultados, algunos autores (Pantazi y col., 2008) encontraron altos valores de TMA en muestras de filetes de pez espada almacenados en aerobiosis, seguido de muestras envasadas en atmósfera modificada (utilizando la misma mezcla de gases que en el presente trabajo), mientras que bajos valores corresponden a las muestras almacenadas a vacío.

Según la bibliografía revisada, algunos autores, indican que la reducción de O-TMA a TMA es una reducción típica de ciertas bacterias (*Aeromonas* spp., psychotolerant enterobacteria, *S. putrefaciens* and *Vibrio* spp.) que están presentes en el pescado deteriorado (Hernández y col., 2009). Diferentes niveles de TMA fueron clasificados. El valor de 5 mg N/100 g fue adoptado como límite de aceptabilidad para filetes de lubina en hielo (Masniyom y col., 2002) mientras que otros estudios utilizaron valores de 8 mg N/100 g como el principio de deterioro de la lubina refrigerada (Cakli y col., 2007). En el presente ensayo se alcanzaron valores de 5 mg N/ 100 g en filetes almacenados en AM en el día 11 (5,72 mg N/100 g) y en muestras envasadas a vacío en el día 14 (6,61 mg N/100 g). Estos valores se relacionaron con el análisis sensorial, debido a que los panelistas reconocieron en las muestras del último día, olores característicos a “pescado deteriorado”.

Respecto a la medida del color en los filetes de dorada envasados (C, AM, V), no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) durante todo el almacenamiento, en lo que respecta a los valores de  $L^*$  (**Figura 18**) entre los tres tipos de envasado en ninguno de los días de almacenamiento. Santaella (2011) no observó diferencias significativas en  $L^*$  en filetes de dorada envasadas a vacío y almacenadas en refrigeración durante 22 días, siendo la media de valores registrados similares a los obtenidos en el presente estudio. Masniyom y col. (2005) observaron un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) en  $L^*$  durante el almacenamiento de filetes de lubina envasadas en atmósfera modificada bajo diferentes mezclas de gases y después del pre-tratamiento con fosfatos. De acuerdo con Masniyom y col. (2005), el mayor valor de  $L^*$  fue observado en muestras almacenadas en condiciones de AM. En contraste, Hernández y col. (2009) observaron un incremento en  $L^*$  en filetes de corvina (*Argyrosomus regius*) en aerobiosis almacenadas en hielo durante 18 días. Aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas entre tratamientos, el menor valor de  $L^*$  correspondió a las muestras C. Provincial y col. (2010) mostraron resultados similares en filetes de lubina envueltas en film. El único efecto observado para el envasado en lo que respecta a  $L^*$  fue en muestras V y AM en el día 11, mostrando las muestras envasadas en AM los valores más altos.

En lo que respecta a la coordenada  $a^*$ , todos los envasados mostraron diferencias significativas a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. Las muestras V y AM mostraron una disminución en los valores de  $a^*$  desde el día 11 de almacenamiento en adelante. En el caso de las muestras C, este descenso ocurrió en el día 4 de estudio. Masniyom y col. (2005) encontraron el mayor ratio de descenso en “a” en muestras almacenadas bajo AM (80% CO<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% N<sub>2</sub>) mientras en el presente estudio ocurrió en las muestras C.

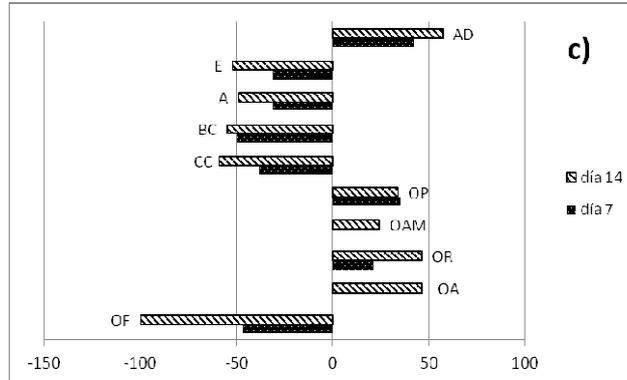
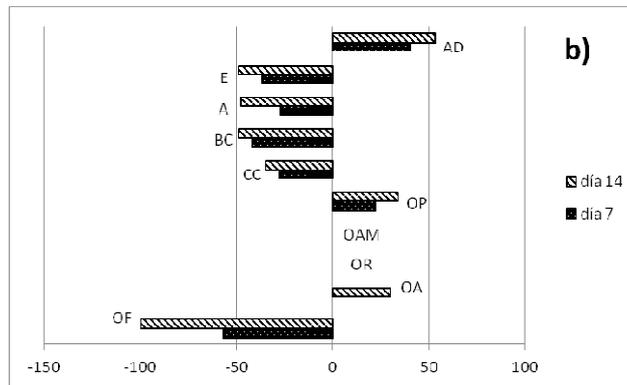
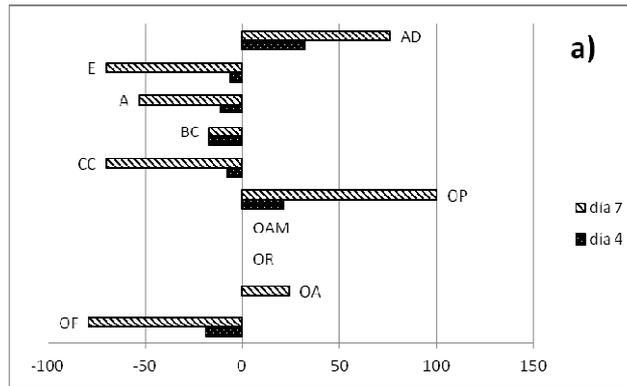
Un efecto estadísticamente significativo se observó en todos los días de almacenamiento (C, V y AM) en la coordenada  $b^*$ . El valor medio estuvo comprendido entre los valores obtenidos por Masniyom y col. (2005) para muestras de lubina en atmósfera modificada y filetes de dorada envasada a vacío. Sin embargo, los valores resultaron más bajos que los reportados por Hernández y col. (2009) en filetes de corvina durante el almacenamiento en hielo. Esta coordenada tiende hacia tonos de color azul-grisáceo, sobre todo en las muestras C y V. Sin embargo, en muestras almacenadas en AM, los valores resultaron positivos, indicando que los valores estuvieron cercanos al amarillo. Resultados que coinciden con los encontrados por Masniyom y col. (2005), quienes recogen altos valores de  $b^*$  en el envasado en AM debido a la formación de color amarillento en la superficie. Khayat y Schawall (1983) atribuyeron tal tendencia a la oxidación de los pigmentos debido al alto contenido en oxígeno.



**Figura 18.** Evolución de los valores de L\*, a\* y b\* en filetes de dorada fresco envasados en diferentes condiciones: aerobiosis, vacío y atmósfera modificada (AM) (40% CO<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub>, 30% O<sub>2</sub>).

### II.3.3. Análisis sensorial

La variación de cada uno de los atributos sensoriales fue estudiado durante el periodo de almacenamiento y comparado con las puntuaciones registradas en el día inicial (0). En términos generales, los atributos positivos decrecieron conforme aumentó el tiempo de almacenamiento y los atributos negativos, se incrementaron (**Figura 19**).



**OF:** Olor pescado fresco; **OA:** Olor ácido; **OR:** Olor rancio; **OAM:** Olor amoníaco; **OP:** Olor pútrido; **CC:** Color carne; **BC:** Brillo; **A:** Apariencia del músculo; **E:** Elasticidad; **AD:** Adherencia.

**Figura 19.** Resultados expresados como porcentajes con respecto a las puntuaciones recibidas en los días 4 y 7 para las muestras control (a), 7 y 14 para los envasados a vacío (b) y en atmósfera modificada (c).

La pérdida de elasticidad (E) y el incremento de la adhesividad (AD) resultaron muy pronunciados en las muestras C respecto a las muestras V y AM al final del almacenamiento. El porcentaje de variación para el atributo E resultó de -70 %, -49 % y -52 % para las muestras C, V y AM respectivamente. Así mismo los porcentajes de variación para el atributo AD resultaron de 76 % (C), 53 % (V) y 57 % (AM). Estas figuras ilustran el efecto significativo del envasado en el deterioro de la textura del pescado en todas las muestras estudiadas.

Los filetes de dorada envasados en V y AM experimentaron una mayor pérdida de BC (brillo del músculo) durante el almacenamiento que las muestras C. En cuanto al atributo A (apariencia del músculo) y CC (color de la carne), las muestras C mostraron una mayor deshidratación (y separación de los miotomos) y una pérdida de color respecto a las muestras V y AM, en los cuales las pérdidas fueron menores después de 14 días (-48 % y -35 % (V); -31 % y -59 % (AM)) que en muestras C en el día 7, confirmando el efecto positivo del envasado en la calidad sensorial de los filetes de pescado. Giménez y col. (2004) también observaron una escasa pérdida de color en filetes de dorada almacenadas en AM.

Respecto al olor, el aumento pronunciado en OP (olor pútrido) en los filetes C resultó destacable (100 % incremento respecto al día 0), mientras que en las muestras envasadas en V y AM el incremento resultó del 53 % y 57 %, respectivamente, en el día 14 de estudio. Santaella (2011) mencionó un marcado aumento en OP en filetes de dorada envasadas a vacío después de 15 días de almacenamiento, las cuales se asoció con un significativo incremento en la concentración de TMA, el cual es responsable del desagradable olor a pescado alterado. El OA (olor ácido) se incrementó con el tiempo de almacenamiento, también: en C y AM este incremento podría ser detectado entre los días 0 y 7. Mientras que en muestras V el incremento resultó destacado entre los días 7 y 14.

El panel no detectó la presencia de OR (olor rancio) en muestras V pero sí en muestras AM, esto puede estar relacionado con los resultados de TBARs obtenidos, los cuales reflejan la oxidación lipídica. Tsironi y Taoukis (2010) afirmaron que el tiempo de rechazo sensorial se correlaciona con los valores de TBARs. Es interesante observar que OR no fue detectado en las muestras C, probablemente debido a que este estaba

enmascarado por el alto OP. Sin embargo la pérdida de OF (olor a pescado fresco) resultó evidente en los tres tipos de envases al final de sus respectivos tiempos de almacenamiento, esto coincide con los resultados obtenidos por Masniyom y col. (2002), los cuales mencionaron un desarrollo de “olor a pescado” en todas sus muestras almacenadas. Como mencionó Özogul y col. (2007), la calidad sensorial de los filetes decreció conforme aumentó el tiempo de almacenamiento, particularmente en las muestras C.





## **CAPITULO III: DESARROLLO DE UN PLATO “LISTO PARA CONSUMIR” CON BASE DE PESCADO MEDIANTE TECNOLOGÍA *SOUS VIDE*: DIVERSIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE ACUICULTURA.**

### **III.1. OBJETIVOS**

Desarrollar un nuevo plato “listo para consumir” con base de dorada (*Sparus aurata*) cocinado mediante tecnología *sous vide*, almacenado en refrigeración, con una calidad sensorial aceptable y larga vida útil.

### **III.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **III.2.1. Ensayos preliminares**

##### **III.2.1.1. Determinación de la temperatura de cocinado**

Previamente a la elaboración del plato preparado *sous vide*, y con el objetivo de establecer la temperatura óptima de cocinado de los filetes de dorada para obtener una textura y sabor óptimos del producto, se realizó un ensayo preliminar. Se probaron tres temperaturas de cocinado: 50, 60 y 70 °C. Para ello, seis doradas fueron compradas en un supermercado y fileteadas. Los doce filetes obtenidos fueron envasados individualmente a vacío en bolsas BB3050 (Cryovac) (ratio transmisión del oxígeno  $0.83 \text{ cm}^{-3} \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  en 24 h). Para cada temperatura de cocinado se utilizaron tres filetes. Los restantes filetes se envasaron sin realizar el vacío, con el fin de conectar una sonda en el filete y así medir continuamente la temperatura en el centro del mismo. Para el cocinado se utilizó un baño termostático a 70 °C. La temperatura inicial del pescado fresco resultó ser de 10 °C.

Todos los filetes de dorada fueron introducidos a la vez en el baño termostático y conforme se alcanzó en el interior del producto las diferentes temperaturas de cocinado (50, 60 y 70 °C), los filetes se sacaron del baño. Para seleccionar la temperatura óptima de cocinado se utilizó un panel de cata entrenado en el análisis sensorial del pescado. Los panelistas probaron las muestras cocinadas evaluando en cada una de ellas los atributos de firmeza, jugosidad y sabor global.

### III.2.1.2. Elección de la salsa

Se prepararon 3 salsas diferentes (mostaza, tomate y verde) como acompañamiento del plato de dorada. La gran mayoría de ingredientes seleccionados para la elaboración de las tres salsas, se escogieron por poseer algún tipo de capacidad antimicrobiana y/o antioxidante.

Los ingredientes y las cantidades que componen cada salsa se muestran en la **Tabla 14**.

**Tabla 14.** Concentración de los ingredientes de las tres salsas usadas en el diseño del producto *sous vide*, expresas como porcentaje (%).

Ingredientes de las salsas					
Mostaza	%	Tomate	%	Verde	%
agua	72,38	tomates enteros pelados	46,86	aceite de oliva	67,05
mostaza Dijon	12,54	cebolla	19,27	vinagre	22,35
aceite de girasol	5,19	pimiento verde	19,27	ajo	4,25
azúcar	3,86	aceite de oliva	6,96	perejil fresco	3,91
maicena	2,65	vino blanco	6,96	sal	2,23
limón	1,93	sal	0,25	albahaca	0,15
perejil	0,60	ajo	0,24	pimienta negra	0,06
Sal	0,60	azúcar	0,16		
ajo	0,25	pimienta negra	0,03		

Previamente al cocinado, los ingredientes de las salsas fueron procesados como se indica a continuación. Para la “salsa de mostaza”, los ingredientes fueron mezclados en batidora (Robot 300 Taurus, Oliana, España) durante 1 minuto. Los ingredientes para la “salsa de tomate” fueron cortados, picados y cocinados en una cazuela durante 12-15 minutos. Para la elaboración de la “salsa verde” los ingredientes fueron picados y mezclados en batidora durante 1 minuto.

Una vez elaboradas las distintas salsas, fueron colocadas muestras de cada una de ellas en vasitos transparentes para la posterior cata por los panelistas. Los panelistas evaluaron los atributos de las tres salsas: olor, sabor y apariencia.

Posteriormente, se realizó el análisis sensorial de las salsas combinadas con los filetes. Para ello, los filetes de dorada con las tres salsas fueron envasados a vacío en bolsas BB3050 (Cryovac) y cocinados en un baño termostático a 70 °C. Después, los filetes fueron cortados en porciones de 55x25 mm. Cada porción de pescado junto a una cantidad de salsa, fue colocada en bandejas de aluminio individuales cubiertas con papel de aluminio y probadas por los panelistas con el objetivo de elegir la salsa más apropiada.

### **III.2.2. Cocinado del plato de dorada mediante tecnología *sous vide***

Realizada la elección de la salsa y determinada las condiciones óptimas de cocinado, se procedió a la elaboración del plato *sous vide*.

#### **III.2.2.1. Muestras de pescado**

Las doradas frescas procedían de la empresa Culmárex S.A. Los peces fueron envasados en cajas de poliestireno con hielo y transportados a una empresa local (Rational Foods, S.A. Cartagena, España), dedicada a la elaboración de platos de V gama. En ella tuvo lugar el procesado del pescado (descamado, descabezado, eviscerado, fileteado) y el cocinado de los platos *sous vide*.

Un total de 30 platos fueron elaborados para el presente ensayo. Para cada día de control (0, 7, 17, 34, 48 y 62) se destinaron cinco barquetas donde tres fueron utilizadas

en el análisis sensorial, una para el análisis físico-químico y la restante para el análisis microbiológico.

Los filetes de dorada utilizados para la elaboración de los platos tuvieron un peso aproximado de 150 g. Cada filete fue colocado individualmente en bandejas de polipropileno de 187 x 138 x 25 mm (temperatura de resistencia comprendida entre -5 y +115 °C) (PC/25 PP MNC.NG., Hillfast Packaging S.L., Barcelona, España). La salsa escogida en los ensayos previos fue añadida (100 ml) y las bandejas fueron cubiertas con papel film transparente (permeabilidad al oxígeno de 114 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24 h) (Xpoliester/PLPMC 12+75, Wipack, Hamburg, Alemania), utilizando envasadora Taurus 420 (ULMA, Oñate, Spain) inyectando una mezcla de gases comprendida por un 80 % N<sub>2</sub> y un 20 % de CO<sub>2</sub> (Lingle, 1992). La proporción en el plato de dorada y salsa era de 60:40. El producto se cocinó en un horno de vapor de convección (Climaplust Combi CPC G, Rational Aktiengesellschaft, Landsberg am Lech, Germany) a la temperatura establecida en los ensayos previos.

La temperatura interna del producto se controló con la sonda del horno. Inicialmente, la temperatura del pescado crudo fue de 10 °C.

Para el enfriado rápido, los platos fueron colocados en un abatidor (Friulinux, Pordenone, Italy) durante 45 minutos, utilizando el programa SOFT-A hasta alcanzar en el interior del producto la temperatura de 2 ± 1 °C, medido con un termómetro portátil T200 (Digitron Instrumentation Ltd., Merd Lune, Hertford, UK).

Todas las muestras fueron transportadas en neveras con placas de hielo al Departamento de Tecnología de los Alimentos y almacenadas en condiciones de refrigeración (2 ± 1 °C) en cabina expositora (Helkama, Finland) con tubos de luz fluorescentes (620 lux), reproduciendo condiciones de comercialización.

Se realizaron dos réplicas del ensayo y los análisis fueron llevados a cabo por duplicado.

### III.2.3. Análisis microbiológico

Se realizó el análisis microbiológico a los ingredientes frescos, tanto a los filetes de dorada como a la salsa utilizada, para conocer la carga microbiológica inicial, previa al cocinado el plato.

Se realizaron los siguientes recuentos microbiológicos en la dorada fresca: aerobios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EN), *Pseudomonas* spp (PS), *Staphylococcus aureus* (SA) y Coliformes (CO)/*E.coli* (EC). De manera similar en la calidad microbiológica de la salsa previa a su cocinado: Aerobios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EN), Bacterias ácido lácticas (BAL) y Coliformes (CO)/ *E.coli* (EC) (**Tabla 3**).

El deterioro y la calidad microbiológica de la dorada *sous vide* se evaluó en cada día control mediante los recuentos de los siguientes microorganismos: Aerobios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EN), Bacterias ácido lácticas (BAL), Anaerobios Psicrotrofos (AP) y Mohos y levaduras (ML), *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. La metodología empleada se detalla en el apartado 3.4 de Material y Métodos.

### III.2.4. Análisis físico-químico

El pH de la salsa y del plato de dorada *sous vide* fue analizado en cada día de control junto al resto de parámetros siguiendo la metodología indicada en el apartado 3.2.3 de Material y Métodos.

La oxidación lipídica en la dorada fue evaluada mediante el método TBARs tal y como describe Botsoglou y col. (1994) y detallada en el apartado 3.2.5 de Material y Métodos. En este caso el análisis se realizó tomando 2 gramos de músculo de dorada, sin salsa procedente del plato.

### III.2.5. Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo en cada una de los días control (0, 7, 17, 34, 48 and 62) en el plato *sous vide* con el objetivo de evaluar su calidad y deterioro. Para el análisis, se escogieron tres bandejas, una para la evaluación de la apariencia global del

pescado y la salsa, y las otras dos bandejas para la evaluación de los atributos de olor, sabor y textura en el plato de dorada. El contenido de cada plato (filete y salsa) se calentó en microondas (Balay TYP W-2221, Balay S.A. Zaragoza, Spain) a máxima potencia durante 2 minutos hasta alcanzar la temperatura de 70 °C en el interior del músculo del pescado. Después del calentamiento, los filetes fueron cortados en piezas de aproximadamente 55x25 mm. Cada porción de pescado fue colocado con una cantidad de salsa, manteniendo el ratio inicial del plato 60:40, en bandejas individuales de aluminio cubiertas con papel de aluminio para así mantener las muestras calientes.

### III.2.6. Análisis estadístico

Los cambios microbiológicos, químicos y sensoriales durante el tiempo de almacenamiento de los platos de dorada *sous vide* con salsa fueron estadísticamente analizados mediante ANOVA del factor (“Tukey test”) con el programa para Windows SPSS 15.0. Las diferencias fueron consideradas significativas a nivel  $P < 0,05$ .

## III.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### III.3.1. Temperatura de cocinado y elección de salsa

El tiempo necesario para alcanzar los 50, 60 y 70 °C en el centro de los filetes de dorada fue de 2,29, 5,42 y 12,59 minutos, respectivamente. La **Tabla 15** muestra las puntuaciones en la textura (firmeza y jugosidad) y sabor otorgados por los panelistas en cada una de las temperaturas de cocción evaluados. La temperatura de cocinado de 60 °C fue escogida como la más adecuada para conseguir la mejor calidad sensorial del plato *sous vide* de dorada. Cuando las temperaturas del cocinado están comprendidas entre los 55-60 °C, el resultado es de un pescado generalmente mucho más firme y jugoso (Roca y Brugués, 2004). De acuerdo con González-Fandos y col. (2004), la aplicación de altas temperaturas en los tratamientos de pescado, da lugar a un decrecimiento inaceptable en la calidad sensorial.

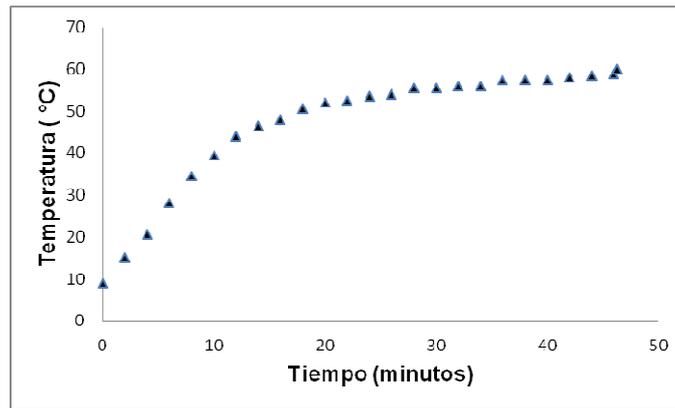
**Tabla 15.** Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$  SD) en los atributos evaluados para la elección de la temperatura de cocinado y la salsa, en la elaboración del plato de dorada *sous vide*.

		Temperaturas		
		50 °C	60 °C	70 °C
Pescado cocinado	Firmeza	3,19 $\pm$ 0,29	5,10 $\pm$ 0,23	6,04 $\pm$ 0,20
	Jugosidad	8,91 $\pm$ 0,34	8,01 $\pm$ 0,27	6,99 $\pm$ 0,31
	Sabor propio	7,24 $\pm$ 0,42	9,84 $\pm$ 0,18	8,03 $\pm$ 0,24
		Salsas		
		Mostaza	Tomate	Verde
Salsas	Olor	9,32 $\pm$ 0,59	9,79 $\pm$ 0,23	9,80 $\pm$ 0,22
	Sabor	9,80 $\pm$ 0,22	9,76 $\pm$ 0,25	9,71 $\pm$ 0,27
	Apariencia	9,76 $\pm$ 0,25	9,74 $\pm$ 0,27	9,61 $\pm$ 0,35

El pH y la temperatura de las salsas después de la elaboración fue de 3,93 y 19,7 °C para la salsa de mostaza, 4,13 y 66,1 °C para la de tomate y 3,66 y 19,6 °C para la salsa verde. Las puntuaciones respecto al olor, sabor y la apariencia fueron muy altas para todas las salsas probadas. Aunque las tres salsas recibieron buenas puntuaciones, los panelistas escogieron la salsa verde por considerar que además combinaba mejor con el pescado. Por otro lado, el bajo pH de la salsa resultó de gran interés desde el punto de vista tecnológico.

Uno de los parámetros más importantes de la salsa verde resultó el bajo pH, el cual resulta interesante desde el punto de vista tecnológico.

Finalmente, el tiempo necesario para cocinar el producto *sous vide* a 60 °C en horno de convección resultó de 46,60 minutos. La **Figura 20** ilustra la evolución de la temperatura interna del plato de dorada *sous vide* durante el cocinado.



**Figura 20.** Evolución de la temperatura interna del producto de dorada *sous vide* durante el cocinado.

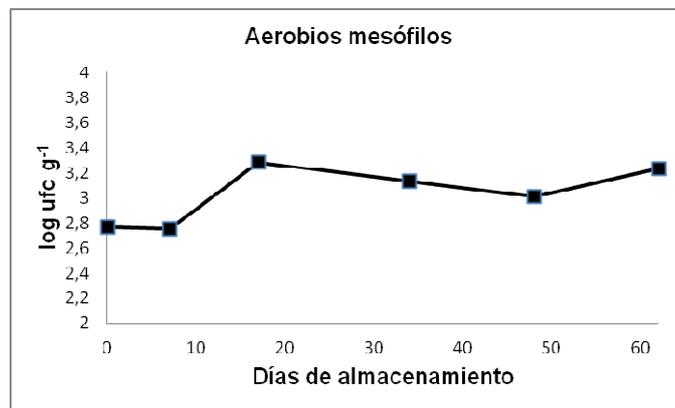
### III.3.2. Calidad microbiológica de dorada fresca, salsa y dorada *sous vide*

Los valores de aerobios mesófilos (AM) obtenidos en dorada fresca fueron  $< 2$  log ufc  $g^{-1}$ , y similares a los obtenidos por Álvarez y col. (2012). Esto demuestra buenas condiciones higiénicas y de manipulación correcta.

En el caso de la calidad microbiológica de la salsa, el uso de hierbas y vegetales frescos para la elaboración de la misma, influyó en los recuentos microbiológicos ya que se obtuvieron valores en AM de 3,24 log ufc  $g^{-1}$ . Witkowska y col. (2011) obtuvieron valores inaceptables de AM ( $> 6$  log ufc  $g^{-1}$ ) debido a la calidad microbiológica del perejil y Schweiggert y col. (2007) recopilaron diferentes recuentos microbianos para albahaca ( $2 \times 10^4 - 4 \times 10^5$ ), ajo ( $5 \times 10^4$ ) y pimienta negra ( $5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ ) ufc  $g^{-1}$ . Witkowska y col. (2011) afirmaron que la calidad microbiológica de hierbas y especias reflejan la situación higiénica de los productos de la región donde son producidos, debido a que son cultivados, cosechados y procesados en climas cálidos y húmedos, estas hierbas y especias podrían contener una elevada carga microbiana.

En cuanto a los microorganismos estudiados en la dorada cruda (EN, PS, SA, CO y EC) y en la salsa verde (EN, BAL, CO y EC), todos ellos mostraron valores  $< 1$  log ufc  $g^{-1}$  (por debajo del nivel de detección) (datos no mostrados).

La **Figura 21** muestra los recuentos de AM en los diferentes tiempos de dorada *sous vide*. Los valores no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) durante los 62 días de almacenamiento. González-Fandos y col. (2004) obtuvieron valores similares en los recuentos de aerobios mesófilos en trucha arco iris cocinado *sous vide* después de 14 días de almacenamiento a 2 °C con un tratamiento de calor similar. También, Giavasis y col. (2012) encontraron valores de aerobios mesófilos por debajo del nivel de detección para trucha cocinada *sous vide* con aceite de girasol, ácido cítrico y aceite de orégano después de 150 días.



**Figura 21.** Evolución de los recuentos en aerobios mesófilos (log ufc g<sup>-1</sup>) en dorada *sous vide* durante 62 días almacenado a  $2 \pm 1$  °C.

Aunque el tratamiento de calor no eliminó la carga microbiana de AM, la temperatura y las condiciones de envasado utilizados en el proceso *sous vide* mantuvieron los recuentos microbianos estables. Estos recuentos estuvieron por debajo de los límites estipulados por el RD Español 3484/2000, el cual establece un máximo en los valores de aerobios mesófilos de  $10^5$  ufc g<sup>-1</sup> en platos listos para consumir que implican tratamientos de calor. Actualmente este decreto se encuentra derogado, aunque sigue siendo utilizado como guía microbiológica para este tipo de productos elaborados.

En cuanto a los restantes microorganismos evaluados (EN, BAL, AP y ML), estos estuvieron por debajo del límite de detección ( $< 1$  log ufc g<sup>-1</sup>). También, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* se mantuvieron ausentes durante los 62 días de estudio. De acuerdo con Turkkan y col. (2008), ni *Salmonella* ni mohos y levaduras

fueron detectados en lubina cocinada *sous vide* durante el tiempo de almacenamiento, aunque González-Fandos y col. (2004) detectaron recuentos de *Enterobacteriaceae* en lotes procesados a 70 °C después de 45 días de almacenamiento a 10 °C. Los platos de dorada “listos para comer” permanecieron en todo momento almacenados a baja temperatura ( $2 \pm 1$  °C), la cual previene la proliferación bacteriana. Silva and Gibbs (2010) afirmaron que los microorganismos responsables del deterioro, las bacterias psicrótrofas, bacterias lácticas y mohos y levaduras, pueden crecer en alimentos poco ácidos y almacenados en refrigeración, generalmente debido a un proceso de recontaminación. Sin embargo, la dorada *sous vide*, el bajo pH resultó beneficiosa desde el punto de vista microbiológico.

Como mencionaron los autores Kyriakides y Batchford (2002), los microorganismos anaerobios psicrótrofos tienden a ser altamente sensibles al calor y son fácilmente destruidos por tratamientos de calor y pasteurización. La forma vegetativa de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes* también es capaz de crecer en alimentos con pH > 4,6 y a temperaturas inferiores de 6 °C, aunque es fácilmente eliminada en unos segundos a temperaturas de 70 °C o incluso menos (Silva y Gibbs, 2010). Otros patógenos no formadores de esporas como es *Salmonella*, también puede resultar un problema en alimentos refrigerados. Sin embargo, la pasteurización durante unos segundos a 65 °C, podría resultar suficiente para eliminar este microorganismo.

Muchos de los ingredientes usados en la producción de la salsa verde han sido descritos en la literatura por sus propiedades antibacterianas. Es el caso del ajo (*Allium sativum*), el cual es habitualmente usado no solo como especia a la hora de condimentar, sino también como ingrediente funcional. Este componente es natural y un excelente sustituto de productos antimicrobianos sintéticos (Kim y col., 2010). Si bien las hojas de perejil fresco, seco y deshidratado, son utilizados como condimento para adornar y dar sabor, además de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y otras especies (Petropoulos y col., 2004). En cuanto a la pimienta negra, ésta es muy usada en preparaciones culinarias tradicionales y entre sus componentes está la piperina, bien conocida por sus propiedades antibacterianas (Reddy y col., 2004). Tassou y col. (1996) afirmaron que el uso del aceite de oliva (el cual reduce el oxígeno en la superficie del pescado) y el zumo de limón (disminuye el pH) en dorada envasada en atmósfera modificada, tuvo un efecto bacteriostático y/o efectos bactericidas en la inoculación de

*Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*, así como en la microflora autóctona, en la cual se incluyen *Pseudomonas* spp., bacterias ácido lácticas y *Brochothrix thermosphacta*.

La tecnología *sous vide* en combinación con una baja temperatura de almacenamiento ( $2 \pm 1^\circ \text{C}$ ), retrasó el deterioro microbiológico en platos de dorada *sous vide*. También, los ingredientes utilizados en la salsa, escogidas por sus propiedades antimicrobianas, ayudaron en la conservación del plato *sous vide*. De acuerdo con Díaz y col. (2011), el cocinado *sous vide* es efectivo en la estabilización microbiológica del pescado cocinado.

### III.3.3. pH

Los valores de pH obtenidos para la salsa antes del cocinado *sous vide* resultaron de 3,66. Este bajo pH en la salsa se corresponde principalmente con la adición del vinagre. Fagan y Gormley (2005) obtuvieron valores de pH similares en la salsa elaborada denominada “Cajun” (3,96). Los autores afirmaron que la naturaleza ácida de la salsa resultó beneficiosa ya que actúa como un obstáculo microbiano en el envasado del pescado junto a la salsa. Después del cocinado *sous vide*, el pH de la salsa estuvo comprendida entre valores de 3,99 (día 0) y 4,81 (día 62) y el pH del plato de dorada *sous vide* entre valores de 5,18 (día 0) y 4,75 (día 62) (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Valores medios obtenidos en el análisis físico-químico de pH y TBARs (mg MDA kg<sup>-1</sup>) en platos de dorada *sous vide* almacenados a 2 ± 1

Días	pH	pH	TBARs
	(salsa cocinada)	(dorada <i>sous vide</i> )	(mg MDA kg <sup>-1</sup> )
0	3,99 ± 0,23	5,18 ± 0,35	0,02 ± 0,01 <sup>y</sup>
7	4,27 ± 0,12	5,07 ± 0,07	0,05 ± 0,01 <sup>y</sup>
17	4,50 ± 0,37	4,93 ± 0,44	0,19 ± 0,05 <sup>xy</sup>
34	4,60 ± 0,18	5,06 ± 0,07	0,38 ± 0,05 <sup>wx</sup>
48	4,44 ± 0,13	4,50 ± 0,07	0,36 ± 0,04 <sup>x</sup>
62	4,81 ± 0,04	4,75 ± 0,19	0,56 ± 0,25 <sup>w</sup>

**w,x,y,z:** Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre los días de almacenamiento.

Los resultados obtenidos durante el período de almacenamiento no mostraron diferencia significativas ( $P > 0,05$ ), y de acuerdo con González-Fandos y col., (2004), el pH no varió durante el periodo de almacenamiento, mientras que Turkkan y col. (2008) observaron un incremento en los valores de pH en lubina cocinada mediante fritura, al horno y en microondas en el día inicial de estudio (6,69 y 6,73). Sin embargo, Giavasis y col. (2012) encontraron bajos valores de pH en filetes de trucha cocinada *sous vide* con ácido cítrico añadido.

El tratamiento *sous vide* y el tiempo de almacenamiento no afectaron en el pH de la dorada y salsa cocinadas, favoreciendo por tanto la preservación del producto.

### III.3.4. TBARs

Los valores de TBARs obtenidos en el plato de dorada *sous vide* durante los 62 días de almacenamiento estuvieron por debajo del valor de 1 mg MDA kg<sup>-1</sup> (Tabla 16). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por los autores Giavasis y col., (2012) en filete de trucha arco iris cocinada *sous vide* con ácido cítrico y aceite de orégano. También con los obtenidos por Shakila y col. (2012), con valores de 1,84 mg MDA kg<sup>-1</sup> en el día 28 en pescado cocinado *sous vide* al curry. Kilinc y Cakli (2005) obtuvieron valores de 8,14 mg MDA kg<sup>-1</sup> en sardina marinada después de 180 días de

almacenamiento y Tokur (2007) obtuvo valores de 4,98, 5,78, 8,40 and 1,82 mg MDA kg<sup>-1</sup> después de los procesos de cocinado: fritura, al horno, barbacoa y ahumado, respectivamente. Estos autores sugirieron que el cocinado contribuyó al incremento en los niveles de oxidación de los productos, mientras que Roldán y col. (2014) concluyeron que el incremento en las temperaturas de cocinado (60, 70 and 80 °C) llevaron a una caída de los compuestos secundarios como consecuencia de la oxidación lipídica. Basado en los resultados obtenidos, la temperatura y el tipo de envasado utilizado en el cocinado *sous vide* pueden ser estrategias esenciales para mantener los bajos niveles de TBARs en los productos. Esto también se aplica a la salsa ya que en muchas hierbas de uso culinario han sido demostradas sus propiedades antioxidantes naturales, como es el ejemplo de la actividad antioxidante de la albahaca (*Ocimum basilicum L.*) la cual ha sido investigada utilizando varios sistemas de modelo y ensayo (Lee y col. 2005).

El aceite de oliva virgen es el único, entre los aceites, con más uso en la cocina debido a su alto contenido de ácidos grasos mono insaturados y la presencia de compuestos que resultan saludables, terpenoides, escualeno y tocoferoles, que desempeñan un papel fundamental como antioxidantes en la fase lipídica, al eliminar los radicales en las membranas y las partículas de lipoproteínas (Boskou y Visioli, 2003); el vinagre (alcohólico y fermentación ácida) es también rico en polifenoles. Ha sido demostrado que el vinagre muestra una capacidad antioxidante que está correlacionado con su contenido polifenólico (Davalos y otros., 2005).

Los bajos valores de TBARs obtenidos en los filetes de dorada puede ser debidos a la combinación adecuada de diferentes estrategias para su retraso: el uso de ingredientes con propiedades antioxidantes, el método de cocinado *sous vide* (a vacío) y las condiciones de almacenamiento en refrigeración.

### III.3.5. Análisis sensorial

La **Tabla 17** muestra las puntuaciones medias y desviaciones estándar de los diferentes atributos utilizados en la evaluación de la calidad sensorial de los platos de dorada *sous vide*. Durante los primeros 17 días de almacenamiento, el olor global (OG) mostró la máxima puntuación (10), donde predominó un fuerte olor a ácido acético

(OAA) (7,90) valorado positivamente, seguido del olor a ajo (OA) (5,44) y olor a albahaca (OAL) (2,27). Después de este día, los atributos se modificaron dependiendo del tiempo de almacenamiento. En el último día de almacenamiento (62), la intensidad en el atributo OG tuvo un decrecimiento de solo un punto decimal (9,02) respecto al día inicial ( $P < 0,001$ ). La alta intensidad en el olor del producto resultó estable durante la vida útil del mismo, probablemente debido a las bajas temperaturas en el cocinado (González-Fandos y col., 2004).

Respecto al sabor, la puntuación inicial de 9,64 indicó que el plato de dorada tuvo una alta intensidad sávida debido al conjunto de ingredientes que componen el plato. En lo que respecta a la intensidad, el sabor a ácido acético (SAA) (4,95), sabor a ajo (SA) (4,00) y, en menor medida, sabor a albahaca (1,21) fueron apreciados. Durante los 62 días de almacenamiento, ambos atributos de sabores y olores se mantuvieron constantes. La dorada *sous vide*, no mostró otros olores (OO) u otros sabores (OS). Los compuestos asociados con otros olores y otros sabores son generados por reacciones enzimáticas, oxidación lipídica, acción microbiana y medio ambiental o derivado de reacciones térmicas (Selli y col., 2009). Por tanto, los resultados se correlacionan con los obtenidos en la calidad microbiológica y los bajos valores de TBARs obtenidos.

Los atributos que resultaron más positivos respecto a la apariencia de la salsa resultaron ser el brillo (B) (8,75) y la emulsión de la salsa (E) (10,00). El color de la salsa fue descrito como moderadamente verde-dorado como resultado de la emulsión del aceite y el vinagre con el resto de los ingredientes, perejil y la albahaca. La salsa además, presentó una baja viscosidad. Todos estos atributos se mantuvieron constantes hasta el final del estudio. El color de los filetes de dorada cocinados (CP), no mostraron ningún cambio significativo ( $P > 0,05$ ) durante el periodo de almacenamiento, manteniendo el color blanco normal del cocinado.

El cocinado *sous vide* produjo una mayor jugosidad (J) en el pescado (8,25) en el día inicial manteniéndose los valores constantes hasta el día 48 (6,55), cayendo este valor hasta 5,23 en el día 62 ( $P < 0,001$ ). Esto es una de las ventajas que presenta la tecnología *sous vide*, el pescado es cocinado junto a la salsa en el mismo envase integrando los diferentes componentes e impidiéndose por tanto la pérdida de jugos.

Además, también mantiene al mismo tiempo una textura más suave y más jugosa (Nyati, 2000).

El pescado mantuvo firme su estructura hasta el día 34, posteriormente la firmeza (F) decreció dando lugar a la disgregación de la estructura e incrementando la pastosidad (P) del producto (de 0 a 2,32). Por tanto, la estructura del pescado jugó un papel importante desde el punto de vista de la calidad, desde que se produjeron los cambios más significativos respecto los atributos de textura (firmeza y pastosidad). En resultados obtenidos por los autores Díaz y col. (2011), los parámetros de textura se vieron afectados por el tiempo de almacenamiento (en salmón cocinado), mostrándose las muestras más suaves con el incremento del tiempo, menos duras y menos jugosas. Kim y Park (2000) afirmaron que la actividad residual de las proteasas en el músculo continúa en el pescado cocinado refrigerado. Por lo tanto, la degradación estructural en el filete continuó con el tiempo de almacenamiento. El plato de dorada *sous vide* obtuvo en el día inicial una alta puntuación en la calidad global (CG), reflejando por tanto una alta calidad sensorial del producto. Los panelistas destacaron la perfecta combinación del pescado junto a la salsa verde en lo que respecta a los atributos del olor, sabor y la textura. El pescado mantuvo su firmeza y jugosidad por un largo periodo de tiempo pero, al final del estudio, la puntuación de la calidad global (CG) decreció hasta 6,93 puntos, principalmente debido a la significativa degradación de la textura ( $P < 0,001$ ). La baja temperatura de cocinado aplicada (60 °C) podría contribuir a mantener el olor y el sabor del plato de dorada *sous vide* y también una textura aceptable.

Como mencionaron Jang y Lee (2005), el envasado *sous vide* resultó efectivo en el retraso del deterioro a nivel microbiológico, químico y sensorial del producto.

**Tabla 17.** Análisis sensorial del plato cocinado *sous vide* de dorada almacenada a  $2 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 62 días.

Días	B	CS	E	V	CP	OG	OO	OAA	OA
0	8,75 ± 0,96	5,00 ± 0,21 <sup>z</sup>	10,00 ± 0,00	3,15 ± 0,67 <sup>w</sup>	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00 <sup>w</sup>	0,00 ± 0,00	7,90 ± 0,25 <sup>w</sup>	5,44 ± 0,70 <sup>w</sup>
7	8,29 ± 0,34	5,23 ± 0,22 <sup>yz</sup>	10,00 ± 0,00	1,66 ± 0,72 <sup>x</sup>	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00 <sup>w</sup>	0,00 ± 0,00	7,74 ± 0,80 <sup>wx</sup>	5,25 ± 0,82 <sup>wx</sup>
17	8,57 ± 0,29	5,69 ± 0,64 <sup>y</sup>	10,00 ± 0,00	2,61 ± 0,47 <sup>w</sup>	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00 <sup>w</sup>	0,00 ± 0,00	7,19 ± 0,64 <sup>xy</sup>	4,76 ± 0,63 <sup>xy</sup>
34	8,42 ± 0,50	5,19 ± 0,23 <sup>yz</sup>	10,00 ± 0,00	2,61 ± 0,60 <sup>w</sup>	10,00 ± 0,00	8,46 ± 0,33 <sup>z</sup>	0,08 ± 0,01	6,67 ± 0,60 <sup>yz</sup>	4,78 ± 0,72 <sup>wx</sup>
48	8,57 ± 0,27	7,18 ± 0,19 <sup>w</sup>	10,00 ± 0,00	1,02 ± 0,13 <sup>x</sup>	10,00 ± 0,00	9,65 ± 0,52 <sup>x</sup>	0,00 ± 0,00	6,17 ± 0,23 <sup>z</sup>	4,49 ± 0,56 <sup>xy</sup>
62	8,52 ± 0,41	6,43 ± 0,34 <sup>x</sup>	10,00 ± 0,00	1,65 ± 0,42 <sup>x</sup>	10,00 ± 0,00	9,02 ± 0,53 <sup>y</sup>	0,00 ± 0,00	6,32 ± 0,43 <sup>z</sup>	3,86 ± 0,50 <sup>y</sup>
<b>Significancia</b>	NS	***	NS	***	NS	***	NS	***	***

**B:** Brillo; **SC:** Color salsa; **E:** Emulsión; **V:** Viscosidad; **CP:** Color del pescado; **OG:** Olor global; **OO:** Otros olores; **OAA:** Olor ácido acético; **OA:** Olor ajo;

**Tabla 17.** Análisis sensorial del plato cocinado *sous vide* de dorada almacenada a  $2 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 62 días.

Días	OAL	SG	OS	SAA	SAL	SA	J	F	P	CG
0	2,27 ± 0,70	9,64 ± 0,64 <sup>w</sup>	0,00 ± 0,00	4,95 ± 0,66 <sup>w</sup>	1,21 ± 0,62	4,00 ± 0,84 <sup>w</sup>	8,25 ± 0,69 <sup>w</sup>	4,78 ± 0,68 <sup>w</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,46 ± 0,75 <sup>w</sup>
7	2,29 ± 0,60	9,91 ± 0,22 <sup>w</sup>	0,00 ± 0,00	4,33 ± 0,59 <sup>wx</sup>	1,70 ± 0,77	2,99 ± 0,85 <sup>x</sup>	8,03 ± 0,58 <sup>w</sup>	4,83 ± 0,70 <sup>w</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,29 ± 0,57 <sup>w</sup>
17	2,07 ± 0,55	9,46 ± 0,67 <sup>w</sup>	0,07 ± 0,24	4,67 ± 0,71 <sup>wx</sup>	1,82 ± 0,55	3,42 ± 0,50 <sup>wx</sup>	6,85 ± 0,72 <sup>x</sup>	4,57 ± 0,65 <sup>wx</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,53 ± 0,55 <sup>w</sup>
34	1,71 ± 0,47	8,51 ± 0,51 <sup>xy</sup>	0,03 ± 0,12	4,16 ± 0,68 <sup>x</sup>	1,79 ± 0,51	3,20 ± 0,52 <sup>wx</sup>	6,77 ± 0,77 <sup>x</sup>	3,64 ± 0,69 <sup>y</sup>	2,32 ± 0,68 <sup>w</sup>	7,95 ± 0,61 <sup>x</sup>
48	1,91 ± 0,47	8,89 ± 0,54 <sup>x</sup>	0,09 ± 0,21	4,89 ± 0,60 <sup>w</sup>	1,82 ± 0,35	3,50 ± 0,38 <sup>wx</sup>	6,65 ± 0,40 <sup>x</sup>	3,79 ± 0,51 <sup>y</sup>	2,16 ± 0,31 <sup>w</sup>	7,53 ± 0,64 <sup>xy</sup>
62	1,95 ± 0,66	7,97 ± 0,87 <sup>y</sup>	0,18 ± 0,41	4,95 ± 0,38 <sup>w</sup>	1,68 ± 0,51	3,37 ± 0,59 <sup>wx</sup>	5,23 ± 0,55 <sup>y</sup>	3,90 ± 0,51 <sup>xy</sup>	2,38 ± 0,73 <sup>w</sup>	6,93 ± 0,44 <sup>y</sup>
<b>Significancia</b>	NS	***	NS	***	NS	**	***	***	***	***

**OAL:** Olor a albahaca; **SG:** Sabor global; **OS:** Otros sabores; **SAA:** Sabor ácido acético; **SA:** Sabor albahaca; **SA:** Sabor ajo; **J:** Jugosidad; **F:** Firmeza; **P:** Pastosidad; **CG:** Calidad global;

**w,x,y,z:** Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas entre días de almacenamiento.

**NS.** No significancia; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.



## **CAPITULO IV. EFECTO DEL TIPO DE ENVASADO (BOLSA vs BARQUETA) SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA Y SENSORIAL DE FILETES DE DORADA COCINADOS *SOUS VIDE*.**

### **IV.1. OBJETIVOS**

Evaluar el efecto del cocinado en bolsa y en barqueta sobre el deterioro físico-químico, microbiológico y sensorial de dorada *sous vide* almacenada durante un máximo de 62 días en refrigeración.

### **IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **IV.2.1. Envasado y cocinado *sous vide***

Para el siguiente ensayo se utilizaron 30 doradas (*Sparus aurata*) procedentes de Culmárex S.A. Los pescados se evisceraron y filetearon obteniendo un total de 60 filetes con los que se elaboraron 60 platos de dorada *sous vide*. La manipulación y manejo de las muestras en cada uno de los procesos fue realizado siguiendo correctas prácticas de higiene en sala de refrigeración.

En base al sistema de envasado se establecieron dos lotes de 30 filetes cada uno, bolsa (BL) y barqueta (BQ), con los que se elaboraron los correspondientes muestras *sous vide*. Cada muestra se elaboró con 150 g de dorada y 100 ml de salsa verde. Los ingredientes de la salsa y las proporciones usadas fueron las mismas que en el ensayo anterior (Capítulo III). De cada lote, cinco muestras fueron destinadas para cada día de control, de los cuales 3 muestras fueron para el análisis sensorial, 1 muestra para el análisis físico-químico y la otra restante, para el análisis microbiológico.

Las especificaciones de cada tipo de envase correspondiente a bolsa (BL) y barqueta (BQ), se detallan a continuación.

#### IV.2.1.1. Bolsa

Las bolsas empleadas en el presente ensayo, fueron de poliamida-polipropileno (SACOLIVA, S.L., Barcelona, España), cuyas medidas fueron 200 x 300 m/m, con una resistencia al calor comprendido entre -30 °C a 120 °C, permeabilidad al oxígeno de 7 cc/m<sup>2</sup> por 24 h a 4 °C/80 % HR y permeabilidad al agua de 0,8 g/m<sup>2</sup>/24 h. Las bolsas fueron envasadas a vacío, empleando el equipo EGAR 8 (Egarvac S.L., Barcelona, España).

#### IV.2.1.2. Barqueta

El material de las barquetas estaba compuesto por una lámina monocapa de polipropileno de 520 x 0,90 mm de dimensiones 187 x 138 x 25 mm y resistencia a las temperaturas de entre -5 y 115 °C (PC / 25 PP MNC.NG., Hillfast Packaging SL, Barcelona, España ). El peso y la capacidad de bandejas de plástico fueron 20,60 g y 420,0 ml, respectivamente. Las bandejas fueron selladas con papel *film* (permeabilidad al oxígeno de 114 cm<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup> / 24 h ) ( Xpoliester / PLPMC 12 + 75, Wipack , Hamburgo, Alemania), utilizando una envasadora Taurus 420 ( ULMA, Oñate, España), inyectando en ella una mezcla de gases comprendida por 80 % de N<sub>2</sub> y 20 % de CO<sub>2</sub>. La inyección de esta mezcla de gases se realizó para prevenir el colapso de la barqueta y eliminar el oxígeno existente en el espacio de cabeza (Lingle, 1992).

### IV.2.2. Cocinado *sous vide* y condiciones de almacenamiento

El proceso de cocinado se llevó a cabo en un horno de vapor (Climaplust Combi CPC G, Rational Aktiengesellschaft, Landsberg am Lech, Germany) a 65 °C, hasta alcanzar en el centro del producto 60 °C después de 46,30 minutos. Después del cocinado *sous vide*, las muestras fueron enfriadas a 4 °C durante 45 minutos utilizando un abatidor (Friulinox, Pordedone, Italy). La temperatura fue monitorizada en todo momento mediante un termómetro portátil T200 (Digitron Instrumentation Ltd., Merd Lane, Hertford, UK). La temperatura inicial de los filetes de dorada crudos fue de 9 °C. Después del cocinado *sous vide*, las muestras fueron almacenadas en condiciones de refrigeración y transportadas en cajas de poliestireno con placas de hielo hasta el departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia.

Las muestras fueron almacenadas a  $2 \pm 1$  °C en vitrina expositora (Helkama, Finland) con luz (620 lux), reproduciendo condiciones de comercialización, en el Departamento de Tecnología de los Alimentos la Universidad de Murcia. Se realizaron análisis microbiológicos, físico-químicos y sensoriales durante los días de estudio 0, 7, 17, 34, 48 y 62. El ensayo fue realizado por duplicado y las muestras fueron analizadas en el mismo día del muestreo.

#### **IV.2.3. Análisis físico-químico**

El análisis de pH y TBARs se llevó a cabo en las muestras BL y BQ durante los días de control, tal y como viene determinado en los apartados de Material y Métodos 3.2.3 y 3.2.5, respectivamente.

#### **IV.2.4. Análisis microbiológico**

La calidad microbiológica y el deterioro de los platos de dorada *sous vide* envasados en BL y BQ, fueron evaluados durante el periodo de almacenamiento. Los microorganismos analizados fueron aerobios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EN), bacterias ácido lácticas (BAL), anaerobios totales psicrótrofos (AP), mohos y levaduras (ML), *Salmonella* (S) y *Listeria monocytogenes* (L). La metodología empleada se encuentra en el apartado 3.3 de Material y Métodos, además de los medios de cultivo utilizados en cada microorganismo y temperatura de incubación.

#### **IV.2.5. Análisis sensorial**

Previo al análisis sensorial, los panelistas se entrenaron (apartado 3.5.2 de Material y Métodos) con el objetivo de definir cada uno de los atributos sensoriales del plato de dorada *sous vide*. Se hizo especial énfasis en los olores propios del pescado y otros olores característicos que pudieran aparecer durante el tiempo de almacenamiento. De tal modo que se evaluó la calidad y los cambios debidos al deterioro durante el periodo de almacenamiento de las muestras BL y BQ.

La preparación de las muestras consistió en el calentamiento del plato desprovisto de su envase (bolsa y barqueta), durante 2 minutos hasta alcanzar la temperatura en su interior de 70 °C (Doyle, 2002) medido con termómetro portátil T200 (Digitron Instrumentation Ltd., Merd Lune, Hertford, UK). Las muestras se cortaron en trozos aproximados de 55x25 mm, se incorporó un volumen de salsa (15 ml) y se colocaron en bandejas tapadas con papel de aluminio para conservar el calor. Las muestras se sirvieron individualmente a cada uno de los panelistas para su evaluación, utilizando una escala no estructurada de 10 cm. Cabe destacar, que los panelistas durante el análisis sensorial desconocían el envase original de cada una de las muestras testadas.

Se analizaron los siguientes atributos en la dorada *sous vide*: olor global (OG), sabor global (SG), otros olores (OO), otros sabores (OS), firmeza (F), jugosidad (J), pastosidad (P) y calidad global (CG). Estos atributos se encuentran debidamente definidos en la **Tabla 6** de Material y Métodos.

#### **IV.3.6. Análisis estadístico**

El efecto del envasado y del tiempo de almacenamiento de la dorada *sous vide* se estudió estadísticamente tal y como se indica en el apartado 3.6 de Material y Métodos.

### **IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **IV.3.1. Análisis físico-químico**

##### **IV.3.1.1. pH**

Los valores medios obtenidos respecto al pH de las muestras *sous vide* envasadas en bolsa (BL) y barqueta (BQ) durante el periodo de almacenamiento, se muestran en la **Tabla 18**. En el día inicial, los resultados fueron de 5,59 y 5,18 para BL y BQ, respectivamente. Ambos tipos de envasados sólo mostraron diferencias significativas en los días 7 ( $P < 0,05$ ) y 48 ( $P < 0,01$ ). El pH se mantuvo constante en ambas muestras (BL y BQ). Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por Cosansu y col. (2013) donde los valores de pH estuvieron comprendidos entre 5,08

(día 0) y 5,24 en el día 63 en pescado merlán (*Merlangius merlangus*) envasado en bandejas y cocinado *sous vide* con zumo de limón. Coincidiendo con estos autores, la incorporación de zumo o salsa contribuye a la disminución del pH en el producto final y la vida útil se puede extender debido a la acidificación del producto (Carlin, 1999), retrasando los cambios químicos y microbiológicos (Topuz y col., 2014). Gulyavuz y Unlusayin, (1999) afirmaron que el pescado se considera deteriorado cuando el valor de pH es superior a 7,0 y un valor aproximado de 5,7 ayuda a conservar el producto (Gorris y Peck, 1998). Esta afirmación coincide con nuestros resultados donde el valor de pH máximo y el mínimo durante todo el tiempo de almacenamiento, estuvo comprendido en 5,59 (día 0) y 4,48 (día 48) en muestras BL y BQ, respectivamente. Por lo tanto, el producto *sous vide* envasado en BL y BQ, mostró un bajo valor de pH durante los 62 días de almacenamiento.

**Tabla 18.** Valores medios y desviaciones estándar para el pH en las muestras *sous vide* envasadas en bolsa (BL) y barqueta (BQ) y almacenadas a  $2 \pm 1$  °C.

Días de almacenamiento	BL	BQ	Significancia
0	5,59 ± 0,70	5,18 ± 0,35	NS
7	5,52 ± 0,06	5,07 ± 0,07	*
17	5,24 ± 0,70	4,93 ± 0,44	NS
34	5,24 ± 0,05	5,06 ± 0,07	NS
48	5,25 ± 0,01	4,50 ± 0,07	**
62	4,80 ± 0,02	4,75 ± 0,19	NS
Significancia	NS	NS	

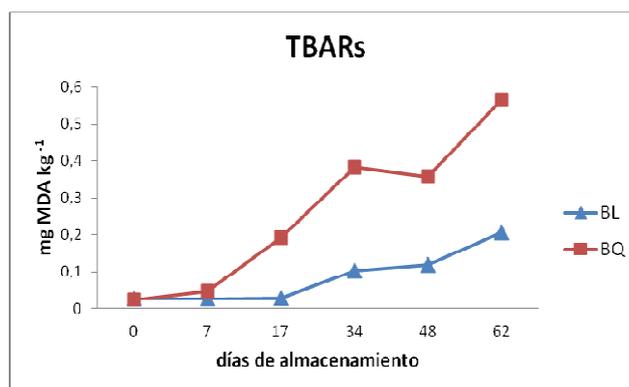
NS. No significancia; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

#### IV.3.1.2. TBARs

La oxidación lipídica es, después del crecimiento microbiano, la principal causa del deterioro en los alimentos. En particular, los alimentos con un alto contenido lipídico y con un alto grado en ácidos grasos insaturados (Gómez-Estaca y col., 2014).

La **Figura 22** ilustra los valores de TBARs en los filetes de dorada cocinados *sous vide* en los diferentes tipos de envasado. En el día inicial, se obtuvieron bajos

valores de TBARs (0,03 y 0,02 mg MDA kg<sup>-1</sup>) para BL y BQ, respectivamente, comparado con otros tipos de especies de pescado cocinados *sous vide* u otras técnicas de cocinado (Cosansu y col., 2013; Özyurt, 2013). Tokur (2007) obtuvo valores altos, cuyo rango estuvo comprendido entre 1,82 y 8,40 mg MDA kg<sup>-1</sup> para trucha arco iris ahumada y a la barbacoa. Los autores afirmaron que el cocinado contribuyó al incremento en los niveles de oxidación del producto.



**Figura 22.** Valores de MDA (mg.kg<sup>-1</sup>) obtenidos en filetes de dorada envasadas en bolsa (BL) y barqueta (BQ) durante el almacenamiento.

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) durante el tiempo de almacenamiento en los valores de TBARs en ambas muestras con resultados comprendidos entre 0,21 (BL) y 0,56 (BQ) mg MDA.kg<sup>-1</sup> en el último día de estudio. Hay que tener en cuenta que los valores obtenidos resultaron muy bajos comparados con los obtenidos por Cosansu y col. (2013) en el día 63 (11,71 mg MDA kg<sup>-1</sup>) en pescadilla cocinada *sous vide*. Algunos autores han establecido valores de TBARs en productos marinos. Así, Lakshmisha y col. (2008) señalaron valores máximos de 5 mg MDA kg<sup>-1</sup> para el pescado Indian mackerel, indicando una buena calidad en el pescado refrigerado, congelado o almacenado en hielo. Sin embargo, en la actualidad no se han establecido rangos de valores de TBARs en producto marino cocinado, debido a escasez de estudios en este ámbito.

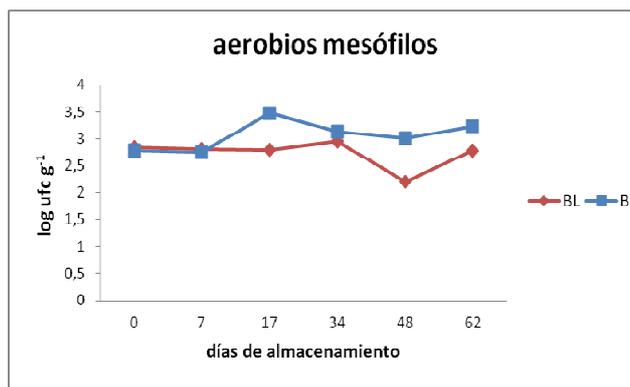
Como la literatura indica, la temperatura de cocinado afecta a la oxidación lipídica del pescado, sin embargo, las temperaturas inferiores a 100 °C utilizadas en el cocinado *sous vide* resultaron adecuadas para obtener bajos valores de TBARs. La

adición de salsa con propiedades antioxidantes, podría también, favorecer los bajos valores, independientemente del tipo de envasado utilizado. Sin embargo, el factor más importante resultó ser el envasado en anaerobiosis utilizado en ambos casos (bolsas y barquetas), ya que retrasó la oxidación lipídica durante el almacenamiento en refrigeración. De acuerdo con Spencer (2005), para reducir la cantidad de oxígeno y evitar el contacto con alimentos, el oxígeno es eliminado mediante el vacío y/o desplazado mediante un gas inerte, todo ello utilizando un envasado apropiado.

#### IV.3.1.3. Análisis microbiológico

El crecimiento microbiano en los alimentos envasados, especialmente bajo condiciones de aerobiosis, es la principal causa de deterioro en el producto (Spencer, 2005), por ello el recuento de bacterias aeróbicas han sido utilizados como el principal criterio de calidad en muchos estudios de vida útil en alimentos refrigerados (Patsias y col., 2006).

Los recuentos de AM en las muestras *sous vide* BL y BQ fueron de 2,84 y 2,77 log ufc g<sup>-1</sup> respectivamente (**Figura 23**). Estos valores se mantuvieron constantes durante los días de estudio, no mostrándose diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre ambos envasados. La calidad microbiológica con respecto a AM del pescado crudo fue excelente ( $< 2 \log \text{ ufc g}^{-1}$ ). De acuerdo con González-Fandos y col. (2004), los recuentos microbiológicos del pescado crudo, pueden variar en función a las condiciones ambientales del agua y del medio. Sin embargo, la adición de la salsa cruda cuyos ingredientes son vegetales frescos y especias, puede incrementar los recuentos microbiológicos del producto final debido a que algunas especias y vegetales han sido confirmados como fuentes potenciales de esporas, contaminando por tanto, los alimentos procesados. La temperatura de cocinado durante el tiempo establecido, no eliminó la carga microbiana total del producto, pero los recuentos se mantuvieron constantes durante el periodo de almacenamiento principalmente debido a las condiciones de temperatura de refrigeración, envase y pH, todo lo cual influyó positivamente extendiendo la vida útil del producto y previniendo el deterioro.



**Figura 23.** Recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos (log ufc g<sup>-1</sup>) en ambos envasados (BL y BQ) durante el periodo de almacenamiento en refrigeración.

La calidad microbiológica de ambos tipos de productos al final del almacenamiento (62) fue similar a la obtenida en el día inicial.

No hubo presencia de EN, AP, BAL y ML en las muestras *sous vide* estudiadas (BL y BQ). De acuerdo con Díaz y col. (2010), ambos sistemas de envasado, bolsa y barqueta, fueron igualmente efectivos en la inhibición de los principales microorganismos responsables del deterioro y de EN. Además, estos autores obtuvieron bajos recuentos de aerobios psicrótrofos y mohos y levaduras en las muestras *sous vide* en el último día de almacenamiento. De acuerdo con Shakila y col. (2012), en pescado *sous vide* al curry, no se detectó crecimiento de aerobios mesófilos, *Salmonella* y bacterias ácido lácticas. Los autores afirmaron que el producto con un pH ácido no permitió el crecimiento de bacterias lácticas debido a la presencia de ingredientes especiados los cuales retardaron el crecimiento. Contrariamente a Bergslien (1996) que obtuvo altos valores de aerobios mesófilos (5 ufc g<sup>-1</sup>), después de 7 días, en salmón cocinado *sous vide* a 65 °C durante 10 min.

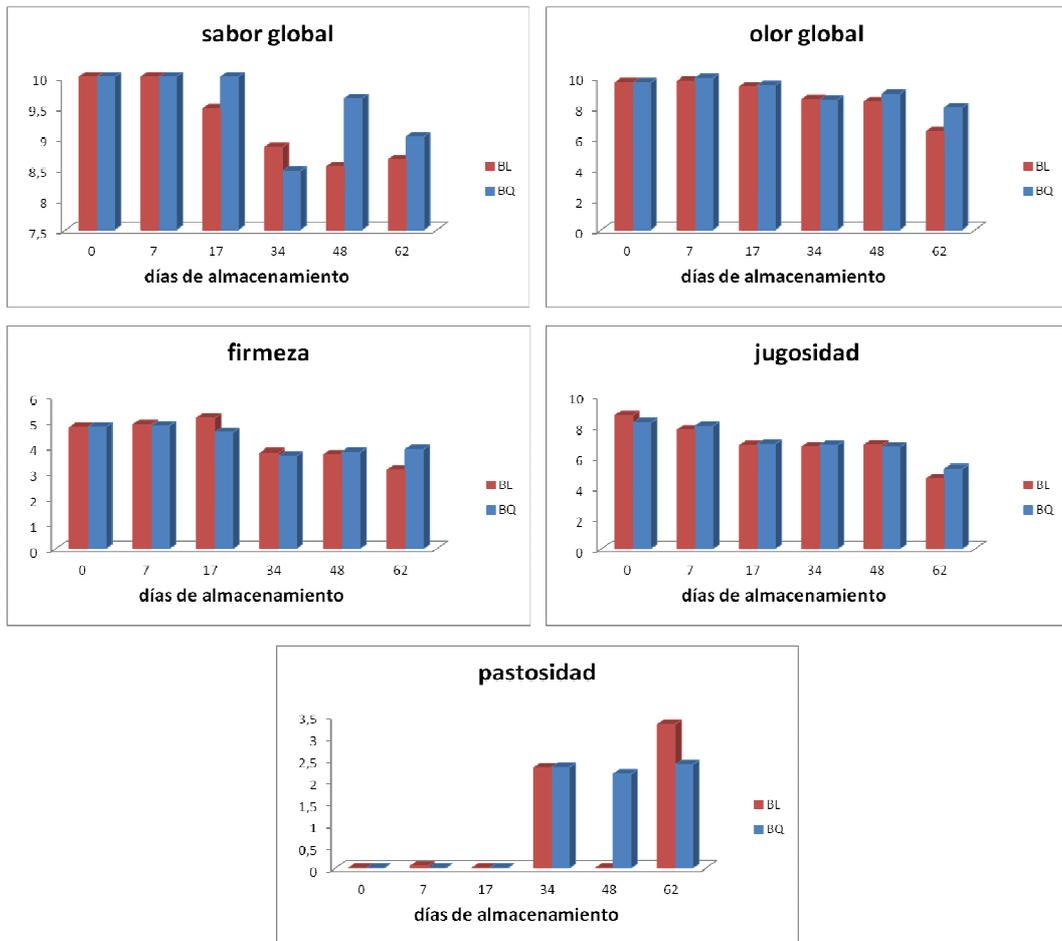
*Salmonella* y *Listeria monocitogenes* son microorganismos patógenos que pueden crecer en platos preparados. En el presente estudio, no se encontraron en ninguno de los envasados ensayados (BL y BQ). Estos resultados coinciden con otros estudios de pescado cocinado *sous vide* (González-Fandos y col., 2004, 2005; Díaz y col., 2011). Al-Nabulsi y col., (2014) observaron que el ácido acético resultó un fuerte

inhibidor y añadido en los alimentos listos para consumir inhibieron el crecimiento de *Salmonella Typhimurium*. También, González y col. (2013) concluyeron la baja prevalencia y los bajos valores de *Listeria monocytogenes* en productos marinos estudiados, sin embargo subrayar la importancia de la manipulación de los productos así como las temperaturas de almacenamiento de los alimentos.

Por tanto, ambos sistemas de envasado BL y BQ, mantuvieron durante todo el periodo de almacenamiento, una correcta calidad microbiológica del producto *sous vide* de acuerdo a lo establecido dentro del Real Decreto Español 3484/2000.

#### **IV.3.1.4. Análisis sensorial**

Todos los atributos evaluados en los platos *sous vide* de dorada se representan en la **Figura 24**.



**Figura 24.** Representación gráfica de las puntuaciones obtenidas en los atributos: olor global (OG), sabor global (SG), firmeza (F), jugosidad (J) y pastosidad (P) en dorada cocinada *sous vide* en los envasados bolsa (BL) y barqueta (BQ) durante el tiempo de almacenamiento.

Los atributos de olor global (OG) y sabor global (SG) fueron definidos por los panelistas como olores y sabores característicos del plato en su conjunto. Los ingredientes usados en la preparación de la salsa (ácido acético, ajo y albahaca) destacaron por sus propiedades aromáticas. La puntuación obtenida en el día inicial en OG y SG en las muestras estudiadas (BL y BQ), resultó ser el mismo para ambos, 10,0 y 9,64 respectivamente. Los panelistas percibieron los olores y sabores por igual, no encontrando diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Se observó una puntuación alta en SG en todos los días, sin embargo, el atributo SG experimentó una pérdida de 3,2 y 1,67 puntos en BL y BQ, respectivamente en el último día de almacenamiento con respecto al día inicial. Este descenso significativo ( $P < 0,001$ ) demostró una mayor estabilidad del sabor en las muestras BQ.

Díaz y col. (2010) no detectaron olores ácidos o pútridos, ni otros sabores consecuencia del deterioro microbiano en el análisis sensorial de carne con salsa, si bien se apreciaron un importante descenso durante el almacenamiento, especialmente en el sabor. Coincidiendo con estos autores, en las muestras del presente ensayo (BL y BQ), prácticamente no se detectaron los atributos otros olores (OO) y otros sabores (OS) durante todo el periodo de almacenamiento, posiblemente debido al empleo en la salsa de ajo y el vinagre con sabores y olores dominantes. De acuerdo con Topuz y col. (2014), la salsa tiene la habilidad de mantener los atributos sensoriales y extender la vida útil del producto.

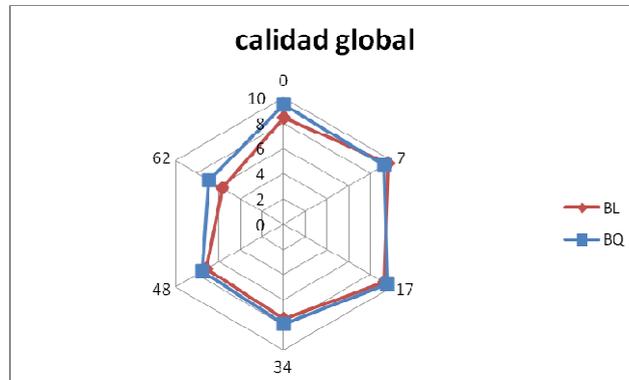
Jugosidad, firmeza y pastosidad son atributos que han demostrado ser importantes en la evaluación global de los platos listos para consumir, especialmente en pescado cocinado, donde la textura puede verse modificada por varias razones.

Inicialmente, los panelistas describieron la dorada *sous vide* con alta jugosidad, firmeza media y sin pastosidad. Estos atributos relativos a la textura del pescado, mostraron resultados similares en ambos tipos de envasado en el día inicial de estudio. Así, la puntuación de jugosidad fue de 8,72 (BL) y 8.25 (BQ).

El cocinado en el mismo envase, permite retener todos los jugos del pescado en el interior. Además, la salsa contribuye de manera favorable a incrementar este atributo. Los valores de firmeza fueron 4,77 y 4,78 en BL y BQ, respectivamente. Esta firmeza decreció ligeramente durante el almacenamiento hasta el día 62 con valores de 3,10

(BL) y 3,90 (BQ) mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Por lo que respecta la pastosidad, atributo negativo, esta se incrementó conforme aumentó el tiempo de almacenamiento de manera significativa en ambos tipos de envase, siendo ligeramente superior en muestras BL al final del almacenamiento.

La **Figura 25** muestra las puntuaciones medias para el atributo de calidad global (CG) en muestras BL y BQ. Inicialmente, las muestras BL y BQ recibieron puntuaciones muy similares para este atributo. Durante el almacenamiento, las puntuaciones de CG experimentaron un descenso. En el último día de almacenamiento, las muestras BQ mostraron una mayor puntuación (6,93), frente a muestras BL (5,68), siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ). Díaz y col. (2010) mostraron resultados similares, no encontrando diferencias sensoriales en el producto recién cocinado entre ambos tipos de envasado, bolsa y barqueta. El tratamiento *sous vide* proporcionó una alta calidad sensorial del producto la cual fue estable durante el almacenamiento comparado con otros procesos de cocinado más convencionales (Jang y Lee, 2005).



**Figura 25.** Representación radial de la calidad global (CG) en el producto *sous vide* en dos tipos de envasados estudiados: bolsa (BL) y barqueta (BQ) en los días de almacenamiento.

La **Tabla 19** muestra las correlaciones entre los atributos estudiados (OG, SG, J, F y P) con la CG en ambos tipos de envasado. El atributo SG fue el que mostró una mayor correlación con la calidad global seguido del atributo OG.

**Tabla 19.** Correlaciones positivas entre los atributos sensoriales y la calidad global (CG).

Atributos	Envasado			
	BL		BQ	
<b>OG</b>	0,604	**	0,545	**
<b>SG</b>	0,797	**	0,731	**
<b>J</b>	0,565	**	0,522	**
<b>F</b>	0,565	**	0,426	**

**BL:** bolsa; **BQ:** barqueta.

**OG:** Olor Global; **SG:** Sabor Global; **J:** Jugosidad; **F:** firmeza.

\*\* P < 0,01.

La ausencia de oxígeno en ambos tipos de envasado impidió la degradación de los atributos sensoriales. De acuerdo con Spencer (2005), el oxígeno cataliza la degradación oxidativa de los alimentos, particularmente los sabores, aromas y componentes responsables del color. Por lo tanto, y coincidiendo con Jang y Lee (2005), el método de cocinado *sous vide* ofrece conveniencia y estabilidad en el almacenamiento. Por otro lado, el ICMSF (2002) indicó que la fecha de caducidad de estos productos está asegurada utilizando una combinación de factores como son el almacenamiento en refrigeración, formulación del producto (pH,  $a_w$ , conservantes, etc.) y el tratamiento del calor. Cuando los parámetros químicos y microbiológicos son correctos, la vida útil del producto puede ser establecida de acuerdo al deterioro sensorial.

El cocinado *sous vide* de dorada envasada en bolsa y barqueta proporcionó una calidad inicial similar en ambos casos. Durante el almacenamiento refrigerado, ambos tipos de envasados retrasaron por igual el deterioro físico-químico y microbiológico, asegurando una óptima calidad sensorial hasta un máximo de 62 días. Si a todo esto, sumamos una la mayor comodidad para la regeneración, el envasado en barquetas resulta más atractivo para el consumidor.



## **CAPITULO V. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA Y SENSORIAL DE UN PLATO DE DORADA COCINADO *SOUS VIDE*.**

### **V.1. OBJETIVOS**

Evaluar el efecto de las altas presiones en un plato “listo para consumir” de dorada (*Sparus aurata*) cocinado mediante tecnología *sous vide*, sobre la calidad microbiológica, físico-química y sensorial del producto y prolongar así su vida útil.

### **V.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **V.2.1. Muestras de pescado y elaboración de la salsa**

Las doradas frescas fueron procesadas el mismo día en el que fueron obtenidas procedentes de la industria acuícola. Un total de 53 doradas ( $460 \pm 20$  g), fueron utilizadas en el presente estudio. El sacrificio de los peces tuvo lugar mediante choque térmico (hipotermia) y almacenados en cajas de poliestireno con hielo hasta antes de su posterior procesado. Posteriormente los pescados fueron transportados hasta la empresa local Rational Foods (Cartagena, Spain), donde los peces fueron eviscerados y fileteados en sala refrigerada a 10 °C.

La salsa acompañante del plato “listo para consumir” fue preparada previamente (24 horas antes), en sala refrigerada ( $4 \pm 1$  °C). Los ingredientes de la salsa (aceite de oliva (67.05 %), vinagre blanco (22.35 %), ajo fresco (4.25 %), perejil fresco (3.91 %), pimienta negra (0.06 %), albahaca seca (0.15 %) y sal (2.23 %)) fueron escogidos por sus propiedades antibacterianas y antioxidantes. Todos estos ingredientes fueron picados y homogeneizados en una batidora (Robot 300 Taurus, Oliana, Spain) durante 1 minuto.

### V.2.2. Cocinado *sous vide* (SV) y tratamiento de altas presiones (AP)

Cada plato estaba compuesto por un filete de dorada (150 g) y 100 ml de salsa, envasados en bolsa de poliamida-polipropileno (SACOLIVA S.L., Barcelona, España) con resistencia al calor de -30 °C a 120 °C, permeabilidad al O<sub>2</sub> de 7 cc/m<sup>2</sup> por 24 h a 4 °C/80 % HR y permeabilidad al vapor de agua del 0.8 g/m<sup>2</sup>/24 h, envasados en máquina envasadora a vacío (EGAR 8, Egarvac S.L., Barcelona, España). Posteriormente, los platos fueron cocinados en horno de vapor (Climaplus Combi CPC G, Rational Aktiengesellschaft, Landsberg am Lech, Alemania) a temperatura de 65 °C hasta alcanzar los 60 °C en el centro del producto. El tiempo estimado en la cocción del producto y alcance de dicha temperatura resultó en 46`30 minutos. Después del cocinado *sous vide*, las muestras fueron rápidamente enfriadas a 4 °C durante 45 minutos utilizando un abatidor (Friulinox, Pordedone, Italia). La temperatura del producto fue medida con un termómetro portable T200 (Digitron Instrumentation Ltd., Merd Lane, Hertford, UK).

Las muestras cocinadas eran destinadas al tratamiento de altas presiones. Para ello, se envasaron en cajas de poliestireno con placas de hielo y se transportaron en camión refrigerado hasta el Instituto IRTA (Monells, España). Allí fueron presurizadas de acuerdo con la bibliografía (Matějková y col., 2013; Picouet y col., 2011) a 300 y 600 MPa durante 5 minutos a 5 °C en un sistema de altas presiones industrial (Hyperbaric Wave 6500/120, Burgos, España) (**Figura 26**). Las muestras una vez procesadas fueron devueltas en las mismas condiciones al laboratorio del Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia, dentro de las 24 horas siguientes, en condiciones de refrigeración para su estudio.



**Figura 26.** Equipo NC Hyperbaric Wave 6500/120 en el que se procesaron las muestras.

### **V.2.3. Lotes, condiciones de almacenamiento y análisis**

Tres lotes fueron utilizados en el experimental: muestras cocinadas *sous vide* y no presurizadas fueron utilizadas como control (C) y dos lotes con muestras cocinadas *sous vide* procesadas a dos presiones, 300 MPa (AP300) y 600 MPa (AP600). Cada lote estaba compuesto por 35 muestras de las cuales cinco fueron escogidas para cada día de control: tres muestras para el análisis sensorial, una muestra para el análisis microbiológico y una para el análisis sensorial. Las cinco muestras restantes del total, fueron destinadas para el Análisis de Perfil de Textura en el día inicial de estudio.

Todas las muestras fueron almacenadas en refrigeración ( $2 \pm 1$  °C) en vitrina expositora (Helkama, Finland) con luz (620 lux) reproduciendo condiciones de comercialización. Los análisis microbiológicos, físico-químicos (pH y TBARs) y sensoriales fueron llevados a cabo en los diferentes lotes en los días 0, 7, 17, 34, 48 y 62. El análisis de Perfil de Textura (TPA) únicamente se realizó en el día inicial (día 0). El ensayo se realizó dos veces y todos los análisis fueron realizados por duplicado.

### **V.2.4. Análisis**

#### **V. 2.4.1. Análisis microbiológico**

Inicialmente dos filetes de dorada fueron analizados con el fin de conocer la microbiología inicial del pescado previo a su cocinado. Una muestra de 10 gramos

fueron transferidos asépticamente en bolsa de Stomacher con 90 ml de agua de peptona tamponada (0,1 %) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) obteniendo la dilución inicial 1:10. Se evaluaron los siguientes microorganismos en el análisis microbiológico: Aerobios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EN), *Pseudomonas* spp (PS), *Staphylococcus aureus* (SA) y Coliformes (CO) / *E.coli* (EC).

La calidad microbiológica de la salsa también fue analizada antes de ser cocinada junto al pescado. Para ello se tomaron 10 gramos de muestra de la salsa elaborada y se homogeneizó con 90 ml de agua de peptona (0,1 %) realizándose las diluciones pertinentes. Los microorganismos aerobios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EN), bacterias ácido lácticas (BAL) y coliformes (CO)/ *E.coli* (EC) fueron analizados.

Finalmente, la evaluación de la calidad microbiológica de las muestras ya cocinadas y procesadas (C, AP300 y AP600) se realizó tomando una muestra de 10 g compuesta por filete de dorada (músculo sin piel) y salsa. Las muestras fueron mezcladas con 90 ml de agua de peptona tamponada (0,1 %) en bolsas de Stomacher en condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar (Telstar, Bio-II-A. Tarrasa, España) realizándose las diluciones correspondientes. Los microorganismos analizados fueron: aerobios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EN), bacterias ácido lácticas (LAB), anaerobios psicrótrofos (AP), mohos y levaduras (ML). Además, *Salmonella* (S) y *Listeria monocytogenes* (L) fueron evaluados para asegurar las condiciones higiénicas de los productos.

Todos los microorganismos evaluados así como el material y la metodología empleada se detallan en el apartado 3.4 de Material y Métodos.

#### **V.2.4.2. Análisis físico-químico: pH y TBARs**

El pH de la salsa y del plato *sous vide* así como el análisis de la oxidación lipídica (TBARs) en el pescado, fueron realizados siguiendo la metodología establecida en los apartados 3.2.3 y 3.2.5 respectivamente, del apartado de Material y Métodos.

### V.2.4.3. Análisis de perfil de textura (TPA)

El Análisis de Perfil de Textura de los filetes de dorada cocinados *sous vide* y tratados mediante presurización, fue realizado en el día inicial de estudio, con el fin de observar posibles cambios en los parámetros debido a los tratamientos empleados (**Figura 27**). La metodología empleada fue llevada a cabo siguiendo los pasos que se indican en el apartado 3.2.8 de Material y Métodos.



**Figura 27.** Análisis de Perfil de Textura en filete de dorada cocinado *sous vide* y sometido a tratamiento de altas presiones.

### V. 2.4.4. Análisis sensorial

Las muestras fueron analizadas sensorialmente durante todos los días de estudio (0, 7, 17, 34, 48 y 62 días). Para el análisis se tomaron tres muestras de cada uno de los lotes (C, AP300, AP600) donde una muestra fue destinada para la evaluación de la apariencia global de la salsa, y los otros dos restantes fueron utilizados para la evaluación del sabor, la textura y el olor del producto cocinado.

Cada panelista evaluó dos muestras correspondientes a cada lote y día de control. El contenido de cada porción (filete y salsa) fue colocado en un plato cubierto con film y calentado en microondas durante 2 minutos, hasta alcanzar en el centro del producto 70 °C, medidos con termómetro portable (T200 thermometer). Después de calentar el plato, los filetes fueron cortados en trozos de aproximadamente 55x25 mm y cada uno fue colocado, junto a una cantidad de salsa, en bandejas de aluminio individuales, cubiertas con papel de aluminio, para mantenerlas calientes. Después, los

panelistas evaluaron las muestras codificadas, utilizando una escala no estructurada de 10 cm. En este estudio una puntuación de 5 fue establecido como el valor umbral de aceptación en la calidad global del producto.

Los siguientes atributos fueron evaluados: en la salsa (color), en el plato “listo para consumir” *sous vide* (color del pescado, olor global, otros olores, sabor global, otros sabores); para la textura del pescado (jugosidad, firmeza y pastosidad). Finalmente, todos los panelistas puntuaron cada plato otorgando un valor en relación a la calidad global del plato. Cada atributo se encuentra descrito en la **Tabla 6** del apartado 3.5.2. de Material y Métodos.

#### **V.2.4.5. Análisis estadístico**

Las diferencias observadas en el plato de dorada cocinada *sous vide* así como el efecto del tratamiento de las altas presiones y el tiempo de almacenamiento del producto, fue tratado estadísticamente mediante programa estadístico SPSS 15.0 tal y como indica el apartado 3.6 de Material y Métodos.

### **V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **V.3.1. Análisis microbiológico**

Los recuentos iniciales de AM en los filetes de dorada crudos, resultaron bajos ( $< 2 \log \text{ufc g}^{-1}$ ) coincidiendo los obtenidos por Erkan y Üretener (2010), y distintos a los de Tsironi y Taoukis (2011). El resto de microorganismos analizados (EN, PS, SA y CO/EC), estuvieron por debajo del nivel de detección ( $< 1 \log \text{ufc g}^{-1}$ ) (datos no mostrados). Los resultados obtenidos reflejan el alto grado de frescura que presentaba la materia prima, además de la correcta manipulación durante las prácticas de eviscerado y fileteado.

Los recuentos analizados de EN, BAL, CO y EC en la salsa, mostraron valores por debajo de  $< 1 \log \text{ufc g}^{-1}$  (datos no mostrados), mientras que sí se obtuvo crecimiento de AM ( $3,24 \log \text{ufc g}^{-1}$ ) (datos no mostrados). Este crecimiento pueden atribuirse a los ingredientes utilizados en la elaboración como son el perejil fresco, cuya

carga microbiana puede depender de diversos factores, los cuales comprenden desde el agua usada en el cultivo como la forma en el que tuvo lugar la cosecha. Para futuras investigaciones en este ámbito, sería interesante y tener en consideración, realizar el pasteurizado en la salsa previa al cocinado *sous vide* con el fin, de reducir la carga microbiana inicial.

Los valores de AM obtenidos en el plato *sous vide* de dorada se mantuvieron constantes en todos los lotes estudiados (C, AP300, AP600) y durante todos los días de estudio. Los resultados estuvieron comprendidos entre valores de 2,84 (día 0) y 2,77 log ufc g<sup>-1</sup> (día 62) para muestras C; 2,69 (día 0) y 2,36 log ufc g<sup>-1</sup> (día 62) para las muestras AP300; y finalmente, 2,81 (día 0) y 2,51 (día 62) log ufc g<sup>-1</sup> para AP600 (datos no mostrados).

Ni el tratamiento de altas presiones ni el tiempo de almacenamiento tuvo efecto significativo ( $P > 0,05$ ) en los recuentos microbianos totales. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por Turkkan y col. (2010) en lubina cocinada en fritura, al horno y microondas y distintos a los obtenidos por Picouet y col. (2011) quienes observaron una reducción en la carga microbiana después del tratamiento de altas presiones (210, 310 y 400 MPa) en salmón cocinado *sous vide*. En el presente estudio, las dos presiones aplicadas (300 y 600 MPa) en plato de dorada *sous vide*, no influyeron en la calidad microbiológica. La temperatura del agua seleccionada como medio de transmisión resultó baja (5 °C) comparado con la escogida por otros autores (Ramaswamy y col., 2008). Sin embargo, ya que el plato *sous vide* del presente estudio fue sometido a un tratamiento térmico previo, se decidió emplear una temperatura suave en el proceso con el objetivo de mantener la calidad sensorial del producto. De acuerdo con nuestros resultados, probablemente el uso de esta temperatura no redujo los recuentos microbianos iniciales de las muestras.

El grupo de microorganismos: EN, ML, BAL y AP, no fueron detectables ( $< 1$  log ufc g<sup>-1</sup>) (datos no mostrados) en las muestras C ni en ninguna de las muestras tratadas (AP300 y AP600) durante el estudio. Los resultados para EN están de acuerdo con los obtenidos por Díaz y col. (2011), donde estos microorganismos aseguran la correcta higiene en los platos “listos para consumir”. Nyati (2000) afirmó que ML pueden crecer en platos cocinados mediante *sous vide* con una extensa vida útil incluso

cuando son almacenados en refrigeración. Resultados que están de acuerdo con los encontrados por Díaz y col. (2011), quienes observaron un incremento de mohos y levaduras en salmón cocinado *sous vide* y almacenado a 2 °C durante 10 semanas. Así mismo, Smelt (1998) afirmó que para la inactivación de ML son necesarias presiones de alrededor 400 MPa. Por tanto, el tratamiento de altas presiones puede actuar ampliando el tiempo de vida útil del producto en conjunto con el tratamiento térmico, resultando en este caso una combinación suficiente para la inhibición del crecimiento de ML.

Aunque las condiciones de microanaerobiosis fueron ideales para el crecimiento de BAL, no se observó crecimiento de estas bacterias en ninguna de las muestras analizadas durante el estudio. Shakila y col. (2012) mostraron resultados similares en pescado al curry cocinado mediante tecnología *sous vide* y almacenado en refrigeración, mientras que Li y col. (2010) afirmaron que la presión aplicada de 600 MPa, resultó suficiente para reducir los recuentos de BAL. Microorganismos AP resultaron ausentes en todas las muestras estudiadas, resultados que coinciden con los obtenidos Díaz y col. (2011) en filetes de salmón cocinados a 80 °C durante 45 minutos. Así mismo, destacó la ausencia de crecimiento de los microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*.

Aunque el tratamiento de altas presiones aplicado no eliminó la carga total microbiana del plato “listo para consumir” *sous vide* de dorada, las muestras AP300 y AP600 cumplieron con valores que se establecen dentro del RD 3484/2000.

### V.3.2. pH y TBARs

Los valores de pH obtenidos en las muestras C, AP300 y AP600 estuvieron comprendidos entre los valores de 4,23-4,93 y 4,80-5,59 para la salsa y el plato *sous vide* de dorada, respectivamente.

La rancidez es una característica organoléptica importante que puede determinar el rechazo o la aceptación del pescado (Montero y col. 2005), siendo la oxidación en el producto un parámetro que puede afectar en los platos de pescado *sous vide* refrigerados (Díaz y col., 2011). El tratamiento de calor puede provocar modificaciones indeseables, como son la oxidación lipídica, desnaturalización de las proteínas y alteración del color

(Özyurt y Özkütük, 2011). Además ciertas reacciones cinéticas pueden resultar aceleradas con la presencia de las altas presiones hidrostáticas e influenciar así en la oxidación lipídica del pescado dando lugar a un efecto pro-oxidante (Montero y col., 2005).

Los valores medios obtenidos de TBARs en las muestras C, AP300 y AP600 se muestran en la **Tabla 20**. No se mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre las muestras C y las tratadas por altas presiones, excepto una pequeña diferencia en el día 17 ( $P < 0,05$ ). Los valores iniciales fueron muy bajos, comprendidos entre 0,03 (C) y 0,05 mg MDA kg<sup>-1</sup> (AP600). Sólo en el final del almacenamiento, hubo un pequeño incremento en los valores ( $P < 0,001$ ) observado en todos los grupos. Erkan y Üretener (2010) obtuvieron resultados similares en los valores de TBARs de filetes de dorada presurizada, los cuales resultaron significativamente más bajos que en las muestras no tratadas.

**Tabla 20.** Valores medios y desviaciones estándar ( $\pm$  SD) de los valores de TBARs (mg MDA kg<sup>-1</sup>) obtenidos en filetes de dorada cocinados *sous vide* (C) y sometidos a altas presiones 300 (AP300) y 600 MPa (AP600) almacenados en refrigeración durante 62 días.

Tratamiento				
Días	C	AP300	AP600	Significancia
0	0,03 $\pm$ 0,03 <sup>y</sup>	0,04 $\pm$ 0,04 <sup>x</sup>	0,05 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup>	NS
7	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>y</sup>	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup>	0,05 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup>	NS
17	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>y,b</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>x,ab</sup>	0,08 $\pm$ 0,03 <sup>x,a</sup>	*
34	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>x</sup>	0,08 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup>	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup>	NS
48	0,12 $\pm$ 0,07 <sup>x</sup>	0,14 $\pm$ 0,03 <sup>x</sup>	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>x</sup>	NS
62	0,21 $\pm$ 0,00 <sup>w</sup>	0,25 $\pm$ 0,10 <sup>w</sup>	0,17 $\pm$ 0,03 <sup>w</sup>	NS
<b>Significancia</b>	***	***	***	

**a,b,c:** Diferentes letras, diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

**w,x,y,z:** Diferentes letras, diferencias estadísticamente significativas entre los días de almacenamiento.

**NS.** no significancia; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Özyurt y Özkütük (2011) indicaron que la oxidación lipídica del producto se incrementó con el tratamiento térmico. Los bajos valores de TBARs obtenidos en el presente estudio, podrían estar relaciones con el envasado a vacío utilizado en el

cocinado *sous vide*. Algunos autores (Díaz y col. 2011) también encontraron que la tecnología *sous vide* inhibe la oxidación lipídica, obteniendo bajos valores en el salmón cocinado mediante *sous vide* y afirmando que el tipo de envasado es un importante factor en el retardo de la oxidación lipídica.

En este sentido, el tratamiento de altas presiones a 300 y 600 MPa en las condiciones usadas, no afectaron la oxidación lipídica del plato “listo para consumir” de dorada *sous vide*. Los bajos valores de TBARs detectados en todos los grupos estudiados (C, AP300 y AP600) confirmaron que el envasado a vacío, retrasó la oxidación lipídica en la dorada.

### V.3.3. Análisis de Perfil de Textura

La textura es considerada uno de los atributos de calidad más importantes en el pescado el cual determina la aceptabilidad del consumidor y por tanto la comercialización del producto (Ashie y Simpson, 1996). Una pérdida de calidad en lo referente a la textura puede ser debido a la actividad enzimática y química. El cocinado *sous vide* inactiva las proteasas y lipasas las cuales son capaces de deteriorar el pescado cocinado, pero la actividad enzimática residual puede continuar durante el almacenamiento en refrigeración (Kim y Park, 2000). Además, el tratamiento de altas presiones afecta la actividad enzimática de las proteínas (principalmente las proteínas miofibrilares), dando lugar a modificaciones estructurales y cambios en la textura (Angsupanich y Ledward, 1998).

Los resultados obtenidos en el Análisis de Perfil de Textura (TPA) en las muestras estudiadas (C, AP300, AP600) en el día inicial 0 se muestran en la **Tabla 21**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) para ninguno de los parámetros de textura estudiados: dureza, gomosidad, adhesividad, cohesividad y masticabilidad. Sin embargo, las muestras tratadas con altas presiones resultaron menos elásticas ( $P < 0,01$ ). Las muestras AP300 y AP600, mostraron valores de elasticidad inferiores (3,22 y 2,87 mm) a las muestras que no fueron presurizadas (C) (4,34 mm). Resultados similares fueron obtenidos por Yi y col. (2013) en muestras de mejillón sin concha cocinadas y tratadas con altas presiones, donde la elasticidad resultó ser significativamente menor que las muestras control cocinadas. Los autores concluyeron

que en las muestras tratadas, el tratamiento de altas presiones indujo cambios en la estructura muscular, reduciendo la capacidad de la proteína muscular para unirse al agua, forzando a ésta para penetrar en el espacio extramiofibrilar. Como consecuencia, el agua resultó más fácil para salir fuera del producto, especialmente después de un tratamiento (ej. cocinado).

**Tabla 21.** Análisis de Perfil de Textura (TPA) obtenido en filetes de dorada cocinados mediante *sous vide* (C) y tratamiento con altas presiones a 300 (AP300) y 600 MPa (AP600) en el día inicial de almacenamiento.

Parámetros (TPA)	C	AP300	AP600	Significancia
<b>Dureza</b>	6,97 ± 0,81	6,66 ± 0,63	7,17 ± 0,74	NS
<b>Gomosidad</b>	2,70 ± 0,79	3,11 ± 0,82	3,41 ± 0,38	NS
<b>Adhesividad</b>	-0,17 ± 0,19	-0,10 ± 0,08	-0,04 ± 0,04	NS
<b>Cohesividad</b>	0,50 ± 0,15	0,53 ± 0,15	0,57 ± 0,11	NS
<b>Masticabilidad</b>	12,30 ± 0,40	10,51 ± 0,27	11,04 ± 0,48	NS
<b>Elasticidad</b>	4,34 ± 0,27 <sup>a</sup>	3,22 ± 0,64 <sup>b</sup>	2,87 ± 0,36 <sup>b</sup>	**

**a,b,c:** Diferentes letras, diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. \*\* P < 0,01.

Sin embargo, otros autores detectaron un incremento en otros parámetros de textura conforme la presión aumentó. Más específicamente, Yagiz y col. (2009) observaron un incremento en la dureza, gomosidad y masticabilidad en salmón atlántico y Bindu y col. (2013) obtuvieron un mayor incremento en la dureza en muestras de *F.indicus* debido al tratamiento de altas presiones.

#### V.3.4. Análisis sensorial

Los resultados basados en el análisis sensorial del plato “listo para consumir” de dorada y procesadas mediante tratamiento de altas presiones se muestran en la **Tabla 22**.

El color verde dorado de la salsa se debe a los ingredientes utilizados en su elaboración (aceite de oliva y perejil). Este color mantuvo su intensidad hasta el día 34 de almacenamiento en todas las muestras estudiadas, a partir de entonces se observó una

pérdida gradual de intensidad, resultando evidente con las puntuaciones recibidas en los días 48 y 62.

El color intrínseco del músculo de la dorada no mostró cambios significativos ( $P > 0,05$ ) en las muestras C ni en ninguno de los tratamientos estudiados (AP300 y AP600), manteniéndose el característico color blanco de la dorada cocinada durante los 62 días de almacenamiento sin ningún tipo de alteración.

En el último día de almacenamiento, el olor global (OG) del plato *sous vide* (ácido acético, ajo y olor especiado) tuvo una alta puntuación en todas las muestras así como durante el tiempo de almacenamiento. Aunque el olor global registrado en AP300 (6,81) en el último día fue ligeramente más bajo que en las muestras C (8,65) y AP600 (8,03) ( $P < 0,05$ ), no se mostraron razones aparentes para estas diferencias encontradas.

Las altas puntuaciones (9,50-9,68) obtenidas para el sabor global en el día 0 destacaron por la correcta combinación de ingredientes (pescado y salsa) utilizada en el plato *sous vide* “listo para consumir”. En el último día, las muestras AP300 y AP600 obtuvieron una alta puntuación significativa ( $P < 0,001$ ) respecto a las muestras C, lo cual refleja los resultados de Cheftel (1992), quienes mantuvieron que las altas presiones podrían estabilizar la estructura de algunos ingredientes, mejorando la agregación y la retención de aromas y sabores.

El deterioro bacteriano y enzimático en el pescado podría dar lugar a olores y sabores desagradables. El hecho de que los panelistas no detectaron otros olores ni otros sabores en ninguno de los tratamientos confirma los resultados obtenidos en los valores de TBARs y los recuentos microbiológicos. Armstrong y McIlveen (2000) afirmaron que los componentes de la salsa pueden enmascarar los cambios en las características sensoriales de los platos “listos para consumir” de carne.

La textura blanda y gelatinosa del pescado requiere de tratamientos térmicos más suaves para solubilizar el colágeno muscular (35-50 °C) (Roca y Brugués, 2004). Entre los parámetros de textura, la jugosidad puede limitar la aceptabilidad del producto en el consumidor (Hedrick y col., 1994). Inicialmente, el cocinado *sous vide* originó un plato de dorada “listo para consumir” con una alta puntuación en la jugosidad (8,72), lo

cual contrasta con los encontrado por Turkkan y col. (2010), quienes mencionan unos bajos valores en la jugosidad (4,00-4,40) para la lubina cocinada en fritura, al horno y al microondas en el día 0. Dado que las altas temperaturas de cocción pueden influir en este parámetro, parece que el método de cocinado utilizado en el presente estudio (60 °C) resultó adecuado para la obtención de un producto jugoso, aunque se supone que la salsa habría contribuido en este respecto. Las muestras AP300 y AP600, mostraron bajos valores significativos ( $P < 0,001$ ) (7,01 y 6,99) que las muestras C (8,72) en el día 0. De hecho, las muestras AP600 mostraron bajos valores en la jugosidad durante el tiempo de almacenamiento, presumiblemente debido a las altas presiones usadas, las cuales podrían favorecer la pérdida de agua retenida en los miotomos del músculo del pescado.

La firmeza en un producto se refiere a su estabilidad y resistencia a la deformación. El tratamiento de altas presiones, el método de cocinado y el envasado a vacío, son factores que en el presente ensayo han sido utilizados y pueden influenciar en dicho parámetro. En el presente estudio, valores por debajo de 5 indicaron una baja firmeza en el producto. En el día 0, este atributo tuvo una alta puntuación ( $P < 0,05$ ) en las muestras de AP600 (6,54) respecto a las muestras C (4,77) y muestras AP300 (5,09).

El tiempo de almacenamiento afectó a la textura de las muestras C. La firmeza decreció conforme aumentó el tiempo de almacenamiento, dando lugar por tanto a una pérdida en la calidad sensorial. Las muestras AP600 obtuvieron una alta puntuación de 6,47 en el día 62, lo cual resultó estadísticamente significativamente ( $P < 0,001$ ) respecto a las puntuaciones correspondientes para las muestras C (3,10) y AP300 (3,43).

Una consecuencia en la pérdida de firmeza de las muestras no presurizadas (C) fue el incremento en la pastosidad a partir del día 34 en adelante. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) respecto a las muestras AP300 y AP600. Cabe destacar que las muestras que fueron presurizadas a 600 MPa, no mostraron pastosidad durante el tiempo de almacenamiento, mostrándose por tanto una buena firmeza en las muestras.

La calidad global (CG) refiere al conjunto de cualidades que hacen que un producto sea aceptable. Los altos valores iniciales en los tres tratamientos (en rango

comprendido entre 8,39 a 9,63) señalaron la alta calidad sensorial en los tres lotes estudiados (C, AP300, AP600). En el día 34, la CG en las muestras C disminuyó debido a la pérdida de firmeza y al aumento en la pastosidad. En los días 34 y 48, la CG en ambos tratamientos (AP300 y AP600) mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) respecto las muestras C, mientras que en el día 62 las puntuaciones otorgadas por los panelistas fueron 8,34, 7,17 y 5,68 para las muestras AP600, AP300 y C respectivamente, de modo que ninguna de las muestras tuvo valores por debajo del umbral establecido de aceptabilidad.

**Tabla 22.** Análisis sensorial del producto *sous vide* (C) y del tratado por altas presiones (AP300, AP600) almacenado a  $2 \pm 1$  °C durante 62 días (continua)

Días	Tratamiento	ATRIBUTOS				
		Color salsa	Color pescado	Olor global	Otros olores	Otros sabores
0	C	5,15 ± 0,19 <sup>wx,a</sup>	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00 <sup>w,a</sup>	0,00 ± 0,00	9,64 ± 0,63 <sup>w</sup>
	AP300	4,95 ± 0,17 <sup>xy,b</sup>	10,00 ± 0,00	9,50 ± 0,58 <sup>w,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,50 ± 0,69 <sup>wx</sup>
	AP600	4,70 ± 0,26 <sup>x,c</sup>	10,00 ± 0,00	9,86 ± 0,37 <sup>w,a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,68 ± 0,58 <sup>w</sup>
	Significancia	***	NS	***	NS	NS
7	C	4,19 ± 0,97 <sup>xy,b</sup>	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00 <sup>w,a</sup>	0,00 ± 0,00	9,73 ± 0,48 <sup>w,b</sup>
	AP300	4,50 ± 0,61 <sup>y,b</sup>	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00 <sup>w,a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	10,00 ± 0,00 <sup>w,a</sup>
	AP600	5,32 ± 0,37 <sup>w,a</sup>	10,00 ± 0,00	9,82 ± 0,38 <sup>wx,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	10,00 ± 0,00 <sup>w,a</sup>
	Significancia	***	NS	**	NS	***
17	C	4,04 ± 0,95 <sup>yz</sup>	10,00 ± 0,00	9,48 ± 0,49 <sup>x,ab</sup>	0,00 ± 0,00	9,37 ± 0,57 <sup>w</sup>
	AP300	4,75 ± 0,62 <sup>xy,b</sup>	9,95 ± 0,12	9,63 ± 0,40 <sup>w,a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,43 ± 0,67 <sup>wx</sup>
	AP600	5,62 ± 0,55 <sup>w,a</sup>	10,00 ± 0,00	9,23 ± 0,72 <sup>xy,b</sup>	0,08 ± 0,29 <sup>x</sup>	8,96 ± 0,71 <sup>x</sup>
	Significancia	***	NS	NS	NS	*
34	C	4,95 ± 0,29 <sup>wx,ab</sup>	10,00 ± 0,00	8,85 ± 0,75 <sup>y</sup>	0,09 ± 0,29	8,54 ± 0,52 <sup>x</sup>
	AP300	5,03 ± 0,29 <sup>xy,a</sup>	10,00 ± 0,00	8,60 ± 0,78 <sup>x</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	8,95 ± 0,68 <sup>x</sup>
	AP600	4,63 ± 0,48 <sup>xy,b</sup>	10,00 ± 0,00	8,73 ± 0,63 <sup>x</sup>	0,03 ± 0,14 <sup>x</sup>	8,68 ± 0,81 <sup>x</sup>
	Significancia	NS	NS	NS	NS	NS
48	C	3,65 ± 0,24 <sup>y,z</sup>	10,00 ± 0,00	8,53 ± 0,32 <sup>y,a</sup>	0,00 ± 0,00	8,39 ± 0,41 <sup>x,b</sup>
	AP300	4,11 ± 0,12 <sup>x,a</sup>	10,00 ± 0,00	8,49 ± 0,53 <sup>x,a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,48 ± 0,65 <sup>wx,a</sup>
	AP600	4,10 ± 0,20 <sup>y,b</sup>	10,00 ± 0,00	7,95 ± 0,37 <sup>z,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	8,77 ± 0,24 <sup>x,b</sup>
	Significancia	***	NS	**	NS	*
62	C	3,23 ± 0,23 <sup>z,b</sup>	10,00 ± 0,00	8,65 ± 0,52 <sup>y,a</sup>	0,08 ± 0,26 <sup>b</sup>	6,44 ± 0,65 <sup>y,b</sup>
	AP300	3,01 ± 0,26 <sup>w,a</sup>	10,00 ± 0,00	6,81 ± 0,64 <sup>y,c</sup>	0,26 ± 0,47 <sup>w,ab</sup>	8,15 ± 0,61 <sup>y,a</sup>
	AP600	3,20 ± 0,21 <sup>z,b</sup>	10,00 ± 0,00	8,03 ± 0,68 <sup>z,b</sup>	0,62 ± 0,65 <sup>w,a</sup>	8,73 ± 0,57 <sup>x,a</sup>
	Significancia	***	NS	*	*	***
Significancia C		***	NS	***	NS	***
Significancia AP300		***	NS	***	***	***
Significancia AP600		***	NS	***	***	***

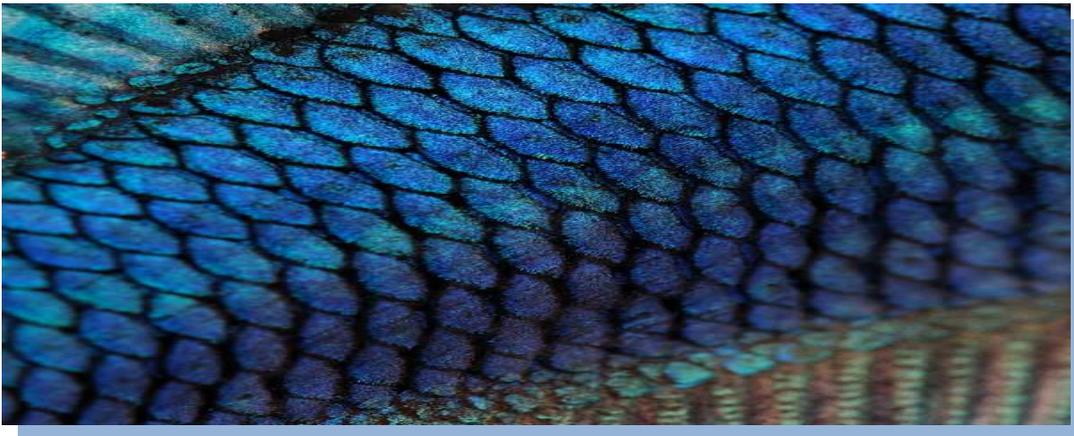
Días	Tratamiento	ATRIBUTOS				
		Otros sabores	Jugosidad	Firmeza	Pastosidad	Calidad global
0	C	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	8,72 ± 0,34 <sup>w,a</sup>	4,77 ± 0,29 <sup>w,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	8,39 ± 0,43 <sup>x,b</sup>
	AP300	0,00 ± 0,00	7,01 ± 0,62 <sup>w,b</sup>	5,09 ± 0,35 <sup>wxy,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,63 ± 0,67 <sup>wx,a</sup>
	AP600	0,00 ± 0,00	6,99 ± 0,34 <sup>wxy,b</sup>	6,54 ± 0,65 <sup>wx,a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,42 ± 0,50 <sup>w,a</sup>
	Significancia	NS	***	***	NS	*
7	C	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	7,78 ± 0,94 <sup>x,a</sup>	4,89 ± 0,89 <sup>w,b</sup>	0,05 ± 0,13 <sup>s</sup>	9,61 ± 0,62 <sup>w,a</sup>
	AP300	0,00 ± 0,00	7,45 ± 0,39 <sup>w,a</sup>	5,29 ± 0,59 <sup>wx,b</sup>	0,22 ± 0,39 <sup>wx</sup>	9,89 ± 0,29 <sup>w,a</sup>
	AP600	0,00 ± 0,00	6,55 ± 0,57 <sup>w,b</sup>	6,05 ± 0,65 <sup>xy,a</sup>	0,08 ± 0,22 <sup>x</sup>	9,04 ± 0,60 <sup>w,b</sup>
	Significancia	NS	***	***	NS	***
17	C	0,08 ± 0,29 <sup>x</sup>	6,76 ± 0,67 <sup>y,a</sup>	5,13 ± 0,71 <sup>w,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,23 ± 0,53 <sup>w</sup>
	AP300	0,00 ± 0,00	6,75 ± 0,75 <sup>w,a</sup>	4,72 ± 0,48 <sup>xy,b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	9,35 ± 0,73 <sup>wx</sup>
	AP600	0,00 ± 0,00	6,17 ± 0,55 <sup>wx,b</sup>	5,85 ± 0,58 <sup>y,a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	8,95 ± 0,73 <sup>wx</sup>
	Significancia	NS	**	***	NS	NS
34	C	0,03 ± 0,16 <sup>x</sup>	6,67 ± 0,49 <sup>y,a</sup>	3,77 ± 0,52 <sup>x,c</sup>	2,31 ± 0,71 <sup>a,w</sup>	7,52 ± 0,55 <sup>x,b</sup>
	AP300	0,00 ± 0,00	6,93 ± 0,48 <sup>w,a</sup>	4,47 ± 0,51 <sup>y,b</sup>	0,33 ± 0,50 <sup>w,b</sup>	8,56 ± 0,68 <sup>y,a</sup>
	AP600	0,00 ± 0,00	5,62 ± 0,78 <sup>xyz,b</sup>	6,98 ± 0,49 <sup>w,a</sup>	0,52 ± 0,58 <sup>w,b</sup>	8,15 ± 0,56 <sup>y,a</sup>
	Significancia	NS	***	***	***	***
48	C	0,00 ± 0,00 <sup>x</sup>	6,80 ± 0,58 <sup>y,a</sup>	3,70 ± 0,51 <sup>xy,c</sup>	1,94 ± 0,61 <sup>w,a</sup>	7,15 ± 0,30 <sup>y,c</sup>
	AP300	0,00 ± 0,00	5,17 ± 0,75 <sup>x,b</sup>	5,52 ± 0,61 <sup>w,b</sup>	0,08 ± 0,29 <sup>wx,b</sup>	8,20 ± 0,68 <sup>xy,a</sup>
	AP600	0,00 ± 0,00	4,46 ± 0,50 <sup>z,c</sup>	6,92 ± 0,20 <sup>w,a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>x,b</sup>	8,18 ± 0,51 <sup>y,a</sup>
	Significancia	NS	***	***	***	***
62	C	0,52 ± 0,71 <sup>w,a</sup>	4,58 ± 0,46 <sup>z,b</sup>	3,10 ± 0,54 <sup>b,z</sup>	3,30 ± 0,29 <sup>w,a</sup>	5,68 ± 0,62 <sup>z,c</sup>
	AP300	0,08 ± 0,30 <sup>1,b</sup>	5,52 ± 0,44 <sup>x,a</sup>	3,43 ± 0,56 <sup>z,b</sup>	1,03 ± 0,43 <sup>wx,b</sup>	7,17 ± 0,31 <sup>z,b</sup>
	AP600	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,90 ± 0,62 <sup>yz,b</sup>	6,47 ± 0,61 <sup>wxy,a</sup>	0,12 ± 0,29 <sup>x,b</sup>	8,34 ± 0,49 <sup>xy,a</sup>
	Significancia	*	**	***	***	***
Significancia C		***	***	***	***	***
Significancia AP300		NS	***	***	**	***
Significancia AP600		NS	***	***	***	***

a,b,c: Diferentes letras, diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. w,x,y,z: Diferentes letras, diferencias estadísticamente significativas entre día de almacenamiento. NS. no significancia; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.





## *CONCLUSIONES*





## 5. CONCLUSIONES

*Primera:* El empleo de ozono a concentraciones inferiores a  $0,75 \text{ mg.l}^{-1}$  es eficaz para asegurar la calidad microbiológica del agua utilizada en la industria pesquera, sin embargo, es insuficiente para reducir la carga microbiana de filetes de dorada sometidos a inmersión en agua ozonizada.

*Segunda:* El envasado a vacío retrasa el deterioro físico-químico, microbiológico y sensorial de filetes frescos de dorada almacenados a  $3^{\circ}\text{C}$ , ampliando la vida útil en 4 días con respecto al envasado en atmósfera modificada (40%  $\text{CO}_2$ , 30%  $\text{N}_2$  y 30%  $\text{O}_2$ ).

*Tercera:* El cocinado *sous vide* de filetes de dorada acompañados de una salsa de bajo pH y con ingredientes con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, permiten desarrollar un plato preparado con una alta calidad sensorial y con una vida útil superior a 60 días. De esta forma, es posible responder a las necesidades de diversificación del sector de la acuicultura y a su vez, ampliar la oferta de productos en el sector de los platos preparados.

*Cuarta:* El cocinado *sous vide* de filetes de dorada envasados en barquetas plásticas con una atmósfera modificada tiene un efecto similar sobre el deterioro físico-químico, microbiológico y sensorial que el envasado clásico en bolsas a vacío. Este hecho abre nuevas perspectivas en el empleo de envases más resistentes, prácticos y con una mayor aceptación por parte del consumidor.

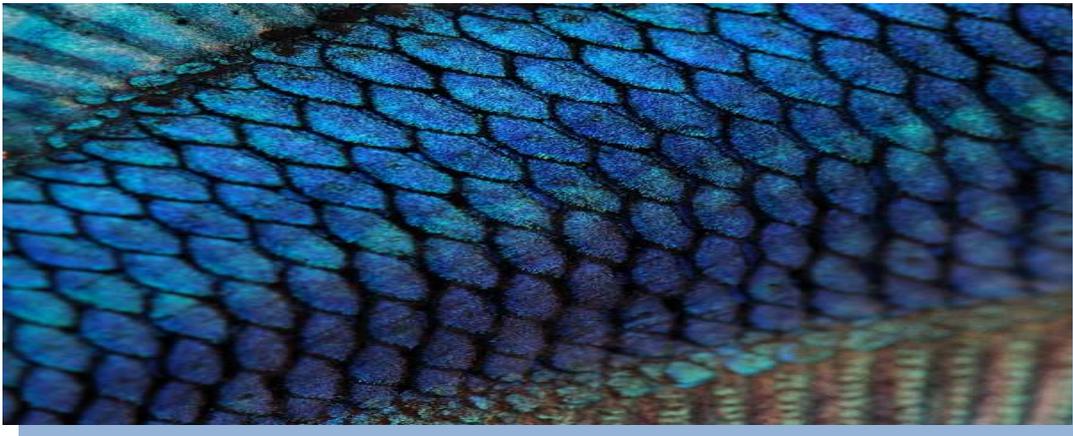
*Quinta:* El tratamiento con presiones inferiores a 600 MPa durante 5 min y una temperatura controlada de  $5^{\circ}\text{C}$  no es capaz de reducir la carga microbiana de filetes de dorada cocinados *sous vide*, sin embargo, producen una modificación en la textura que evita la pérdida de firmeza, principal causa de deterioro sensorial de filetes de dorada no sometidos a tratamientos de altas presiones.

*Sexta:* La acuicultura marina ha crecido de manera significativa en los últimos años y contribuye a satisfacer la demanda de pescado. Sin embargo este sector debe dar respuesta a las necesidades y demandas del consumidor y para ello se hace necesaria la diversificación a través de nuevos formatos, presentaciones, envasado, platos preparados, etc. que faciliten el consumo de pescado. Por ello es imprescindible para el sector, continuar desarrollando tareas de investigación en este sentido.





## *REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*





## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### A

- Adams, M.R., Moss, M.O. (1997). Agentes bacterianos de enfermedad transmitida por alimentos: Salmonella. En: Microbiología de los alimentos. Pp. 241-254. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Al-Nabulsi, A.A., Olaimat, A.N., Osaili, T.M., Shaker, R.R., Elabedeena, N.Z., Jaradat, Z.W., Abushelaibi, A., Holley, R.A. (2014). Use of acetic and citric acids to control Salmonella Typhimurium in tahini (sesame paste). *Food Microbiology*, 42: 102-108.
- Álvarez, V., Feás, X., Barros-Velázquez, J., Aubourg, S.P. (2009). Quality changes of farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) subjected to slaughtering and storage under flow ice and ozonised flow ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 1561-1571.
- Álvarez, A., García-García, B., Jordán, M.J., Martínez-Conesa, C., Hernández, M.D. (2012). The effect of diets supplemented with thyme essential oil and Rosemary extract on the deterioration of farmed seabream (*Sparus Aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*, 132: 1395-1405.
- Aparicio Peña, C. (2009). Tesis Doctoral. Determinación de Propiedades Termodinámicas y Acústicas a Alta Presión (desde 0.1 hasta 350 Mpa) en Líquidos. Aplicación a la Industria Alimentaria. URL: [http://www.mat.ucm.es/momat/Tesis\\_C\\_aparicio.pdf](http://www.mat.ucm.es/momat/Tesis_C_aparicio.pdf).
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España). (2004). La acuicultura marina de peces en España. URL: <http://www.apromar.es/Informes/Informe%20APROMAR%202004.pdf>.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España). (2006). La acuicultura marina de peces en España. URL: <http://www.apromar.es/Informes/Informe%20APROMAR%202006.pdf>.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España). (2012a). La acuicultura marina es España. URL: <http://www.apromar.es/Informes/informe%202012/APROMAR%20Informe%20Anual%202012.pdf>.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España). (2012b). Interacciones entre la acuicultura y el medio ambiente. <http://www.apromar.es/noticias/general/UICN-SGPM-FEAP%20Guia-1.pdf>.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España). (2013). La Acuicultura en España. <http://www.apromar.es/content/la-acuicultura-en-espaa%C3%B1a-2013>.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España). (2014). La Acuicultura en España. <http://www.apromar.es/content/la-acuicultura-en-espaa%C3%B1a-2014>.
- Angsupanich, K., Ledward, D.A. (1998). High-pressure treatments effects of cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chemistry*, 63: 39-50.

- Armstrong, G.A., McIlveen, H. (2000). Effects of prolonged storage on the sensory quality and consumer acceptance of *sous vide* meat-based recipe dishes. *Food Quality and Preference*, 11: 377-385.
- Ashie, I.N.A., Simpson, B.K. (1996). Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. *Food Research International*, 29: 569-575.
- Aubourg, S.P. (1999). Efecto de las alteraciones lipídicas sobre la calidad del pescado procesado. *Grasas y Aceites*. Vol. 50. Fase. 3, 218-224.
- Ayala, M.D., Abdel, I., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M.J., Gil, F., Blanco, A., y López Albors, O. (2010). Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 465-475.

## B

- Baldwin, D.E. (2012). *Sous vide* cooking: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1: 15-30.
- Banks, H., Nickelson, R., Finne, G. (1980). Shelf life studies on carbon dioxide packaged finfish from the Gulf of Mexico. *Journal of Food Science*. 45: 157-162.
- Batt, C.A. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. ISBN: 978-0-12-384733-1.
- Bergslien, H. (1996). *Sous vide* treatment of salmon (salmon salar). Proceedings of the Second European Symposium on Sous Vide. Leuven: Alma Sous Vide Competence Centre. p 281-92.
- Bindu, J., Ginson, J., Kamalakanth, C.K., Asha, K.K., Srinivasa Gopal, T.K. (2013). Physico-chemical changes in high pressure treated Indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 17: 37-42.
- Bono, G., Badalucco, C. (2012). Combining ozone and modified atmosphere packaging (MAP) to maximize shelf-life and quality of striped red mullet (*Mullus surmuletus*). *LWT- Food Science and Technology*, 47: 500-504.
- Boskou, D., Visioli F. (2003). Biophenols in olive oil and olives. *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds*. In book: *Bioavailability of Micronutrients and Minor Dietary compounds*, Edition: 1st, Publisher: Research Signpost, Editors: M.Pilar Vaquero, pp.161-169.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., Trakatellis, A.G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 42: 1931-1937.
- Bourne, M.C. (1978). *Food texture and viscosity: Concept and measurement*. Academic Press., New York.
- Brody, A. (2003). Packaging of foods. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1611-1623.

Butz, P., Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35: 279-284.

## C

Cakli, S, Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18: 391-397.

Carlin, F. (1999). Microbiology of *sous vide*. Encyclopedia of Food Microbiology, 1338-1344.

Castro, P., Penedo, J.C., Caballero, M.J., Sanjuán, E., Millán, R. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, 17: 245-248.

Chawla, A.; Bell, J. W. Marlene, E. J. (2007). Optimization of Ozonated Water Treatment of Wild-Caught and Mechanically Peeled Shrimp Meat, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 16 (2): 41-56.

Cheftel, J.C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure of food constituents- An overview. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, & P.Masson (Eds.), *High pressure and biotechnology* (Vol. 224, p. 195). Coll. INSERM Paris.

Cheftel, J.C. (1995). Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science Technology International*. 1: 75-90.

Cheftel, J., Cheftel, H. (1976). Introducción a la Biología y Tecnología de alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza.

Church, I.J., Parsons, A.L. (2000). The sensory quality of chicken and potato products prepared using cook- chill and sous vide methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 35: 155-162.

Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Panagiotakis, N., Kontominas, M.G. (2004). Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus Aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemicals and sensory attributes. *Food Microbiology*, 21: 351-359.

REGLAMENTO (CE) No 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) no 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios

Conell, J.J. (1995). Control of Fish Quality, 4th ed. Fishing News Books Limited, London.

Cosansu, S., Mol, S., Alakavuk, D.U., Ozturan, S. (2013). The effect of lemon juice on shelf life of sous vide packaged Whiting (*Merlangius merlangus euxinus*, Nordmann, 1840). *Food Bioprocess Technology*, 6: 283-289.

Creed, P. G. (2001). The potential of foodservice systems for satisfying consumer needs. *Innovative Food Service & Emerging Technologies*, 2: 219-277.

Crowe, K. M., Skonberg, D., Bushway, A., Baxter, S. (2012). Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets. *Food Control*, 25 (2): 464-468.

**D**

- Dalgaard P. (2003). Fish, Spoilage of Seafood. En: Encyclopaedia of Food Science and Nutrition. Elsevier Science.
- Da Silva, M.V., Gibbs, P.A., Kirby, R.M. (1998). Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). *Journal of Applied Microbiology*, 84: 802-810.
- Dávalos, A., Bartolome, B., Gomez-Cordoves, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93:325-330.
- Delacour, H., Cléry, C., Masson, P., Vidal, D.R. (2002). Inactivation des spores bactériennes par les hautes presiones hydrostatiques. *Ann Pharm Fr* 60: 38-43.
- Díaz Molins, P. (2009). Tesis Doctoral: Calidad y deterioro de platos “*sous vide*” preparados a base de carne y pescado y almacenados en refrigeración. URL: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/11065/DiazMolins.pdf?sequence=1>.
- Díaz, P, Garrido, M.D, Bañón S. (2010). The effects of packaging method (vacuum pouch vs. plastic tray) on spoilage in a cook-chill pork-based dish kept under refrigeration. *Meat Science*, 84:538-544.
- Díaz, P., Garrido, M.D., Bañón, S. (2011). Spoilage of *sous vide* cooked salmon (Salmon salar) stored under refrigeration. *Food Science and Technology International*, 17: 31-37.
- Doyle, E. (2002). Survival and growth of *Clostridium perfringens* during the cooling step in thermal processing of meat products: a review. *Food Research Institute*, University of Wisconsin, United States. <<http://www.wisc.edu/fri/briefs/cperfsurvivgrow.pdf>>

**E**

- Erkan, N., Üretener, G. (2010). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological, chemical and sensory quality of fresh gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *European Food Research and Technology*, 230, 533-542.

**F**

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2004). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. URL: <http://www.fao.org/docrep/007/y5600s/y5600s00.htm>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2010). Programa de información de especies acuáticas. *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). URL: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus\\_aurata/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es).
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. URL: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>.
- Fagan, J.D, Gormley, T.R. (2005). Effect of *sous vide* cooking, with freezing, on selected quality parameters of seven fish species in a range of sauces. *European Food Research Technology*, 220: 299-304.

- Farber, J.M., Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55 (3): 476-511.
- Farkas, D.F., Hoover, DG. (2011). High Pressure Processing. *Journal Food Science*, Supplement, 47-64.
- Fawell, J. (2000). Risk assessment case study-chloroform and related substances. *Food and Chemical Toxicology*, 38, S91-S95.
- Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2: 1651-1660.
- Feng, L., Jiang, T., Wang, Y., Li, J. (2012). Effects of tea polyphenol coating combined with ozone water washing on the storage quality of black sea bream (*Sparus macrocephalus*). *Food Chemistry*, 135, 2915-2921.
- Fukunaga, K., Suzuki, T., Takama, K. (1991). Effect of ozone exposure on the compositions of gill and erythrocyte membrane lipids and proteins of Japanese charr (*Salvelinus leucomaenis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 100: 481-487.

## G

- Garcia Iglesias, E., Gago Cabezas, L., Fernández Nuevo, J.L. (2006). Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. URL: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/UM/Mis%20documentos/Downloads/BVCM001697.pdf>
- Garriga, M., Grébol, N., Aymerich, M.T., Mont-fort, J.M., Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high pressure processing at 600 MPa in comercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5: 451-457.
- Gelman, A., Sachs, O., Khanin, Y., Drabkin, V., Glatman, L. (2005). Effect of ozone pretreatment on fish storage life at low temperatures. *Journal of Food Protection*, 68: 778-784.
- Giavasis, I., Apostolopoulou, A., Deirmentzoglou, A., Katsanidis, E. (2012). Combined hurdle effects of process parameters on biochemical, microbiological and sensory attributes of trout fillets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38: 466-476.
- Giménez, B., Roncalés, P., Beltrán, J.A. (2004). The effects of natural antioxidants and lighting conditions on the quality characteristics of gilt-head sea bream fillets (*Sparus aurata*) packaged in a modified atmosphere. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1053-1060.
- Goulas, A.E. Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 100: 287-296.
- Gómez, R., Choubert, G., Gobantes, I. (2001). Envasado de alimentos. Aspectos técnicos del envasado al vacío y bajo atmósfera protectora. *Alimentación, equipos y tecnología*, 1, 75-84.

- Gómez-Estaca, J., López de Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35: 42-51.
- González-Fandos, E., García-Linares, M.C., Villarino-Rodríguez, A., Garcia-Arias, M.T, García-Fernández, M.C. (2004). Evaluation of the microbiological safety and sensory quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by the *sous vide* method. *Food Microbiology*, 21: 193-201.
- González, D., Vitas, A.I., Díez-Leturia, M., García-Jalón, I. (2013). *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat to seafood in Spain: study of prevalence and temperatures at retail. *Food microbiology*, 36: 374-378.
- Gorris, L.G.M., Peck, M.W. (1998). Microbiological safety considerations when using hurdle technology with refrigerated processed foods of extended durability. In S. Ghazala (Ed.), *Sous Vide and Cook–Chill Processing for the Food Industry* (pp. 206–233). Gaithersburg: Apsen.
- Grau, R., Hamm, R. (1953). Eine einfache method zur bestimmung der wasserbindung im muskel. *Naturwissenschaften* 40: 29-30.
- Gulyavuz, H., Unlusayin, M. (1999). Su Ürünleri Teknolojisi (pp.336-337). Turkey: Su Ürünleri Fakültesi Isparta.

## H

- Hardalo, C., Edberg, S.C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiological*, 23 (1): 47-75.
- Hedrick, H.B., Aberle, E.D., Forrest, J.C., Judge, M.D., Merkel, R.A. (1994). Principles of meat science. 3<sup>rd</sup> ed., Kendall Hunt Publishing Co., Dubuque, Iowa. 1,3, 274, 289,317.
- Hernández, M.D., López, M.B., Álvarez, A., Ferrandini, E., García García, B., Garrido, M.D. (2009). Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry*, 114: 237-245.
- Herrero, A.M., Romero de Ávila, M.D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas. *Revista Médica Universitaria Navarra*; 50, 4:71-74.
- Hite, B.H. (1899). The effects of pressure in the preservation of milk. *Bulletin of the West Virginia University Agricultural Experimental Station Morgantown*, 58, 15-35.
- Huidobro, A., Pastor, A., Tejada, M. 2001. Quality Index Method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 65 (7): 1202- 1205.
- Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO fisheries technical paper*, 348.
- Huss, H.H. (1999). El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. Documentos técnicos de pesca 348. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Roma, Italia.

## I

- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2002). *Microorganisms in Foods 7, Microbiological Testing in Foods Safety Management*. Kluwer Academic/ Plenum Publisher. Springer, Londres, UK.
- ISO, International Standards Organization 1443 (1979). Meat and meat products - Determination of total fat content.
- ISO, International Standards Organization 937 (1981). Meat and meat products. Determination of nitrogen content.
- ISO, International Standards Organization 1442 (1997). Meat and meat products- Determination of moisture content (Reference method).
- ISO, International Standards Organization 936 (1998). Meat and meat products - Determination of total ash. <<http://www.iso.org>>.
- ISO, International Standards Organization 2917 (1999). Meat and meat products – Measurement of pH - Reference method. Geneva, Switzerland: The International Organization for Standardization.
- ISO International Standards Organization 4121 (2006). Sensory analysis. Guidelines for the use of quantitative response scales. Geneva, Switzerland: The International Organization for Standardization.
- ISO, International Standards Organization 8586-2 (2008). Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 2: Expert sensory assessors. Geneva, Switzerland: The International Organization for Standardization.
- ISO, International Standards Organization 8589 (2010). Sensory analysis. General guidance for the design of test rooms. Geneva, Switzerland: The International Organization for Standardization.

## J

- Jang, J.D., Lee, D.S. (2005). Development of a *sous-vide* packaging process for Korean seasoned beef. *Food Control*, 16: 285-291.

## K

- Kenar, M., Özogul, O., Kuley, E. (2010). Effects of Rosemary and sage tea extracts on the sensory, chemical and microbiological changes of vacuum-packed and refrigerated sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. *International Journal of Food Science Technology*, 45: 2366-2372.
- Khayat, A. Schwall, D. (1983). Lipid oxidation in seafood. *Food Technology*, 37:130-140.
- Kilinc, B., Cakli, S. (2005). The determination of the shelf-life of pasteurized and non-pasteurized sardine (*Sardina pilchardus*) marinades stored at 4 degrees C. *Food Science Technology International*, 40: 265-271.
- Kim, B., Park J. (2000). *Surimi and Surimi Seafood*. New York: Taylor and Francis.

- Kim, Y.J., Nahm, B.A., Choi, I.H. (2010). An evaluation of the antioxidant and antimicrobial effectiveness of different forms of garlic and BHA in emulsion-type sausages during refrigerated storage. *Journal of Muscle Foods*, 21:813-825.
- Kolakowska, A., Olley, J. Dunstan, G.A. (2000). Fish lipids. In Chemical and functional properties of food lipids. Z. E. Sikorski and A. Kolakowska, Eds. CRC Press. Boca Raton, Florida. 221-264.
- Koral, S., Köse, S. (2012). The effect of filleting and ice application on the quality and safety of Atlantic bonito (*Sarda sarda*) at refrigerated storage. *International Journal of Food Science Technology*, 47: 210-220.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, 26: 475-482.
- Krzymien, M.E., Elias, L. (1990). Feasibility study on the determination of fish freshness by trimethylamine headspace analysis. *Journal of Food Science*, 55: 1228–1232.
- Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M. G., Savvaidis, I.N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, 115: 169-175.
- Kyriakides, A., Batchford, S. (2002). The microbiological safety and quality of ready-meals. In: Ready meal Technology. Leatherhead Publishing, pp. 192-228.

## L

- Lakshmisha, I.P., Ravishankar, C.N., Ninan, G., Mohan, C.O., Gopal, T.K.S. (2008). Effect of freezing time on the quality of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagaruta*) during frozen storage. *Journal of Food Science*, 73(7): 345-53.
- Lambertsen, G., Braekkan, O.R. 1971. Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. *Journal of Science Food and Agriculture*, 22: 99-101.
- Ledward, D.A., Johnston, D.E., Earnshaw, R.G., Hasting, A.P.M. (1995). High pressure processing-The potential. High pressure processing of foods. Pp 1-6. Ed. Nottingham University Press.
- Lee, S.J, Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K.G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food chemistry*, 91:131-137.
- Li, B.S., Zhang,W. & Mei, C.H. (2010). Comparison of ultra-high pressure and heat sterilization on the quality of freshly squeezed pineapple juice. *Journal of Agricultural Engineering*, 1: 359-364.
- Lingle, L. (1992). Why *sous vide* makes sense. Food manufacturing & packaging. *Prepared Foods*, 18: 98-100.

Losada, V., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J., Aubourg, S. (2004). Effect of advanced chilling methods on lipid damage during sardine (*Sardina pilchardus*) storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 844-850.

Love, R.M. (2001). Biological factors affecting processing and utilization. En: *Advances in Fish Science and Technology*. Pp. 130-138. Ed. Connell J.J. Fishing News Books. Farnham, UK.

## M

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2008). Cultivo de dorada (*Sparus aurata*). URL: [http://www.magrama.gob.es/app/JACUMAR/especies/Documentos/Cultivo\\_Dorada.pdf](http://www.magrama.gob.es/app/JACUMAR/especies/Documentos/Cultivo_Dorada.pdf)

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2009). Estudio de mercado. Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria. Monográfico de Productos de Acuicultura. URL: [http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/consumo\\_prod\\_acuicultura\\_tcm7-8059.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/consumo_prod_acuicultura_tcm7-8059.pdf).

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2012a). *Sparus aurata*. URL: <http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/especies/Documentos/Dorada.pdf>.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2012b). Crece el consumo de productos pesqueros en los hogares de los jóvenes independientes. URL: [http://www.magrama.gob.es/es/prensa/12.12.13%20Consumo%20pescado\\_tcm7-235372.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/prensa/12.12.13%20Consumo%20pescado_tcm7-235372.pdf).

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2014). Plan estratégico de innovación y desarrollo tecnológico. Pesca y Acuicultura. URL: [http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/plan\\_estrategico\\_id\\_pesca\\_acuicultura\\_tcm7-355807.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/plan_estrategico_id_pesca_acuicultura_tcm7-355807.pdf)

Manousaridis, G., Nerantzaki, A., Paleologos, E.K., Tsiotsias, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2005). Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiology*, 22: 1-9.

Martín, V.J. (2012). Consumo de platos preparados en los hogares españoles. URL: [http://www.mercasa.es/files/multimedios/1336045911\\_pag\\_005-020\\_Martin-Cerdeno.pdf](http://www.mercasa.es/files/multimedios/1336045911_pag_005-020_Martin-Cerdeno.pdf).

Masniyom, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2002). Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 873-880.

Masniyom, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2005). Combination effect of phosphate and modified atmosphere on quality and shelf-life extension of refrigerated seabass slices. *LWT- Food Science and Technology*, 38, 745-756.

- Matějková, K., Křížek, M., Vácha, F., Dadáková, E. (2013). Effect of high-pressure treatment on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 137: 31-36.
- Mendes, R. Gonçalves, A. (2008). Effect of soluble CO stabilization and vacuum packaging in the shelf life of farmed sea bream and sea bass fillets. *International Journal of Food Science Technology*, 43: 1678-1687.
- Montecinos, K.J. (2006). Tesis Doctoral: Análisis del recuento de bacterias aerobias mesofilas viables de muestras de pescado congelado, incubadas a 30° C y 35° C y su correlación con los resultados de trimetilamina y nitrógeno básico volátil total. URL: <http://cybertesis.uach.cl/sdx/uach/fiche.xsp?base=documents&id=uach.2006.fvm773a>.
- Montero, P., Giménez, M., Pérez-Mateos, M.C., Gómez-Guillén, M.C. (2005). Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. *Food Chemistry*, 93, 17-23.
- Morales, P., Calzada, J., Nuñez, M. (2006). Effect of High pressure treatment on the survival of *Listeria monocytogenes* Scott A insliced vacuum-packaged iberian and serrano cured hams. *Journal of Food Protection*, 69: 2539-2543.
- Morata Barrado, A. (2008). Nuevas tecnologías de conservación de alimentos. Ediciones Madrid Vicente, Madrid.
- Murno, H. (2003). Tecnología de Barreras. URL: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EpyuVFFlyZfCrGMAfA.php>.

## N

- Nerantzaki, A., Tsiotsias, A., Paleologos, E. K., Savvaidis, I .N., Bezirtzoglou, E., Kontominas, M. G. (2005). Effects of ozonation on microbiological, chemical and sensory attributes of vacuum-packaged rainbow trout stored at 4 °C. *European Food Research and Technology*, 221: 675-683.
- Nunes, H., Grébol, N. (2011). Las altas presiones, una realidad industrial al alcance de todas las empresas cárnicas. Eurocarne digital. Revista 202 – (Diciembre/2011).
- Nyati, H. (2000). An evaluation of the effect of storage and processing temperature on the microbiological status of *sous vide* extended shelf-life products. *Food Control*, 11, 471-476.

## Ñ

## O

- Olsson, G. B., Ofstad, R., Lødemel, J. B., & Olsen, R. L. (2003). Changes in waterholding capacity in halibut muscle during cold storage. *LWT-Food Science and Technology*, 36: 771–778.
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Natale, C.D., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S.V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., Jørgenseng,

- B. M. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 86-93.
- Ordóñez, J., Zurera, G., Bosch, A., Otero, A., Guamis, B. (2004). Opinión del comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Dirección Ejecutiva, en relación con la aplicación de altas presiones en carne y productos cárnicos. *Agencia Española de Seguridad Alimentaria*.
- Özogul, F., Kuley, E., Özogul, Y. (2007). Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*Sparus Aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in aluminium foil at  $2 \pm 1$  °C. *International Journal of Food Science Technology*, 42: 903-909.
- Özyurt, G. (2013). Effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract addition on oxidative stability of fried seabream (*Sparus aurata*) during chill storage (4 °C). *Journal of Food Processing and Preservation*, 37: 1039-1042.
- Özyurt, G., Özkütük, A. S. (2011). Capability of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the oxidative stability of cooked sea bream (*Sparus aurata*) during frozen storage. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6, 167-174.

## P

- Pantazi, D., Papavergou, A., Pournis, N., Kontominas, M.G., and Savvaidis, I.N. (2008). Shelf life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes. *Food Microbiology*, 25: 136-143.
- Pascual Anderson, M.R. (2000). Microbiología alimentaria. S.A. Díaz de Santos (ed.), Metodología para alimentos y bebidas, 2nd ed. Madrid.
- Pastoriza, L., Bernárdez, M., Sampedro, G., Cabo, M. L., Herrera, J. J. R. (2007). Use of sterile and ozonized water and as a strategy to stabilize the quality of stored refrigerated fresh fish. *Food Control*, 18 (8): 772-780.
- Patsias, A., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2006). Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmosphere: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food microbiology*, 23: 423-429.
- Peso-Echarri, P., Frontela-Saseta, C., Santaella-Pascual, M., García-Alcázar, A., Abdel, I., Ros-Berruezo, G., Martínez-Gracia, C. (2012). Sodium alginate as feed additive in cultured sea bream (*Sparus aurata*): Does it modify the quality of the flesh. *Food Chemistry*, 135: 699-705.
- Petropoulos, S.A, Daferera, D., Akoumianakis, C.A., Pasam, H.C, Polissiou, M.G. (2004). The effect of sowing date and growth stage on the essential oil composition of three types of parsley *Petroselinum crispum*. *Journal of Science and Food Agriculture*, 84: 1606-1610.
- Picouet, P.A., Cofan-Carbo, S., Vilaseca, H., Ballbé, L.C., Castells, P. (2011). Stability of *sous-vide* cooked salmon loins processed by high pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 26-31.

Pons Sánchez-Cascado, S. (2005). Tesis Doctoral. Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados. URL: <http://hdl.handle.net/10803/2427>.

Provincial, L., Gil, M., Guillén, E., Alonso, V., Roncalés, P., Beltrán, J.A. (2010). Effect of modified atmosphere packaging using different CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> combinations on physical, chemical, microbiological and sensory changes of fresh sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 1828-1836.

Provincial Simón, L. (2013). Tesis Doctoral: Mejora y optimización del uso de atmósferas modificadas en la conservación de dorada y lubina. Universidad de Zaragoza. URL: [http://www.unizar.es/departamentos/produccion\\_animal/tesis\\_CSTA.htm](http://www.unizar.es/departamentos/produccion_animal/tesis_CSTA.htm).

## Q

## R

Raharjo, S., Sofos, J.N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid-peroxidation in muscle tissues- A review. *Meat Science*, 35: 145-169.

Ramaswamy, H.S., Zaman, S.U., Smith, J.P. (2008). High pressure destruction kinetics of *Escherichia coli* (O157:H7) and *Listeria monocytogenes* (Scott A) in a fish slurry. *Journal of Food Engineering*, 87: 99-106.

Randell, K., Hattula, T., Skytta, E., Sivertsvik, M., Bergslien, H., Ahvenainen, R. (1999). Quality of filleted salmon in various retail packages. *Journal of Food Quality*, 22: 483-497.

Real Decreto 1521/1984, de 1 de Agosto, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los Establecimientos y Productos de la Pesca y Acuicultura con destino al Consumo Humano.

Real Decreto 3484/2000, de 29 de Diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. URL: [[http://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-2001-809](http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2001-809)]. (BOE N°. 11 de 12 de enero de 2001).

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE 21 de febrero de 2003) acorde con la Directiva Europea 98/83/CE del Consejo de 3 de Noviembre de 1998.

Reddy, S.V., Srinivas, P.V., Praveen, B., Kishore, K.H., Raju, B.C., Murthy, U.S, Rao, J.M. (2004). Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine* 11: 697-700.

Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B., Palnikar, P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (9): 3471-3475.

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., De-Roublin, M. R., Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of Coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49: 31-54.

Roldán, M., Antequera, T., Armenteroz, M., Ruiz, J. (2014). Effect of different temperature-time combinations on lipid and protein oxidation of *sous vide* cooked lamb loins. *Food Chemistry*, 149:129-136.

Roca, J., Brugués, S. (2004). La cocina al vacío. Barcelona: Montagud Editores, S.A. pp. 1-189.

## S

Santaella Pascual, M. (2011). Tesis Doctoral: Nuevas presentaciones comerciales de Dorada (*Sparus Aurata L.*) de acuicultura. Evaluación de la calidad y seguridad alimentaria. URL: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4543483>.

Schellekens, W., Martens, T. (1992). *Sous vide*: State of the Art (Publication EUR 15018 EN), ALMA, Leuven, Belgium.

Schellekens, M. (1996). New research issues in *sous vide* cooking. *Trends in food science & Technology*. Vol. 7.

Schweiggert, U., Carle, R., Schieber, A. (2007). Conventional and alternative processes for spice production; a review. *Trends Food Science and Technology*, 18:260-268.

Selli, S., Prost, C., Serot, T. (2009). Odour-active and off-odour components in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) extracts obtained by microwaves assisted distillation–solvent extraction. *Food Chemistry*, 114: 317–322.

Selma, M.V., Allende, A., López-Gálvez, F., Conesa, M.A., Gil, M.I. (2008). Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry. *Food Microbiology*, 25: 809-814.

Senso L, Suárez M, Ruiz-Cara T, García-Gallego M. (2007). On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, 101: 298-307.

Shakila, R. J., Raj, B. E., Felix, N. (2012). Quality and safety of fish curry processed by *sous vide* cook chilled and hot filled technology process during refrigerated storage. *Food Science and Technology International*. 18: 261-269.

Shineman, T.L., Harrison, M.A. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* on different muscle tissues, *Journal of Food Protection*, 57: 1057-62.

Silva, F.V.M., Gibbs, P.A. (2010). Non-proteolytic *Clostridium botulinum* spores in low-acid cold-distributed foods and design of pasteurization processes. *Trends Food Science and Technology*, 21, 95-105.

Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products-significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 107-127.

Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in food science & Technology*, 9, 152-158.

- Socol, M.C.H., Oetterer, M., Gallo, C.R., Spoto, M.H.F., Biato, D.O. (2005). Effects of modified atmosphere and vacuum on the shelf life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8: 7-15.
- Spain technology (Portal dedicado a la tecnología española y a las empresas tecnológicas españolas). (2011). Altas presiones, una alternative para conservar alimentos. URL: <http://www.madrimasd.org/noticias/altas-presiones--una-alternativa-para-conservar-alimentos/49375>.
- Spencer, C.K. (2005). Modified atmosphere packaging of ready to eat foods. *Innovations in food packaging*, 185-203.
- Suárez, H., De Francisco, A., Henrique, L., Pardo, S., Cortés, M. (2007). Post Mortem Lost of Texture of Fish Meat During Cold Storage. *Acta biológica Colombiana.*, Vol. 12 No. 1: 3-18
- Sutton, J., Balfry, S., Higgs, D., Huang, C., Skura, B. (2006). Impact of iron-catalyzed dietary lipid peroxidation on growth performance, general health and flesh proximate and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in seawater. *Aquaculture*, 257: 534-557.
- ## T
- Taliadourou, D., Papadopoulos, V., Domvridou, E., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2003). Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1373-1379.
- Tassou, C.C., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E. (1996). Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. *Journal of Food Protection*, 59:31-34.
- Tejada, M., Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus Aurata*) during ice storage related to slaughter method and gutting. *European Food Research Technology*, 215: 1-7.
- Téllez, S.J., Ramirez, J.A., Pérez, C., Vázquez, M., Simal, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, vol. 3, núm. 2, pp. 66-80.
- Tewari, G., Jayas, D.S., Holley, R.A. (1999). High pressure processing and preservation of Food. *Food Reviews International*, 14 (4):427-447.
- Thakur, B.R., Nelson, P. E. (1998). High pressure processing and preservation of foods. *Food Reviews International*, 14: 427-447.
- Tokur, B. (2007). The effect of different cooking methods on proximate composition and lipid quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Food Science and Technology*, 42:874-879.
- Topuz, O.K., Yerlikaya, P., Ucak, I., Gumus, B., Aydan, H., Büyükbenli, H. (2014). Effects of olive oil and olive oil-pomegranate juice sauces on chemical, oxidative and sensorial quality of marinated anchovy. *Food Chemistry*, 154: 63-70.

- Torrieri, E., Cavella, S., Villani, F., and Masi, P. (2006). Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal Food Engineering*, 77: 1078-1086.
- Tsironi, T.N. Taoukis, P.S. (2010). Modelling microbial spoilage and quality of gilthead seabream fillets: combined effect of osmotic pretreatment, modified atmosphere packaging and Nisin on shelf life. *Journal of Food Science*, 75: 243-251.
- Tsironi, T.N., Taoukis, P.S. (2011). Shelf-life extension of gilthead seabream fillets by osmotic treatment and antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology*, 112: 316-328.
- Turkkan, A.U., Cakli, S., Kilinc, B. (2008). Effects of cooking methods on the proximate composition and fatty acid composition of seabass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Food and Bioproducts Process*, 86: 163-166.
- Turkkan, A.U., Cakli, S., Kilinc, B. (2010). Changes in quality during storage of vacuum packed sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) cooked by different methods. *Journal of Muscle Foods*, 21: 1-14.

## U

- Udompijtkul, P., Alnoman, Sarker, M. (2013). Inactivation strategy for *Clostridium perfringens* spores adhered to food contact surfaces. *Food Microbiology*, 34: 328-336.
- UNE- EN ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2. Enumeration method.
- UNE- EN ISO 6222:1999. Water quality – Enumeration of culturable microorganisms. Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
- UNE-EN ISO 9308-1:2001. Water quality- Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method.
- UNE-EN ISO 7899-2:2001. Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 2: Membrane filtration method.
- UNE-EN ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for detection of *Salmonella spp.*
- UNE-EN ISO 22000:2005. Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos. Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria.
- UNE-EN 1278:2010. Productos químicos utilizados en el tratamiento del agua destinada al consumo humano. Ozono.
- UNE 167012:2010. Hostelería. Servicios de restauración. Requisitos para la implantación de un sistema de autocontrol basado en los principios del APPCC.
- UNE-EN 167014:2014. Hostelería. Requisitos de seguridad alimentaria y de procedimiento para unidades centrales de producción y distribución en línea fría.

UNE-EN ISO 4833-1:2014. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique (ISO 4833-1:2013)

## V

## W

Witkowska, A.M., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M.G. (2011). The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control* 22: 616-625.

## X

## Y

Yagiz, Y., Hordur, GR., Marshall, B. (2009). Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. *Food Chemistry*, 116 (4): 828-835.

Yaldagard, M., Mortazavi, S.A., Tabatabaie, F. (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing /preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7 (16): 2739-2767.

Yi, J., Xu, Q., Hu, X., Dong, P., Liao, X., Zhang, Y. (2013). Shucking of bay scallop (*Argopecten irradians*) using high hydrostatic pressure and its effect on microbiological and physical quality of adductor muscle. *Innovative Science and Emerging Technologies*, 18: 57-64.

## Z

Zdzislaw, E. S. (1990). *Seafood: Resources, Nutritional Composition and preservation*. CRC Press.

