

**EVALUACIÓN DE
METODOLOGÍAS AVANZADAS DE
CONSERVACIÓN DE ESPECIES
MARINAS CAPTURADAS POR LA
FLOTA GALLEGA DE CALADEROS
COMUNITARIOS**

Bibiana García Soto

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA PROGRAMA DE DOCTORAMIENTO EN
INNOVACIÓN EN SEGURIDAD Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIAS
FACULTAD DE FARMACIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015



**EVALUACIÓN DE
METODOLOGÍAS AVANZADAS DE
CONSERVACIÓN DE ESPECIES
MARINAS CAPTURADAS POR LA
FLOTA GALLEGA DE CALADEROS
COMUNITARIOS**

Fdo.

Bibiana García Soto

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA PROGRAMA DE DOCTORAMIENTO EN
INNOVACIÓN EN SEGURIDAD Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIAS
FACULTAD DE FARMACIA





TESIS DE DOCTORAMIENTO

D. Santiago P. Aubourg Martínez, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo e D. Jorge Barros Velázquez, Catedrático de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Santiago,

Como Directores de la Tesis de Doctoramiento titulada «**EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS AVANZADAS DE CONSERVACIÓN DE ESPECIES MARINAS CAPTURADAS POR LA FLOTA GALLEGA DE CALADEROS COMUNITARIOS**», presentada por Doña Bibiana García Soto, Alumna del Programa de **Doctoramiento en Innovación en Seguridad y Tecnología Alimentarias**,

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctoramiento, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Santiago de Compostela, 6 de abril de 2015.

Fdo. Santiago P. Aubourg Martínez

Fdo. Jorge Barros Velázquez





TESIS DE DOCTORAMIENTO

D. Santiago P. Aubourg Martínez, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo e D. Jorge Barros Velázquez, Catedrático de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Santiago, como Directores de la tesis titulada: **EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS AVANZADAS DE CONSERVACIÓN DE ESPECIES MARINAS CAPTURADAS POR LA FLOTA GALLEGA DE CALADEROS COMUNITARIOS,**

Pola presente **DECLARAMOS:**

Que la tesis presentada por Doña Bibiana García Soto, es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctoramiento*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra tesis de Doctoramiento, lo que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 6 de abril de 2015.

Fdo. Santiago P. Aubourg Martínez

Fdo. Jorge Barros Velázquez



Evaluación de metodologías avanzadas de conservación de especies marinas capturadas por la flota gallega de caladeros comunitarios.

RESUMEN

El presente proyecto de tesis supone el estudio en profundidad de la mejora de la calidad de las principales especies marinas capturadas por la flota gallega que pesca en caladeros comunitarios, incluyendo una especie infrautilizada e infravalorada hasta la actualidad. El objetivo común ha consistido en aplicar técnicas de conservación susceptibles de mejorar o posibilitar su conservación a bordo. El aumento de la vida útil se abordó mediante distintas técnicas de aplicación de compuestos preservantes a las especies elegidas para su conservación en refrigeración o congelación. Para verificar el posible efecto inhibitorio de la alteración de las distintas estrategias ensayadas, se realizaron análisis bioquímicos, microbiológicos y sensoriales en las muestras tratadas en el laboratorio o a bordo.

PALABRAS CLAVE:

Preservación, productos marinos, aumento vida útil.

Evaluation of advanced methodologies for preservation of marine species caught by the Galician fleet in the EU fishing grounds.

ABSTRACT

The current thesis project involves an in-depth study on the improvement of the main marine species caught by the Galician fleet fishing in the EU fishing grounds, including one species that has been unexploited and undervalued so far. The common objective has been to apply conservation techniques capable of improving or making its preservation possible on-board. The increase of the shelf life time was tackled using different techniques by applying preservative compounds to the selected species for cold or freezing storage. Biochemical, microbiological and sensorial analyses were carried out in the samples treated either in the laboratory or on-board in order to check for the possible inhibitory effect of altering the different tested strategies.

KEYWORDS

Preservation, seafood, shelf life time increase.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo incondicional de mis directores de tesis, Santiago Aubourg y Jorge Barros. Sin ellos no habría sido posible. Gracias por vuestra paciencia.

Quiero dar las gracias a todos y cada uno de los que me han acompañado en este proceso.

Destacar a mis compañeros del laboratorio de QPM en el Instituto de Investigaciones Marinas, por compartir sus conocimientos y prestarme su ayuda en este largo camino. Especial mención a Marcos Trigo, por hacer de cada día de laboratorio un momento alegre.

A la Cooperativa de Armadores de Pesca del Puerto de Vigo, porque facilita que mi trabajo diario repercuta positivamente en mi formación académica.

A mi familia en general y a Dani en particular, por estar ahí cada día. Por motivarme cada hora. Por aguantar mis momentos de frustración y ser mi aliento.

Y gracias a Antón, que ha sido la mayor y mejor motivación que he podido desear en esta etapa final.

Este trabajo de investigación ha sido realizado gracias a la financiación concedida por la Xunta de Galicia dentro del Programa Sectorial de Tecnologías de la Alimentación y subvenciones para el apoyo al crecimiento empresarial mediante el fomento de la investigación y la innovación empresarial en el ámbito de la Comunidad Autónoma de Galicia (fondos FEDER) a través de los Proyectos de investigación:

PGIDIT10TAL018E, PGIDIT10TAL048E y IN841C 2012/82



ABREVIATURAS

AA: Ácido ascórbico

CA / AC: Ácido cítrico

ADP: Difosfato de adenosina

FFA: Ácidos grasos libres

LA / AL: Ácido láctico

AMP: Monofosfato de adenosina

ApVigo: Autoridad Portuaria de Vigo

ATP: Trifosfato de adenosina

EAM: Envasado en atmósfera modificada

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FR: Relación de fluorescencia

g: Gramos

IMP: Monofosfato de inosina

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

mequiv: Miliequivalente

min : Minutos

ml: Mililitro

nm: Nanómetros

OTMA: Óxido de trimetilamina

PPC: Política Pesquera Común

PCA: Plate count agar

PI: Índice de Polienos

PV: Índice de peróxidos

RF:Fluorescencia relativa

SMB: Metabisulfito de sodio

TBA-i: Índice de Ácido tiobarbitúrico

TMA-N: Trimetilamina nitrogenada

TVB-N: Bases nitrogenadas volátiles totales

UE: Unión Europea

UFC: Unidades formadoras de colonias



1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS RECURSOS PESQUEROS.....	1
1.2. ALTERACIÓN POST-MORTEM DE LOS RECURSOS PESQUEROS.....	6
1.2.1. Mecanismos enzimáticos endógenos.....	6
1.2.2. Mecanismos microbianos.	8
1.2.3. Mecanismos de oxidación no enzimática.	9
1.2.4. Mecanismos de pardeamiento no enzimático.....	9
1.2.5. Mecanismos de pardeamiento enzimático.....	10
1.3. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS PESQUEROS.....	10
1.3.1. Conservación en refrigeración.....	11
1.3.1.1. Aspectos generales de la refrigeración.	11
1.3.1.2. Empleo de hielo en escamas.	12
1.3.2. Conservación en congelación.	13
1.4. PRODUCCIÓN DE LOS RECURSOS PESQUEROS.....	13
1.4.1. Producción de los recursos pesqueros: caladero de Gran Sol.	14
1.4.1.1. Conservación de especies en fresco.....	16
1.4.1.2. Conservación de especies en congelado.....	17
1.4.2. Producción de los recursos pesqueros en fresco: Puerto de Vigo.	17
1.5. MARCO NORMATIVO DE LOS RECURSOS PESQUEROS: LOS DESCARTES EN LA NUEVA POLÍTICA PESQUERA COMÚN (PPC).	19
1.6. BIBLIOGRAFÍA.....	21
2. PUNTO DE PARTIDA, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	25
2.1. PUNTO DE PARTIDA DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA.....	25
2.2. OBJETIVOS PERSEGUIDOS.....	27
2.3. PLAN DE TRABAJO.....	28
2.3.1. PARTE 1. Aplicación de hielo incluyendo componentes conservantes naturales.....	28
2.3.2. PARTE 2. Aplicación de láminas biodegradables incluyendo componentes conservantes.	28
2.3.3. PARTE 3. Aptitud tecnológica de una especie infravalorada (<i>Munida spp</i>): conservación en refrigeración y congelación.	29
2.4. Características de las especies de estudio.....	29
2.4.1. Gallo (<i>Lepidorhombus spp</i>).....	29
2.4.2. Merluza EUROPEA (<i>Merluccius merluccius</i>).	31

2.4.3. Langostilla (<i>Munida spp</i>).....	32
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN APLICADOS	37
3.1.1. Aplicación de hielo incluyendo componentes conservantes.....	37
3.1.2. Aplicación de láminas biodegradables incluyendo componentes conservantes.	38
3.1.3. Aplicación de bisulfito sódico para la conservación de una especie infravalorada.	38
3.2. MATERIA PRIMA, APLICACIÓN DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS.	39
3.2.1. Capítulo 1. Extensión de la vida útil de la merluza refrigerada (<i>Merluccius merluccius</i>) mediante la aplicación de hielo que contiene ácidos orgánicos naturales.	39
3.2.2. Capítulo 2. Inhibición de la pérdida de calidad en el gallo refrigerado (<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>) mediante el empleo de ácido cítrico y ácido láctico en la formación de hielo.	39
3.2.3. Capítulo 3. Uso de los ácidos cítrico y láctico en el hielo para mejorar la calidad de dos especies de pescado a bordo durante el almacenamiento refrigerado.....	40
3.2.4. Capítulo 4. Efecto de un film biodegradable (lío-filizado del alga <i>Fucus spiralis</i> y ácido sórbico) sobre las propiedades de calidad de gallo refrigerado (<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>).	40
3.2.5. Capítulo 5. Mejora de la calidad de un crustáceo abundante e infravalorado, langostilla (<i>Munida spp</i>), durante su almacenamiento refrigerado.....	41
3.2.6. Capítulo 6. Cambios de calidad durante el almacenamiento congelado del crustáceo langostilla (<i>Munida spp</i>).	41
3.3. TIPO DE ANÁLISIS DE VALORACIÓN DE LA CALIDAD REALIZADOS.....	42
3.3.1. Análisis sensorial.	42
3.3.2. Análisis microbiológicos.....	45
3.3.2.1. Preparación de muestras.....	45
3.3.2.2. Parámetros microbiológicos.....	45
3.3.3. Análisis químicos.....	46
3.3.3.1. Preparación de extractos.....	46
3.3.3.2. Medición del pH.....	46
3.3.3.3. Cuantificación de constituyentes.....	47
3.3.3.4. Estudio de la alteración lipídica.	47
3.3.3.5. Estudio de la alteración de la fracción de nitrógeno no proteico.	49
3.3.3.6. Determinación de la degradación de nucleótidos.....	49
3.3.3.7. Análisis complementarios relacionados con la calidad.....	50

3.3.4. Análisis estadístico.....	50
3.4. BIBLIOGRAFÍA.....	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1. PARTE 1. Aplicación de hielo incluyendo componentes conservantes.....	55
4.1.1. Capítulo 1. Extensión de la vida útil de la merluza refrigerada (<i>Merluccius merluccius</i>) mediante la aplicación de hielo que contiene ácidos orgánicos naturales. (ANEXO I).....	67
4.1.1.1. Introducción.....	67
4.1.1.2. Resultados y discusión.....	67
4.1.2. Capítulo 2. Inhibición de la pérdida de calidad en el gallo refrigerado (<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>) mediante el empleo de ácido cítrico y ácido láctico en la formación de hielo. (ANEXO II).....	83
4.1.2.1. Introducción.....	83
4.1.2.2. Resultados y discusión.....	83
4.1.3. Capítulo 3. Incorporación de los ácidos cítrico y láctico en el hielo para mejorar la calidad de dos especies de pescado a bordo durante su almacenamiento refrigerado. (ANEXO III).....	97
4.1.3.1. Introducción.....	97
4.1.3.2. Resultados y discusión.....	97
4.2. PARTE 2. Aplicación de láminas biodegradables incluyendo componentes conservantes.....	101
4.2.1. Capítulo 4. Efecto de un film biodegradable (lío­filizado del alga <i>Fucus spiralis</i> y ácido sórbico) sobre las propiedades de calidad de gallo refrigerado (<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>). (ANEXO IV).....	115
4.2.1.1. Introducción.....	115
4.2.1.2. Resultados y discusión.....	115
4.3. PARTE 3. Aplicación de bisulfito sódico para la conservación de una especie infravalorada.....	117
4.3.1. Capítulo 5. Mejora de la calidad de un crustáceo abundante e infravalorado, langostilla (<i>Munida</i> spp), durante su almacenamiento refrigerado. (ANEXO V)....	131
4.3.1.1. Introducción.....	131
4.3.1.2. Resultados y discusión.....	131
4.3.2. Capítulo 6. Cambios de calidad durante el almacenamiento congelado del crustáceo langostilla (<i>Munida</i> spp). (ANEXO VI).....	145
4.3.2.1. Introducción.....	145
4.3.2.2. Resultados y discusión.....	145
4.4. BIBLIOGRAFÍA.....	148
5. CONCLUSIONES.....	153



1. INTRODUCCIÓN

1.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS RECURSOS PESQUEROS.

Los productos pesqueros, al igual que el resto de alimentos de origen animal, contienen agua, proteínas y otros compuestos nitrogenados, lípidos, hidratos de carbono, minerales y vitaminas.

Los principales constituyentes del **pescado** son proteínas, lípidos y agua, tal y como se muestra en la Tabla 1. Los carbohidratos suponen un porcentaje muy bajo. Los valores de dichos constituyentes son variables en función de la alimentación del pez, ciclos sexuales o aspectos migratorios. Dentro de una misma especie la diferencia viene dada por la edad, el sexo o la estación del año.

Constituyente	Pescado (fracción comestible)		
	Mínimo	Variación normal	Máximo
Proteínas	6	16-21	28
Lípidos	0,1	0,2 - 25	67
Carbohidratos		< 0,5	
Cenizas	0,4	1,2-1,5	1,5
Agua	28	66-81	96

Tabla 1: Constituyentes del pescado. FUENTES: Stansby, 1962; Love, 1970

Existen periodos en que los peces tienen una alimentación más intensa, normalmente para prepararse para las épocas de desove que suelen ir acompañadas de una migración previa. En dichos periodos el contenido de proteínas del músculo aumenta. Esto es mucho más acusado en especies altamente migratorias durante la época reproductiva (p.ej. salmón). La mayoría de especies muestran variaciones estacionales en el contenido de lípidos con un punto mínimo que coincide con la época de reproducción.

Según el **contenido de lípidos**, podemos diferenciar tres tipos de pescado: magro, graso y semigraso. El pescado magro tiene un contenido de lípidos bajo y estable, mientras que el contenido de las especies grasas para lípidos es muy variable y alto. El porcentaje de grasa y agua constituyen normalmente el 80% del filete, por lo que se acepta que entre los contenidos de estos constituyentes existe una proporcionalidad que puede ser utilizada para saber el porcentaje de lípidos según el contenido de agua (Kent et al., 1992). Al pescado con un contenido medio de grasas se le denomina semigraso.

Existen dos grandes grupos de lípidos que destacan por su abundancia en las especies de pescados óseos: los fosfolípidos y los triglicéridos. Los fosfolípidos son lípidos estructurales de la membrana celular, mientras los triglicéridos son lípidos de almacenamiento de energía como depósitos de grasa.

El músculo del pescado magro suele contener menos del 1% de lípidos, siendo mayoritarios los fosfolípidos, en torno a un 90% (Ackman, 1980). Dichos fosfolípidos se encuentran en estructuras de la membrana celular y de los orgánulos citoplasmáticos. Mientras que el pescado magro acumula los lípidos en el hígado, el pescado graso los acumula por todo el cuerpo en células grasas localizadas principalmente en el tejido subcutáneo de los músculos del vientre y de los músculos de aletas y cola, aunque de forma generalizada por toda la estructura muscular.

En el contenido lipídico encontramos la principal diferencia entre productos de origen marino y productos de origen animal. Los lípidos del pescado están compuestos principalmente por ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) altamente insaturados, al contrario que los de productos de origen animal, donde el grado de insaturación es más bajo. Cabe destacar también que el porcentaje de estos ácidos grasos poliinsaturados es mayor en peces de agua de mar que en peces de agua dulce (Stansby y Hall, 1967).

El alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados tiene tanto implicaciones saludables por su incorporación en la dieta, ya que se les asocian propiedades antitrombóticas (ácidos grasos omega-3 y omega-6) (Simopoulos et al. 1991), como también tecnológicas, ya que implican un rápido desarrollo del enranciamiento de la carne.

En cuanto a **proteínas**, segundo grupo importante como constituyente, el músculo de pescado tiene 3 grupos principales: estructurales (70-80% del total de proteínas), sarcoplásmicas (25-30% del total de proteínas) y del tejido conectivo (\approx 3% en teleósteos, aunque puede llegar al 10% en elasmobranchios). En las proteínas de pescado podemos encontrar todos los aminoácidos esenciales, lo que les confiere un alto valor biológico.

Un grupo minoritario en cantidad pero importante por el papel que juega en la calidad del pescado es el de **compuestos de nitrógeno no proteico (NPN)**. Estos compuestos de naturaleza no proteica son solubles en agua, tienen peso molecular bajo y contienen nitrógeno.

Los componentes de esta fracción más abundantes son bases volátiles como el amoníaco o el óxido de trimetilamina (OTMA), la creatina, los aminoácidos libres, los nucleótidos y las bases purínicas. El OTMA es un importante constituyente en especies marinas, encontrándose en cantidades del 1 al 5% en el músculo. Sin embargo, tanto mamíferos como peces de agua dulce, suelen carecer de este compuesto o presentarlo en cantidades muy bajas (Anderson y Fellers, 1952; Hebard et al., 1982).

Según la especie y a veces según la época del año, el contenido en **vitaminas y minerales** puede variar. Cabe destacar el contenido en vitaminas del complejo B. El pescado graso es también rico en vitaminas A y D. En general el pescado de origen marino es rico en calcio, yodo y fósforo, y también contiene hierro, cobre y selenio.

Los crustáceos y los moluscos presentan una composición similar, con un alto porcentaje de agua y proteínas. En cuanto a la fracción lipídica, ésta presenta un valor análogo al del pescado magro, mientras que las cantidades de hidratos de carbono presentes en estos organismos son mayores, alcanzando valores de hasta 2g/100g en crustáceos y 4g/100g en moluscos (en pescado el valor más alto es de 1g/100g).

En más del 70% de los hogares españoles se consumen productos de origen marino. En 2011 se consumieron alrededor de 1.230,2 millones de kg (Según datos del MAGRAMA. Guía de las cualidades nutricionales de los productos procedentes de la pesca extractiva y de la acuicultura: binomio riesgo-beneficio). El mayor consumo es de pescado fresco. La información que el consumidor recibe de estos productos es escasa y muchas veces contradictoria, sobre todo en cuanto a las propiedades nutricionales. A continuación se muestran las Tablas 2, 3 y 4, en las que se recopilan las declaraciones nutricionales aplicables a cada tipo de pescado, a crustáceos y a moluscos:

PRODUCTO	NUTRIENTES	DECLARACIONES NUTRICIONALES APLICABLES
PESCADOS	MAGROS (blancos: acedía, bacalao, gallo, merluza,...)	Proteínas <ul style="list-style-type: none"> · Alto contenido de proteínas
	Grasas	<ul style="list-style-type: none"> · Bajo contenido de grasas saturadas · O bien Fuente de ácidos grasos omega-3, o bien Alto contenido de ácidos grasos omega-3 · Fuente de tiamina¹
	Vitaminas	<ul style="list-style-type: none"> · Alto contenido de tiamina¹ · Fuente de niacina · Fuente de vitamina B6¹ · Alto contenido de vitamina B12
	Minerales	<ul style="list-style-type: none"> · Fuente de cobre¹ · Fuente o alto contenido de fósforo · Fuente de potasio · Alto contenido de selenio · Fuente o alto contenido de Yodo¹
	SEMIGRASOS (dorada, lubina, pez espada, rodaballo, sargo,...)	Proteínas <ul style="list-style-type: none"> · Alto contenido de proteínas
	Grasas	<ul style="list-style-type: none"> · Bajo contenido de grasas saturadas (la mayoría) · Alto contenido de ácidos grasos omega-3 · Alto contenido de vitamina A (anguila y congrio) · Fuente de tiamina¹
	Vitaminas	<ul style="list-style-type: none"> · Fuente de riboflavina¹ · Fuente o alto contenido de niacina · Fuente o alto contenido de vitamina B6 · Alto contenido de vitamina B12
	Minerales	<ul style="list-style-type: none"> · Fuente de calcio¹ · Fuente de cobre¹ · Fuente o alto contenido de fósforo · Fuente de magnesio¹ · Alto contenido de manganeso¹ · Fuente de potasio · Alto contenido de selenio · Fuente o alto contenido de yodo¹
	GRASOS (atún, bonito, caballa, melva, salmón,...)	Proteínas <ul style="list-style-type: none"> · Alto contenido de proteínas
	Grasas	<ul style="list-style-type: none"> · Alto contenido de ácidos grasos omega-3 · Alto contenido de vitamina A (anguila y congrio) · Fuente de tiamina¹
	Vitaminas	<ul style="list-style-type: none"> · Fuente de riboflavina¹ · Alto contenido de niacina · Fuente o alto contenido de vitamina B6 · Alto contenido de vitamina B12
	Minerales	<ul style="list-style-type: none"> · Fuente de cobre¹ · Fuente o alto contenido de fósforo · Fuente de hierro¹ · Fuente de potasio · Alto contenido de selenio · Fuente o alto contenido de yodo¹

Tabla 2. Declaraciones nutricionales de crustáceos. (Fuente: MAGRAMA. Guía de las cualidades nutricionales de los productos procedentes de la pesca extractiva y de la acuicultura: binomio riesgo-beneficio).

¹ Declaración nutricional no aplicable a todas las especies del grupo.

PRODUCTO	NUTRIENTES	DECLARACIONES NUTRICIONALES APLICABLES
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">CRUSTÁCEOS</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Octópodos, decápodos y cirrípedos (bogavante, cigala, gamba, langosta, langostino, nécora, percebe,...)</p>	<p>Proteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alto contenido de proteínas <p>Grasas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bajo contenido de grasas saturadas - Alto contenido de ácidos grasos omega-3 <p>Vitaminas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fuente de tiamina 1 - Fuente o alto contenido de riboflavina 1 - Fuente de niacina - Fuente de vitamina B6 - Alto contenido de vitamina B12 <p>Minerales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alto contenido de calcio 1 - Alto contenido de cobre - Fuente o alto contenido de fósforo - Fuente de hierro - Alto contenido de magnesio 1 - Alto contenido de selenio - Fuente o alto contenido de yodo 1 - Fuente de zinc

Tabla 3. Declaraciones nutricionales de crustáceos. (Fuente: MAGRAMA. Guía de las cualidades nutricionales de los productos procedentes de la pesca extractiva y de la acuicultura: binomio riesgo-beneficio).



¹ Declaración nutricional no aplicable a todas las especies del grupo.

PRODUCTO	NUTRIENTES	DECLARACIONES NUTRICIONALES APLICABLES
MOLUSCOS	BIVALVOS (almeja, berberecho, mejillón, navaja,...)	<p>Proteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Alto contenido de proteínas <p>Grasas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Bajo contenido de grasas saturadas – Alto contenido de ácidos grasos omega-3 <p>Vitaminas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Fuente de tiamina 1 – Fuente o alto contenido de riboflavina 1 – Fuente de niacina – Alto contenido de vitamina B12 <p>Minerales</p> <ul style="list-style-type: none"> – Fuente de calcio ¹ – Alto contenido de cobre – Fuente o alto contenido de fósforo – Alto contenido de hierro – Fuente de magnesio ¹ – Fuente o alto contenido de manganeso ¹ – Fuente de potasio – Alto contenido de selenio – Fuente o alto contenido de yodo ¹ – Fuente de zinc
	GASTERÓPODOS (Bígaro)	<p>Proteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Alto contenido de proteínas <p>Grasas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Bajo contenido de grasas saturadas <p>Vitaminas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Fuente de tiamina – Fuente de riboflavina – Fuente de vitamina B6 – Alto contenido de vitamina B12 <p>Minerales</p> <ul style="list-style-type: none"> – Fuente de calcio – Fuente o alto contenido de fósforo – Alto contenido de hierro – Alto contenido de magnesio – Alto contenido de selenio – Fuente de zinc
	CEFALÓPODOS (calamar, sepia, pulpo...)	<p>Proteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Alto contenido de proteínas <p>Grasas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Bajo contenido de grasas saturadas – Alto contenido de ácidos grasos omega-3 <p>Vitaminas</p> <ul style="list-style-type: none"> – Fuente de riboflavina ¹ – Fuente de vitamina B6 ¹ – Alto contenido de vitamina B12 <p>Minerales</p> <ul style="list-style-type: none"> – Alto contenido de cobre – Fuente o alto contenido de fósforo – Alto contenido de hierro ¹ – Fuente de potasio ¹ – Alto contenido de selenio – Alto contenido de yodo ¹ – Fuente de zin

Tabla 4. Declaraciones nutricionales de moluscos. (Fuente: MAGRAMA. Guía de las cualidades nutricionales de los productos procedentes de la pesca extractiva y de la acuicultura: binomio riesgo-beneficio).

¹ Declaración nutricional no aplicable a todas las especies del grupo.

1.2. ALTERACIÓN POST-MORTEM DE LOS RECURSOS PESQUEROS.

Los productos de la pesca son altamente perecederos en comparación con otro tipo de alimentos, debido a la celeridad con la que se desencadenan procesos de degradación tales como ataque microbiano, actividad enzimática endógena, oxidación de los ácidos grasos y pardeamiento no enzimático. Esto es debido al alto contenido de determinados constituyentes químicos (agua, aminoácidos libres, lípidos con alto grado de insaturación, compuestos nitrogenados no proteicos, enzimas autolíticas,...) y al pH poco ácido de su carne.

La rapidez con que se deterioran los productos de la pesca depende de **factores intrínsecos** como la edad, el tamaño, la composición de los tejidos, el estado nutricional y las condiciones fisiológicas del individuo. Es importante también la cantidad y variedad de microorganismos iniciales en el pez, lo que depende del ambiente de origen del animal. Por otra parte, deben tenerse en cuenta los **factores extrínsecos** que influyen de forma importante, como son las condiciones de captura, el tipo de manipulación/procesado y el método de conservación (Murray y Shewan, 1979; El-Marrakchi et al., 1992; Gennari et al., 1999).

A continuación se describen los principales mecanismos de alteración que afectan a las especies marinas:

1.2.1. Mecanismos enzimáticos endógenos.

Los organismos marinos poseen durante su vida una serie de enzimas que desempeñan una actividad fundamental para el desarrollo del individuo. Cuando se produce la muerte del organismo, dichas enzimas pasan a realizar su actividad de forma desordenada, pudiendo dividirse esta actividad en hidrolítica y oxidativa.

Después de la captura, los productos marinos presentan una textura flexible y elástica durante unas horas. A continuación, el cuerpo se vuelve duro y rígido. El pescado se encuentra en *rigor mortis* porque el músculo se contrae. La duración del *rigor mortis* puede ser de uno o dos días, dependiendo de la temperatura de conservación, la manipulación que sufra, el tamaño o las condiciones físicas de los ejemplares. Posteriormente el músculo vuelve a relajarse y recupera la flexibilidad, pero no la elasticidad. Este proceso de *rigor mortis* se produce por los procesos que se describen a continuación.

Tras la muerte del animal el suministro de oxígeno al tejido muscular cesa y no está disponible para la respiración normal, lo que restringe la producción de energía a partir de los nutrientes ingeridos.

La principal vía de producción de energía es la **glucólisis**, que consta de una fase anaeróbica y otra aeróbica, produciendo finalmente dióxido de carbono, agua y adenosina trifosfato (ATP). Al cesar el suministro de oxígeno tras la muerte, la fase aerobia no puede producirse, y la glucólisis genera ácido láctico y ácido pirúvico como productos, de ahí que disminuya el pH en el músculo. Así se reduce considerablemente la producción de **ATP** en comparación a la vía energética aeróbica, ya que depende de la presencia de creatina (en peces teleósteos) o arginina (en cefalópodos), cesando cuando éstas se agotan en anaerobiosis. Esto conlleva que se reduzca la carga neta de proteínas musculares, desnaturalizándose parcialmente y disminuyendo su capacidad de unirse a moléculas de agua.

Ya se han establecido los efectos asociados al *rigor mortis* (aumento del pH, pérdida de agua, disminución del nivel de ATP). El ATP es una fuente de energía ineludible para la

contracción muscular, así como también le aporta plasticidad. Tras el rigor mortis el tejido muscular se reblandece al mismo tiempo que suceden los cambios autolíticos en el músculo. El primero de dichos cambios es la degradación del ATP en ADP, AMP, IMP (inosina monofosfato) e Hx (hipoxantina). La manipulación física del producto acelera estos cambios autolíticos.

Otros cambios del mismo tipo son los debidos a enzimas proteolíticas, como la **descomposición proteolítica** (llevada a cabo por proteasas), que se relaciona con un ablandamiento extensivo del tejido muscular, (ejemplo de ello es el desgarrado del vientre de algunas especies pelágicas) que tiene lugar si los ejemplares se conservan refrigerados.

Asociado también a los productos conservados en refrigeración está el **desarrollo de lipolisis** por la presencia de un gran número de enzimas, como lipasas o fosfolipasas, susceptibles de hidrolizar lípidos de alto peso molecular, como triglicéridos y fosfolípidos, lo que conduce a la formación de ácidos grasos libres, así como otros productos de hidrólisis como diglicéridos, monoglicéridos, bases aminadas, etc. Dichas moléculas son muy reactivas, pudiendo interaccionar con otros constituyentes del músculo, como por ejemplo proteínas, facilitando su desnaturalización y produciendo incluso un descenso del valor nutricional. Estos ácidos grasos libres son más susceptibles de sufrir la oxidación lipídica que los lípidos de mayor tamaño, lo que les confiere una importancia especial. En el pescado magro, la producción de ácidos grasos libres ocurre incluso a temperaturas bajas, y se cree que es por acción de fosfolipasas, que producen cambios intensos en los tejidos (en la consistencia de la carne), originando un medio favorable para hidrólisis por microorganismos.

Los cambios autolíticos en congelación pueden ocurrir, pero lo hacen de forma mucho más lenta. El deterioro está en relación directa con la calidad de la congelación y del producto congelado.

Así, en productos congelados correspondientes a la familia de los gádidos, la principal vía de cambio es la **reducción de OTMA** en DMA (dimetilamina) y FA (formaldehído). Se ha demostrado que el endurecimiento de merluza congelada se correlaciona con la cantidad de formaldehído en el músculo y que la presencia de formaldehído es mayor a mayor temperatura de congelación (Gill et al., 1979). Esta reducción también aumenta si la manipulación previa al congelado no es correcta.

Los cambios a nivel de proteínas en el producto congelado en malas condiciones son fácilmente reconocidos al descongelar el pescado. Normalmente tras la descongelación nos encontramos con un producto brillante, firme y elástico. Si la congelación no ha sido adecuada o ha sido muy prolongada (más de un año) se transformará en opaco y esponjoso. La carne tiende a ceder y romperse y habrá pérdidas importantes de líquido. Al cocinarlos será seco y fibroso. Cuanto menor sea la temperatura de congelación, menor será la desnaturalización de las proteínas.

Dentro de los mecanismos enzimáticos endógenos cabe también mencionar la **oxidación enzimática**, donde la oxidación de los ácidos grasos se produce por la acción de enzimas de tipo lipoxigenasas, peroxidases y oxidasas. Estas enzimas tienen un papel de reducida importancia durante la conservación en estado refrigerado, pero en el caso de la conservación en estado congelado su acción puede ser determinante. Las enzimas son inestables al calor, por lo que tratamientos que impliquen temperaturas elevadas destruirán su actividad.

1.2.2. Mecanismos microbianos.

En especies marinas recién capturadas existen factores como el entorno, la manipulación y el procesado que influyen en el tipo y cantidad de microbiota presente en los ejemplares de la especie marina en cuestión (Shewan, 1977). Los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos de los peces vivos.

Los organismos marinos presentan una serie de características intrínsecas específicas que tienen gran influencia en el crecimiento bacteriano y su degradación: naturaleza poiquiloterma, elevado pH muscular post-mortem, alto contenido de nitrógeno no proteico, presencia de OTMA.

Una gran parte de las bacterias presentes en los organismos marinos deteriorados no desempeñan ningún papel en su alteración (Makarios-Laham y Lee, 1993). Cada especie marina posee sus propias bacterias específicas en su deterioro.

La microbiota presente en los productos marinos consta de psicrófilos Gram negativos (*Pseudomonas*, *Psychrobacter* (*Moraxella*), *Shewanella* y *Flavobacterium*) (Gram et al., 1987; Huss, 1998; Jay, 1971). La mayoría crecen entre 0 y 1°C, pero hay especies de *Pseudomonas* capaces de hacerlo a -3°C aunque sea de forma lenta (Shaw y Shewan, 1968). Son la principal causa de alteración en alimentos refrigerados.

La proliferación de bacterias aerobias (consumidoras de oxígeno) ocasiona la formación de ambiente anaerobio o microaerófilico en el producto. Esto no implica necesariamente que las bacterias anaeróbicas se vean favorecidas en su crecimiento. Hay bacterias que son capaces de llevar a cabo la respiración en anaerobiosis empleando otras moléculas diferentes al oxígeno como aceptoras de electrones, siendo la más común el OTMA. El componente reducido, la trimetilamina (TMA), es uno de los compuestos dominantes del pescado deteriorado.

La producción de TMA está asociada al olor desagradable que aparece en el pescado y otros organismos marinos (al mismo tiempo que el sabor amargo del músculo cocido), cuando el producto ya no es fresco.

Las aminas biógenas son moléculas relacionadas también con la actividad de los microorganismos. Se forman por catálisis de enzimas presentes en las bacterias, que interactúan con aminoácidos libres del pescado. Cabe destacar la histamina como amina biógena que produce intoxicación alimentaria, y que, a niveles elevados puede producir envenenamiento (Taylor, 1986).

Existen numerosos microorganismos alterantes que pueden producir lipasas extracelulares que catalicen la hidrólisis de ésteres de glicerol ayudando a la formación de ácidos grasos libres. La hidrólisis lipídica, por tanto, tendría una componente de origen microbiana, así como la ya mencionada acción de las enzimas endógenas del propio pescado

En el producto congelado, siempre que la temperatura sea lo suficientemente baja – por debajo de 10°C – la acción microbiana se detendrá por el proceso de congelación.

1.2.3. Mecanismos de oxidación no enzimática.

Durante el procesamiento de las especies marinas, además de la ya comentada hidrólisis, la fracción lipídica puede experimentar otro tipo de alteración conocida como oxidación lipídica. Esta reacción termodinámicamente favorable, pero no cinéticamente, requiere la presencia de un catalizador. Como ya se comentó, las enzimas de tipo lipoxigenasa, oxidasa, peroxidasa, etc., pueden facilitar la puesta en marcha de esta alteración (actividad enzimática endógena). Asimismo, otro tipo de catalizadores (de tipo físico-químico; luz, metales de transición, radicales libres, pH, etc.) pueden dar origen a la oxidación lipídica no enzimática.

Estas reacciones (oxidaciones enzimática y no enzimática) dan como resultado la producción de una serie de sustancias, de las cuales algunas tienen sabores y olores desagradables (rancio), mientras que otras contribuyen a cambios en la textura.

La **oxidación** se produce mediante la adición de oxígeno a los dobles enlaces de lípidos, formando una amplia gama de compuestos, la mayoría con funciones oxigenadas. Estas reacciones pueden alterar el valor nutritivo y sensorial del pescado, ya que implican pérdida de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y formación de compuestos volátiles con mal olor (Aubourg, 2004).

La oxidación conlleva la formación de radicales libres. Al producirse ácidos grasos portadores de radicales libres, estos reaccionan con el oxígeno rápidamente transformándose en peróxidos. Dichos compuestos dan lugar a hidroperóxidos (productos de oxidación primaria) al interactuar con ácidos grasos insaturados. Estas moléculas son inestables y siguen originando radicales libres, pudiendo sufrir otro tipo de transformaciones de forma que aparezcan productos de oxidación secundarios como cetonas, alcoholes o aldehídos.

Durante el almacenamiento en congelación tienen lugar cambios en los lípidos, que se ralentizarán al reducir la temperatura. La oxidación de lípidos conduce a sabores y olores desagradables. Esto puede ser un problema en pescado muy graso, y probablemente explica también la mayor parte de los cambios de sabor en pescado magro. La velocidad de oxidación puede reducirse si se acorta la exposición al oxígeno. Esto se puede lograr mediante la introducción de una barrera en la superficie del producto. Así la congelación en bloque mantiene mejor la calidad del producto que la congelación individual. La utilización de material de embalaje, como el plástico utilizado para separar las piezas en un mismo bloque, ayuda también a mejorar la conservación.

1.2.4. Mecanismos de pardeamiento no enzimático.

Bajo la designación de pardeamiento no enzimático se engloba a un conjunto de reacciones complejas que producen en diversos alimentos la formación de pigmentos pardos o negros, así como modificaciones del olor y el sabor, que pueden ser beneficiosas o no para el producto final.

Estas reacciones tienen como sustrato compuestos con funciones de tipo carbonilo, especialmente azúcares reductores o algunas vitaminas. Aminoácidos y proteínas participan como catalizadores por medio de grupos amino libres, produciéndose así un descenso de la disponibilidad de aminoácidos como la lisina, una menor solubilidad y digestibilidad de las proteínas, así como una pérdida de valor nutritivo (Cheftel, 1976).

El pardeamiento no enzimático se acelera por calor, siendo mayor durante las operaciones de cocción, pasteurización y deshidratación. Existen otros factores que afectan a las

reacciones de pardeamiento (velocidad y naturaleza) como el tipo de azúcar reductor, la actividad del agua y el pH.

Las especies marinas poseen un nivel de carbohidratos muy bajo, por lo que son los compuestos formados durante la oxidación de lípidos los que desempeñan el papel de sustrato en las reacciones de pardeamiento no enzimático. En el caso de moluscos y crustáceos, al tener mayor nivel de carbohidratos que el pescado, podremos considerar también su participación pero de manera minoritaria.

Tanto las moléculas de la oxidación primaria como de la secundaria pueden reaccionar con componentes nitrogenados del producto dando lugar a los productos de oxidación terciaria, con el desarrollo de importantes propiedades fluorescente y desarrollo de pardeamiento. En esta alteración se pierden aminoácidos y ácidos grasos esenciales que llevan a la disminución del valor nutricional de las especies marinas.

Las reacciones entre los lípidos oxidados y las proteínas, afectan al valor nutritivo y sensorial del alimento de dos formas: descenso del valor biológico de las proteínas (cambios en los aminoácidos constituyentes) o cambios de digestibilidad (disminución de la velocidad de lipólisis y/o proteólisis).

Las consecuencias de estas reacciones son cambios sensoriales en el producto en distintas formas. En cuanto al olor, se pueden producir nuevos compuestos aromáticos, principalmente desagradables; el producto puede oscurecer su color o pardearse; y la textura puede cambiar por la desnaturalización y entrecruzamiento proteico, dando lugar a pérdidas en la calidad (Aubourg, 2004).

1.2.5. Mecanismos de pardeamiento enzimático.

El pardeamiento enzimático tiene su origen en enzimas propias de los alimentos. Consiste en la transformación de compuestos fenólicos en polímeros coloreados (normalmente pardos o negros) gracias a la actividad de enzimas del tipo polifenol oxidasas.

En especies marinas este mecanismo de alteración solamente tiene interés en el caso de crustáceos, donde las reacciones de melanosis (pardeamiento enzimático) son procesos consecuencia también de la alteración del producto por una conservación excesivamente larga o en condiciones indebidas (Aubourg, 2004). La melanosis produce el oscurecimiento del producto en zonas externas, por lo que su incidencia es enorme a nivel de valor comercial.

Los pigmentos resultantes del pardeamiento enzimático, se designan bajo el término melaninas. Su color final es pardo o negro, pero existe una variedad de colores intermedios (rosa, rojo o azulado).

1.3. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS PESQUEROS

Como ya se ha comentado anteriormente, los productos marinos son altamente perecederos. Por ello deben ser manipulados y elaborados de forma correcta, para que no se produzca una pérdida rápida y significativa de sus valores nutricionales y sensoriales, con la posibilidad de exponer al consumidor al riesgo de sufrir una intoxicación alimentaria.

Debido a la cinética elevada del deterioro *post mortem*, las condiciones de conservación a bordo ejercen un gran efecto sobre la calidad del producto (Ashie et al., 1996). Así, tanto la

manipulación cuidadosa e higiénica como la conservación adecuada, resultan ser medidas clave para garantizar la calidad del producto y alargar su vida útil.

En cuanto a la conservación, existen diferentes técnicas que se pueden dividir en dos tipos, por un lado aquellas que se basan en el control de la temperatura (refrigeración o congelación), y por el otro las que tienen como fundamento el control de la actividad del agua (deshidratación, salado, ahumado o liofilización). Se puede recurrir al control físico de la carga microbiana de los individuos capturados mediante el calentamiento por microondas, la irradiación ionizante o el control químico de la actividad y cargas microbianas gracias a la utilización de ácidos. Existen también métodos basados en técnicas redox como el envasado al vacío. Lo más común es la combinación de dos o más de estas técnicas a lo largo del proceso de conservación del pescado.

La pesca extractiva o de captura sigue siendo la principal fuente de producción de pescado, produciéndose la primera fase de la conservación de los productos pesqueros a bordo de las embarcaciones de pesca.

La flota pesquera española posee una amplia variedad en cuanto a la tipología de las embarcaciones que la componen según las siguientes características: tamaño, arte de pesca utilizada, zona de captura, duración de los periodos actividad “mareas”,.... Si hablamos de conservación de los productos capturados quizá las características que más influyen son la duración de los periodos de actividad, yendo desde horas para la flota artesanal, hasta meses en la flota industrial, y el tamaño de las embarcaciones.

En la flota artesanal la conservación del producto comienza al llegar a tierra, por ser la duración del periodo de captura de unas horas. Las embarcaciones de tamaño medio y cuyas estancias en la mar están en torno a un día, utilizan el hielo en escamas para conservar sus productos. Aquellas embarcaciones de tamaño medio pero que tardan en volver a puerto más de un día, permaneciendo lejos de del mismo hasta veinte días, traen sus capturas principalmente en fresco conservadas en hielo en escamas y refrigeradas. Las embarcaciones de mayor tamaño, que realizan un mayor procesado a bordo y con periodos de actividad desde uno hasta seis meses, conservan sus capturas congeladas hasta el desembarque.

Así, podemos concluir que para la flota española, en las embarcaciones con periodos más largos de actividad, las técnicas de conservación más utilizadas son por un lado la combinación del hielo en escamas y la refrigeración de las capturas, y por otro la congelación de los productos elaborados a bordo. A continuación se detallan las características de dichas técnicas.

1.3.1. Conservación en refrigeración.

1.3.1.1. Aspectos generales de la refrigeración.

La refrigeración es una técnica de conservación de alimentos que se basa en la disminución de la temperatura de los mismos, manteniéndola por encima del punto de congelación – entre 8°C y -1°C –. El efecto del enfriamiento prologando durante la refrigeración y el almacenamiento refrigerado permiten la ralentización de las reacciones químicas y enzimáticas; además, se crean condiciones poco favorables para la proliferación de la microbiota alteradora.

Para una refrigeración efectiva es necesario que la materia prima sea de buena calidad; asimismo, debe emplearse inmediatamente después de la muerte del producto y ser lo más rápida posible.

A pesar del descenso de temperatura, no es posible detener por completo las acciones bacteriana, química y enzimática, por lo que no se evitan completamente los fenómenos de degradación.

La temperatura es un factor importante para frenar la velocidad de degradación del pescado, ya que la velocidad con que se desenvuelven las distintas vías de alteración depende de ella. Así, se acepta que la refrigeración lleva a una extensión de la vida útil de los alimentos, con una mínima consecuencia en sus características nutritivas y organolépticas.

1.3.1.2. Empleo de hielo en escamas.

El hielo en escamas es uno de los métodos más empleado en la conservación de pescado fresco. Se puede definir como un hielo seco y subenfriado en fragmentos pequeños y planos, con forma de oblea irregular. La temperatura de las escamas oscila entre -5 y -7°C.

Las principales ventajas del hielo en escamas son las siguientes:

- Tiene una superficie de intercambio de calor mayor que casi todos los demás tipos de hielo, y por lo tanto, la transferencia de calor entre el pescado y el hielo se produce con mayor rapidez y eficacia.
- Debido a que está ligeramente subenfriado, puede ceder 83 kcal por kg al fundirse transformándose en agua; por consiguiente puede extraer un poco más de calor que otros tipos de hielo cuya temperatura es de 0°C (80 kcal por kg).
- Resulta fácil de almacenar y manipular cuando se dispone de un recipiente termoaislado, subenfriado (-5 °C) y debidamente diseñado para su almacenamiento.
- El hielo puede usarse inmediatamente después de su fabricación (no es necesario triturarlo).

Sin embargo, presenta ciertas desventajas:

- Debido a su mayor superficie, se funde más rápidamente.
- A igual peso, requiere mayor espacio de almacenamiento. Aunque este problema se evita al poseer, la mayoría de los buques, una máquina de fabricación de hielo en escamas.

El hielo en escamas es una herramienta ampliamente utilizada para disminuir la temperatura de los productos pesqueros frescos (Heen, 1982).

Debe resaltarse que los productos marinos son organismos poiquilotermos, con alto contenido en agua y en nitrógeno no proteico, con una estructura muscular y una piel débiles, y un bajo contenido en colágeno. Estas características hacen que estos productos sean especialmente perecederos, necesitando un enfriamiento rápido después de su captura para preservar la calidad.

Los barcos pesqueros que proporcionan producto de origen marino fresco, combinan ambos métodos: hielo en escamas y refrigeración.

1.3.2. Conservación en congelación.

La congelación de alimentos es una forma de conservación que se basa en la solidificación del agua contenida en éstos.

La congelación y el almacenamiento en congelado de los productos marinos permite almacenarlos durante más de un año. Llevar a cabo este proceso a bordo de los buques de pesca ha permitido que estos puedan permanecer en el mar durante largos períodos de tiempo, almacenar pescado durante periodos de pesca abundante con altas tasas de captura, y también ampliar el mercado de productos pesqueros de alta calidad.

Existen tres métodos básicos para congelar pescado:

1. Túneles de congelación: se basa en el flujo continuo de aire frío sobre el producto.
2. Placas de congelación: consiste en congelación del producto por contacto con una superficie fría.
3. Fluido refrigerante (por inmersión o aspersion): el producto se congela al entrar en contacto con el líquido.

A bordo de los barcos la mayor parte del producto es congelado en túnel de congelación, y las placas de congelación se utilizan solamente para producto transformado (filete) de pequeño tamaño.

La ventaja del túnel de congelación es su versatilidad, ya que puede acoger la congelación de una enorme variedad de productos con diferentes formas y tamaños. Se usa aire frío para transferir calor desde el producto que se congela al sistema de refrigeración. Para permitir que el producto sea congelado en un tiempo razonable, la tasa de aire debe ser alta, y el flujo de aire coherente para que la congelación sea uniforme en todos los productos del túnel.

El tiempo de congelación es el tiempo necesario para bajar la temperatura del centro térmico de cada ejemplar desde su temperatura inicial hasta la temperatura deseada. La temperatura final del centro térmico se selecciona en función de la temperatura a la que se vaya a almacenar el producto.

La temperatura de almacenamiento recomendada para el pescado y marisco congelado es de -30 °C para periodos de un año; para asegurar que el pescado se congele rápidamente, la temperatura de congelación debe ser inferior a esta.

1.4. PRODUCCIÓN DE LOS RECURSOS PESQUEROS.

Según las estadísticas de la FAO para el año 2012, la producción total de pescado mundial ha sido de 158 millones de toneladas correspondiendo 91,3 millones de toneladas a la captura por pesca y 66.7 millones de toneladas a la producción acuícola.

La mayor parte de los recursos pesqueros capturados a nivel mundial son destinados al consumo humano como alimento directo (actualmente un 77%), estando el consumo de producto fresco por encima de otros como el pescado en conserva.

El pescado capturado y no destinado a consumo humano directo, en su mayoría, se utiliza para la elaboración de harinas y aceites, que son materia prima de piensos de alimentación animal en su práctica totalidad.

España se encuentra entre los 25 países con mayor producción por pesca a nivel mundial, siendo el único de la Unión Europea que forma parte de dicho ranking (datos FAO 2012).

Según la zona en que pescan, el MAGRAMA divide a la flota española en los siguientes tipos:

- Flota de caladero nacional: flotas que pescan en las zonas del Cantábrico-noroeste, Mediterráneo, Golfo de Cádiz o Canarias. Estas flotas comercializan sus capturas en fresco y tienen periodos de pesca de uno a dos días.
- Flota de caladeros de la Unión Europea: flotas que pescan en el Atlántico, en aguas comunitarias no españolas. La mayoría son buques que conservan de sus capturas principalmente en fresco, aunque determinadas especies muy perecederas pueden congelarse. Existe también cierto número de buques industriales en estos caladeros, que traen sus capturas a puerto congeladas.
- Flota de Caladeros internacionales: estos barcos pescan en aguas internacionales de todos los océanos y en aguas de terceros países. Sus capturas se comercializan congeladas. Son buques factoría que procesan sus capturas a bordo.

La flota que tiene mayores variaciones en la calidad de sus capturas al llegar a tierra es la flota de caladeros de la Unión Europea que conservan la mayoría de sus capturas en fresco, que tienen que mantenerla a bordo alrededor de 15 días. Esta flota desarrolla su actividad principalmente en la zona FAO 27.

Según estadísticas del MAGRAMA, en la zona FAO 27 en el año 2013, la flota española ha capturado un total de 321.901 toneladas de productos pesqueros, siendo la zona de mayor captura para España.

1.4.1. Producción de los recursos pesqueros: caladero de Gran Sol.

Muchas de las especies comercializadas en fresco en nuestro país son capturadas en dicha zona FAO 27, más concretamente en el caladero de Gran Sol, y los barcos que faenan en él deben emplear alrededor de dos semanas en cada marea que realizan. De esta forma, la mercancía desembarcada posee calidades muy diferentes dependiendo del tiempo que lleve a bordo, lo cual se traduce normalmente en un valor comercial muy variable para cada especie.

Esta problemática se convierte en una búsqueda continua por parte de las empresas afectadas, de nuevos métodos de conservación que permitan al consumidor disponer de pescado en las mejores condiciones posibles en cuanto a calidad.

Una de las flotas más representativas del sector pesquero extractivo en Galicia con venta de productos frescos es la de Gran Sol (Grand Sole). Dicha flota destaca asimismo por ser la que tiene un mayor tiempo de marea entre las que comercializan pescado en estado fresco. Por lo cual, la problemática descrita, es junto con el consumo energético de los buques, la principal preocupación de estas empresas pesqueras.

La conservación puede definirse como el método empleado para preservar un producto en un estado determinado o para prevenir posibles daños en el mismo, debidos a la acción de agentes químicos (oxidación), físicos (temperatura y luz) o biológicos (microorganismos).

Por lo tanto, la función principal de la conservación es retrasar el deterioro de los alimentos y prevenir alteraciones de su sabor o, en algunos casos, de su aspecto.

Este objetivo puede lograrse de distintas formas, gracias a procesos de tratamiento como el refrigerado, el enlatado, la deshidratación (secado), el ahumado, la congelación, el envasado y el uso de aditivos alimentarios como antioxidantes o conservantes. Los conservantes se usan principalmente para producir alimentos más seguros para el consumidor, previniendo la degradación de los ácidos grasos insaturados y la acción de agentes biológicos.

El caladero de Gran Sol se encuentra dentro de la ZEE de varios países que forman parte de la Unión Europea, por lo que la regulación de sus aguas también se encuadra dentro de la política pesquera común (PPC) de la Unión Europea.

Como ya se ha mencionado, este caladero es de vital importancia para la flota gallega de altura que pesca en fresco, siendo uno de los puertos clave en el desembarco de sus capturas el Puerto de Vigo. Esta flota opera principalmente en aguas del Sur y del Oeste de Irlanda, correspondientes a las zonas CIEM VI y VII, aunque también se incluyen unidades que pescan en nuestras costas y costas de Francia, sub-área VIII (divisiones VIIIa y VIIIb) tal y como se muestra en la Figura 1.

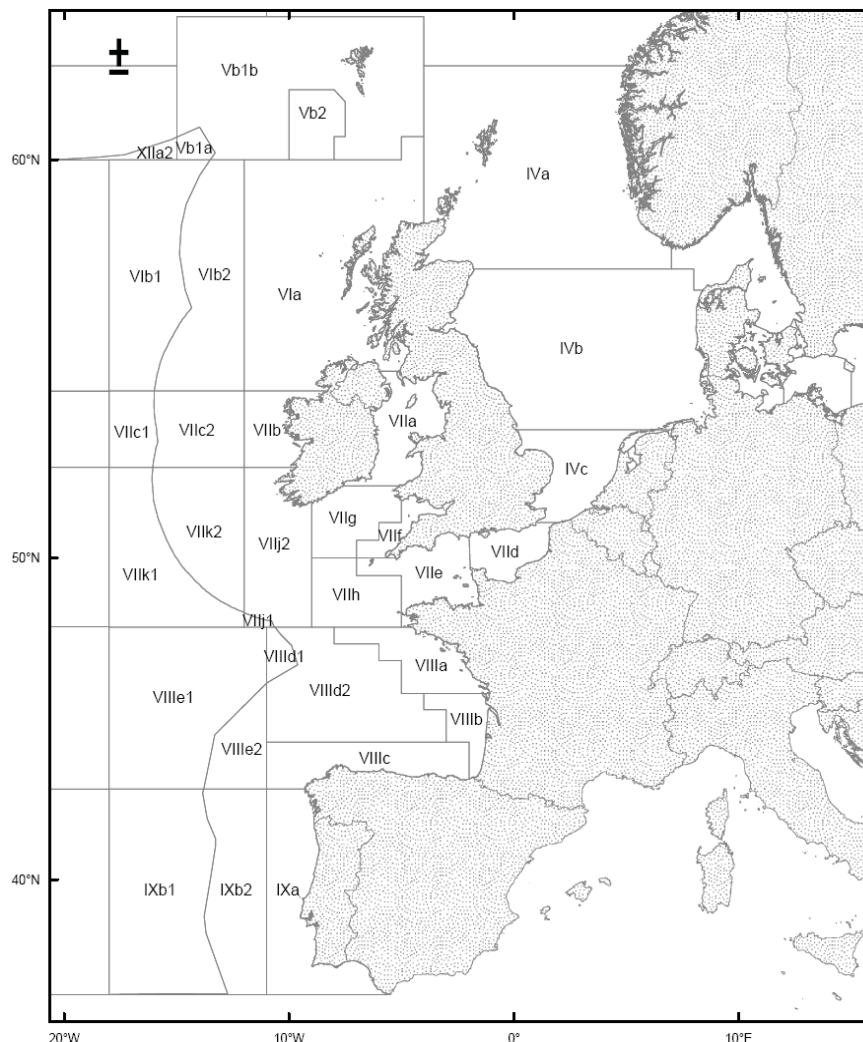


Figura 1: Mapa del caladero de Gran Sol - zonas VI, VII, VIIIa, VIIIb

Las principales modalidades de pesca empleadas en Gran Sol por la flota gallega son el arrastre y el palangre de fondo. Para el Puerto de Vigo, la modalidad más importante que descarga sus capturas en su Lonja de Altura, es el arrastre, cuyas especies objetivo son principalmente el gallo y el rape, aunque también hay barcos que tienen por objetivo la merluza y cigala.



Figura 2: Buque de arrastre tipo de Gran Sol.

Los buques arrastreros de Gran Sol (Figura 2) son parte de la flota de caladeros comunitarios que ya se ha descrito en el apartado anterior, utilizan combinadamente la refrigeración y el hielo en escamas para el transporte de sus capturas a tierra. La congelación se usa en estos barcos en proporción baja, pero es de gran utilidad para especies con alto grado de alteración (jurel o lirio), de forma que en refrigerado no llegan con suficiente calidad a tierra, así como para distintas especies de marisco (cefalópodos y cigala son los más frecuentes). La forma de conservar las capturas a bordo se describe a continuación:

1.4.1.1. Conservación de especies en fresco.

Como se ha comentado anteriormente, la flota de arrastre de Gran Sol almacena sus capturas refrigeradas y estibadas en cajas con hielo en escamas.

La refrigeración es una técnica de conservación que permite prolongar la vida comercial de los productos durante un tiempo relativamente pequeño. El sistema típico de mantenimiento a bordo es la conservación en hielo y almacenamiento en bodegas refrigeradas a temperaturas menores a los 5°C.

El hielo en escamas como medio de enfriamiento del pescado ofrece numerosas ventajas: tiene capacidad refrigerante muy grande y es inocuo, portátil y relativamente barato. Actualmente toda la flota de Gran Sol está dotada de máquinas de generación de hielo en escamas.

Cuando se utiliza hielo en escamas, la transferencia de calor se produce por contacto directo del pescado al hielo, por conducción entre ejemplares adyacentes y por el agua de fusión que se desliza sobre la superficie del pescado.

El pescado en las cajas es colocado sobre una fina capa de hielo, luego cuando la mitad de la caja está llena se pone otra fina capa de hielo, y cuando se consigue el peso de 18.5kg, se

cubre el pescado con una fina lámina de plástico, y a continuación se rellena la caja con hielo. Todas las cajas son estibadas en bodega refrigerada a la temperatura óptima.

1.4.1.2. Conservación de especies en congelado.

La congelación se lleva a cabo para un porcentaje bajo de los productos pescados por esta flota, pero que en determinados periodos del año pueden suponer un alto porcentaje de una campaña efectuada. Esto es así para la cigala y también para determinados cefalópodos.

El proceso es similar para estas especies, ya que se emplea el túnel de congelación tanto para la congelación como para el almacenamiento hasta tierra (las bodegas de estos barcos son solo refrigeradas).

Se clasifican las especies, se limpian con agua de mar y se pasan a las bandejas tipo de los túneles de congelación, envueltas en láminas de plástico. La temperatura marcada es menor a -30 °C.

Al llegar a tierra se desbandejan y se empaquetan en cajas, normalmente de cartón, para su comercialización.

1.4.2. Producción de los recursos pesqueros en fresco: Puerto de Vigo.

Como ya se ha señalado en el apartado anterior, la flota de arrastre de Gran Sol es muy importante para el Puerto de Vigo por lo que supone para la producción de pesca fresca de este puerto. A continuación se muestran los datos que corroboran esta afirmación.

La APVigo hace una división por tipo de flota diferente al MAGRAMA, distinguiendo las siguientes categorías:

- Pesca artesanal.
- Pesca de litoral.
- Pesca de altura.
- Pesca de Gran Altura.

Se podrían realizar las siguientes correlaciones, aunque no sean totalmente exactas: la pesca artesanal y de litoral se corresponde con la flota de caladero nacional. La flota de altura con la de aguas comunitarias no españolas y la pesca de gran altura con la de caladeros internacionales y terceros países.

TIPO DE FLOTA	KILOGRAMOS	% PESO	VALOR €	% VALOR
PESCA ARTESANAL	1.358.866	1,21%	6.553.962	2,33%
PESCA DE LITORAL	10.881.306	9,71%	22.874.478	8,14%
PESCA DE ALTURA	29.240.161	26,10%	104.734.985	37,29%
PESCA DE GRAN ALTURA	70.560.892	62,98%	146.683.284	52,23%
TOTAL	112.041.225	100,00%	280.846.709	100,00%

Tabla 5. Datos de producción total en el Puerto de Vigo para 2013 (Fuente: Memoria anual 2013).

Como muestra la Tabla 5, la flota más importante tanto en kilogramos descargados como en valor generado por ventas es la flota de Gran Altura (flota industrial congeladora), siendo

la siguiente en importancia la flota de Altura, que supone un 26% del total descargado en el Puerto de Vigo en peso y un 37% en valor (Euros).

La flota de altura (aguas comunitarias no españolas) que realiza habitualmente su descarga en la lonja de altura del Puerto de Vigo está compuesta de las siguientes modalidades según el arte empleado para capturar el pescado: arrastre, cerco "atuneros", palangreros (fondo y superficie) y otros (artes fijas de enmalle principalmente).

TIPO DE ARTE	KILOGRAMOS	% PESO	VALOR €	% VALOR
ARRASTRE	21.010.087	71,85%	80.163.887	76,54%
CERCO "ATUNEROS"	9.810	0,03%	33.387	0,03%
PALANGREROS	8.111.007	27,74%	24.316.409	23,22%
OTROS	109.258	0,37%	221.301	0,21%
TOTAL	29.240.162	100,00%	104.734.984	100,00%

Tabla 6. Datos de producción total para la flota de Altura en el Puerto de Vigo para 2013. (Fuente: Memoria anual 2013).

La flota de arrastre de Altura se corresponde con la flota de arrastre de Gran Sol, cuya importancia en producción en pesca fresca en el Puerto de Vigo se refleja en la Tabla 6, siendo ésta mayor al 70% en peso y al 75% en valor (Euros).

En cuanto a especies, las estadísticas del Autoridad Portuaria de Vigo (APVigo) para el año 2013 muestran que las más importantes por volumen de descargas en toneladas son las que aparecen en la Figura 3.



Figura 3: Gráfica con las 10 especies de pescado fresco más descargadas en el Puerto de Vigo (kg) según la APVigo. (Fuente: Memoria anual 2013).

De estas especies, entre las cuatro más abundantes encontramos a las tres principales especies para la flota del caladero de Gran Sol: gallo, rape y merluza (pescadilla).

1.5. MARCO NORMATIVO DE LOS RECURSOS PESQUEROS: LOS DESCARTES EN LA NUEVA POLÍTICA PESQUERA COMÚN (PPC).

Es importante saber qué se define como descarte pesquero. En el texto de la nueva PPC aparece como “**las capturas que se devuelven al mar**”, sin especificar nada a mayores. La FAO en 2010, en su **Informe Sobre Las Directrices Internacionales Para La Ordenación De Las Capturas Incidentales Y La Reducción De Los Descartes**, define los descartes de una forma más específica como “*el pescado muerto o el pescado que no puede sobrevivir tras su liberación en vida que se tira o se pierde*”, entendiéndose entonces que no es descarte las especies vegetales, los productos derivados de la evisceración a bordo, ni las especies capturadas ya muertas.

Se puede decir que el objetivo clave de la nueva PPC es el de **reducir las capturas no deseadas y eliminar gradualmente los descartes**. Así se pretende eliminar los descartes de todas las especies sometidas a Límites de Captura, aunque finalmente se permitirá un margen mínimo de descartes del 7% al inicio, pero que deberá disminuirse al 5% en cuatro años desde el 2015.

Aunque en principio se habla de la prohibición de descartar especies sometidas a Límites de Captura, en general la PPC pretende acabar con la práctica de devolver las especies capturadas y no comercializables, a priori, para consumo humano.

Así la PPC deberá, en particular, según lo establecido en su artículo 2 punto 5:

- a) eliminar gradualmente los descartes atendiendo a las circunstancias de cada caso y a los mejores dictámenes científicos disponibles, evitando y reduciendo en la medida de lo posible las capturas no deseadas y garantizando gradualmente el desembarque de las capturas;
- b) en caso necesario, aprovechar al máximo las capturas no deseadas, sin crear un mercado para dichas capturas por debajo de las tallas mínimas de referencia a efectos de conservación;

Como ya se ha dicho, la prohibición será para aquellas especies actualmente sometidas a limitación de capturas, si bien el objetivo es eliminar los descartes y aprovechar al máximo dichas capturas.

Para el aprovechamiento de las capturas que habitualmente se descartan y que no están sometidas a límite de capturas, se deben definir tanto el nicho de mercado que cabría para su explotación, como su valor nutricional de cara a su comercialización para consumo humano o para otro tipo de consumo (piensos para animales, productos cosméticos,...).

La flota de arrastre de Gran Sol posee un alto porcentaje de descartes, tanto de especies comerciales (en cuyo caso se descartan por talla, limitación de capturas o deterioro en el arrastre) como de especies no comerciales (normalmente descartadas por baja o nula rentabilidad económica – no existe nicho en el mercado o sus características nutricionales no son óptimas o no son conocidas), en las cuales nos estamos centrando por el interés de la búsqueda de su aprovechamiento para consumo humano.

Centrándonos en el consumo humano directo (alimentación), existen una serie de especies actualmente infravaloradas (descartadas), cuyo valor nutricional ya ha sido estudiado y cuya capacidad comercial ha sido valorada. Entre ellas cabe destacar las siguientes pertenecientes al caladero de Gran Sol:

- a) **ARETE:** **Nombre científico:** *Aspitrigla cuculus* (Linnaeus, 1758); **Nombre en inglés:** East Atlantic red gurnard; **Código FAO:** GUR
- b) **GRANADERO:** **Nombre científico:** *Coryphenoides rupestris* (Gunnerus, 1765); **Nombre en inglés:** Roundnose grenadier; **Código FAO:** RNG
- c) **LANGOSTILLA (Araña de mar):** **Nombre científico:** *Munida spp*; **Nombre en inglés:** Squat lobster; **Código FAO:** LOQ

Estas especies son descartadas, según datos del IEO recogidos en el informe “El reto de la reducción de los descartes” para los años 2008-2012, en los siguientes porcentajes: arete 6,5%, langostilla 1.9%, granadero 1.7%.

Se han realizado campañas de promoción con buena aceptación por el consumidor (realizadas por ANASOL en los años 2011 y 2013; <https://langostillas2011.wordpress.com/> y <http://www.idescartes.com/>).

Actualmente, estas especies no están siendo aprovechadas en muchos casos por la dificultad de su conservación a bordo. Por ello es de vital importancia encontrar métodos de conservación que hagan viable su comercialización.



1.6. BIBLIOGRAFÍA

- Ackman, R.G. (1980). Fish lipids. Part 1. In: J. J. Connell (ed.) *Advances in fish science and technology*, Fishing News (Books) Ltd., Farnham, Surrey, 86-103.
- Anderson, D.W. Jr. and C.R. Fellers (1952). The occurrence of trimethylamine and trimethylamine oxide in fresh water fishes. *Food Res.* 17, 472-474.
- Ashie, I., Smith, J. & Simpson, B. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 87–121.
- Asociación de Armadores de Buques en el Gran Sol. *Plataforma de Promoción de Descartes*. 2013. <http://www.idescartes.com/> [Consulta: 20 de noviembre de 2014].
- Asociación de Armadores de Buques en el Gran Sol. *Langostillas. El secreto del Mar*. 2011. <http://langostillas2011.wordpress.com/> [Consulta: 20 de noviembre de 2014].
- Aubourg, S. Fracción lipídica marina. *Revista Industrias de Alimentos*. 2004, Edición bimestral. Marzo/abril y Mayo/junio. Vol. 7, N° 29 y N°30.
- Base de Datos Española de Composición de Alimentos. *Consulta Listados de Alimentos*. 2014. <http://www.bedca.net/> [Consulta: 25 de noviembre de 2014].
- Cheftel, J.C., Cheftel, H. *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Volumen I (ISBN: 84-200-044-8 1976) Y ii (isbn: 84-200-0512-6). Editorial Acribia.
- El Marrakchi, A., Bouchriti, N., Bennour, M., Hamama, A. and Koufail, A. (1992) The bacteriology of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. I- Nature of the bacterial flora. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 10, 61–68.
- Fundación Española de la Nutrición (FEN NUTRICIÓN). *Buscador de Alimentos*. 2014. <<http://www.fen.org.es/>> [Consulta: 25 de noviembre de 2014].
- Gennari M., Tomaselli S., Cotrona V. The microflora of frechs and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored ice. *Food Microbiol.* 1999, 16, 15-28.
- Gill, T.A., R.A. Keith, and B. smith Lall (1979). Textural deterioration of red hake and haddock muscle in frozen storage as related to chemical parameters and changes in myofibrillar proteins. *J. Food. Sci.* 44, 661-667.
- Gram. L., Trolle, G., Huss H.H. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 1987, 4, 65-72
- Hebard, C.E., G.J. Flick and R.E.Martin (1982). Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In: R.E. Martin, G.J. Flick and C.E. Hebard (eds.), *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, AVI, Westport, CT, USA, 149-304.
- Heen, E. 1982. Developments in chilling and freezing of fish. *International Journal of Refrigeration*, 5, 45-49.
- Huss, H. H. 1998. *El pescado fresco: Su calidad*. Documento técnico de pesca n°348. FAO. Roma. Italia.
- Jay, J. 1971. *Microbiología moderna de los alimentos*. (Ed.) Acribia, Zaragoza, España, 320 pp.

Kent, M., L. Alexander and R.H. Christie (1992). Seasonal variation in the calibration of a microwave fat:water content meter for fish flesh. *Int. J. FoodSci. Technol.* 27, 137-143.

LOSADA-IGLESIAS, Vanesa. Aplicación de técnicas basadas en hielo líquido en la comercialización de productos marinos: Efectos sobre los cambios químicos relacionados con la pérdida de calidad. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo: Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, 2006.

Makarios-Laham, I., Lee T.C. Protein hydrolysis and quality deterioration of refrigerated and frozen seafood due to obligately psychrophilic bacteria. *J. Food Sci.* 1993. 58, 310-313.

Murray, C.K. and J.M. Shewan (1979). The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrotrophs. In: Russell, A.D. and R. Fuller (eds.) *Cold tolerant microbes in spoilage and the environment*, Academic Press, 117-136.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA); Centro Técnico Nacional de Conservación de Productos de la Pesca y la Acuicultura (ANFACOCECOPECA). Guía de las cualidades nutricionales de los productos procedentes de la pesca extractiva y de la acuicultura: binomio riesgo-beneficio. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). 2012.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). *Almacenamiento congelado y refrigerado en las pesquerías*. FAO DOCUMENTO TÉCNICO DE PESCA 340. Editado por W.A. Johnston, F.J. Nicholson, A. Roger and G.D. Stroud. CSL Food Science Laboratory. Torry, Aberdeen, Scotland, UK. 1994. <<http://www.fao.org/docrep/003/V3630E/V3630E00.HTM>> [Consulta: 10 de diciembre de 2014]

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). *El pescado fresco: su calidad y cambios en su calidad*. FAO DOCUMENTO TÉCNICO DE PESCA 348. Editado por H.H.Huss. Laboratorio Tecnológico. Ministerio de Pesca. Dinamarca. 1998. <<http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s00.htm#Contents>> [Consulta: 1 de diciembre de 2014].

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). *El uso de hielo en pequeñas embarcaciones de pesca*. FAO DOCUMENTO TÉCNICO DE PESCA 436. Michael Shawyer y Avilio F. Medina Pizzali. Roma. 2005. <<http://www.fao.org/docrep/008/y5013s/y5013s00.htm>> [Consulta: 1 de diciembre de 2014]

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). *Departamento de Pesca y Acuicultura*. 2014. <http://www.fao.org/fishery/es> [Consultas: Diciembre de 2014].

Pérez N.; Araujo, H.; Salinas, I. *El reto de la reducción de los descartes 2015-2019*. Informe. Instituto Español de Oceanografía C.O. de Vigo: Grupo de Investigación IBDES dentro del Programa de Evaluación de Recursos Pesqueros en el área del ICES. Diciembre de 2014.

PUERTO DE VIGO, Autoridad Portuaria de Vigo. *Memoria anual 2013 del Puerto de Vigo*. 2014. <http://www.apvigo.com/control.php?sph=a_iap=1423%%p_rpp=1> [Consulta: 27 de diciembre de 2014]

SANJUÁS-REY, Minia. *Aplicación de sistemas avanzados para la mejora de la calidad de productos marinos refrigerados de interés comercial*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago: Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, 2012.

Shewan, J.M. (1977). The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: Proceedings of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish., Tropical Products Institute, London. 51-66.

Simopoulos, A.P, R.R. Kifer, R.E. Martin, and S.W. Barlow (1991). Health effects of w 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. Karger, Basel.

Stansby, M.E. and A.S. Hall (1967). Chemical composition of commercially important fish of the USA. Fish Ind Res., 3, 29-34.

Taylor, S. L. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. CRC Critical Reviews in Toxicology, 17, 91-128.





2. PUNTO DE PARTIDA, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. PUNTO DE PARTIDA DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA.

La actual demanda creciente del consumidor para los productos frescos de alta calidad ha llevado a la búsqueda de tratamientos ventajosos y prácticos que puedan proporcionar la mejora de las posibilidades comerciales de dichos productos.

El punto de partida de este trabajo fueron una serie de experimentos previos realizados al amparo de un proyecto financiado por la Xunta de Galicia dentro del Programa Sectorial de Tecnologías de la Alimentación con código PGIDIT08TAL038E, cuyo objetivo global fue la investigación de la influencia de una fórmula comercial basada en ácidos naturales con efectos preservantes (BPS2) para la definición de las concentraciones y condiciones de uso adecuadas en la inhibición de la alteración de propiedades y alargamiento del tiempo de vida útil de importantes productos comerciales del pescado.

Este estudio proporcionó una primera aproximación a una nueva estrategia de conservación en almacenamiento refrigerado, que empleó una mezcla de diferentes ácidos orgánicos conservantes (ascórbico, cítrico y láctico) para la formación de hielo en escamas. Así, se aplicó el hielo preparado a partir de agua incluyendo dos concentraciones diferentes de la fórmula comercial a base de la mezcla de los ácidos mencionados a tres especies importantes de pescado comercial no graso (merluza, *Merluccius merluccius*; gallo, *Lepidorhombus whiffiagonis*; rape, *Lophius piscatorius*). Se evaluaron la oxidación e hidrólisis lipídicas durante el almacenamiento refrigerado con el hielo preparado a partir de la fórmula comercial (hasta 12-15 días) y se compararon los resultados con los obtenidos para pescado almacenado refrigerado con hielo tradicional preparado solo con agua. De forma complementaria también se llevó a cabo una evaluación sensorial.

Se obtuvo la inhibición parcial del desarrollo de la **oxidación lipídica** para las 3 especies de pescado (merluza, rape y gallo) como resultado de la presencia de los ácidos orgánicos en el hielo de conservación, en concordancia con investigaciones anteriores, donde AA, y CA demostraron tener un efecto antioxidante eficaz cuando se aplicaron como tratamiento preliminar.

En cuanto a la hidrólisis lipídica, la presencia de ácidos orgánicos en el sistema de formación de hielo supuso una **inhibición de la actividad microbiana** durante fases avanzadas del almacenamiento en refrigeración en las tres especies. Fue la primera vez que se describió este efecto en pescado magros. Dada su capacidad acidulante, los tres ácidos pueden considerarse como responsables de esta inhibición microbiana (Whittle et al., 1990; Ashie et al., 1996).

En cuanto a la **evaluación sensorial**, se observó una disminución generalizada de la calidad como resultado del aumento del tiempo de almacenamiento refrigerado. Se obtuvo un mayor tiempo de vida útil para los ejemplares del lote de mayor concentración en comparación con los otros dos (menor concentración y control)..

Esto llevó a concluir que la incorporación del producto BPS-2, constituido por ácidos orgánicos naturales, en el hielo en escamas permitió inhibir parcialmente la oxidación e hidrólisis lipídicas en producto refrigerado, lo que se correlacionó con la extensión de la vida

útil. La hidrólisis lipídica fue más relevante que la oxidación en todas las especies de pescado evaluadas. Este estudio permitió desarrollar los capítulos posteriores, en los que se tuvieron en cuenta la acción complementaria de los ácidos orgánicos utilizados.

Estos resultados están recogidos en la publicación “García-Soto, B., Sanjuás, M., Barros-Velázquez, J., Fuertes-Gamundi, R. & Aubourg, S. Preservative effect of an organic acid-icing system on chilled fish lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2011, 113, 487–496”.

El principal problema encontrado fue el desconocimiento de las concentraciones exactas de cada uno de los ácidos presentes en la mezcla (concentraciones individuales exactas de cada ácido), de forma que no era posible modificar la presencia de cada uno de los ácidos al objeto de optimizar el resultado. Sin embargo, este estudio permitió abrir un campo de investigación enfocado a la mejora en la conservación de productos pesqueros, cuya principal característica fuese la posibilidad de su aplicación a bordo. Esta investigación perseguiría el aumento de la vida útil de los productos capturados y almacenados en refrigeración en el barco, así como la búsqueda de nuevas posibilidades de mercado para especies con dificultades de conservación a bordo. De esta forma se propuso el inicio de una serie de trabajos bajo el objetivo de “evaluar metodologías avanzadas de conservación de especies marinas capturadas por la flota gallega de caladeros comunitarios” y cuyos Objetivos y Plan de Trabajo se describen a continuación.



2.2. OBJETIVOS PERSEGUIDOS

El objetivo global del presente estudio es desarrollar y probar metodologías novedosas de conservación de productos marinos basadas en el empleo de sustancias preservantes, de forma que se inhiba parcialmente la alteración del producto y se alargue el tiempo de vida útil de las especies comerciales tratadas. Estas metodologías novedosas estarán encaminadas a realizarse a bordo de buques de pesca, teniendo en cuenta sus características técnicas (espacio y maquinaria a bordo) y métodos de trabajo (actividad en el parque de pesca – zona de elaboración).

La flota gallega en la que el reto de la conservación es mayor, como ya se ha mencionado en la introducción del presente trabajo, es en la de Gran Sol, pues sus barcos traen la mayoría de sus capturas en fresco tras una permanencia prolongada a bordo. Dentro de la flota de Gran Sol se ha elegido a la flota de arrastre por su representatividad en el Puerto de Vigo.

Dentro del objetivo global podemos definir una serie de objetivos parciales:

1. Mejorar la conservación de especies objetivo mediante la aplicación de ácidos orgánicos naturales con propiedades preservantes.
2. Mejorar la conservación de especies objetivo mediante el uso en el almacenamiento de una lámina de plástico biodegradable con propiedades preservantes.
3. Estudiar la conservación de una especie infravalorada e infrautilizada mediante la adición de compuestos preservantes.
4. Verificar a nivel de laboratorio que las nuevas metodologías propuestas proporcionan un efecto preservante.
5. Favorecer la innovación en las metodologías de conservación pesquera, probando, cuando sea posible, su aplicación a bordo.

Partiendo de los experimentos previos descritos en el punto anterior, se ha llevado a cabo el siguiente Plan de Trabajo preestablecido para alcanzar tanto el objetivo global, como cada uno de los objetivos parciales.

2.3. PLAN DE TRABAJO

Teniendo en cuenta los objetivos, la flota de estudio (arrastre de Gran Sol con descarga en el Puerto de Vigo) y los resultados de los experimentos previos descritos en apartado 2.1, se definió el plan de trabajo en tres partes:

2.3.1. PARTE 1. Aplicación de hielo incluyendo componentes conservantes naturales.

Se basa en la utilización de ácidos orgánicos naturales para la preservación de especies objetivo de la flota de Gran Sol: gallo (*Lepidorhombus spp*), merluza (*Merluccius merluccius*) y rape (*Lophius spp*).

Para ello se tiene en cuenta la adaptación de la metodología de uso de los ácidos al trabajo a bordo, concluyendo que el método de aplicación más fácil es incluir los ácidos en el hielo utilizado durante la conservación del pescado en refrigeración.

Se pretende conseguir la mejora en la preservación de las capturas mediante la aplicación de ácidos orgánicos naturales con capacidad conservante conocida (ácido cítrico, ácido láctico y ácido ascórbico) pero poco estudiada en pescado, de forma que se obtenga la/s concentración/es óptima/s para su utilización, mediante su inclusión en hielo, susceptible de utilizarse a bordo de la flota pesquera de arrastre de Gran Sol.

Por tanto estos ácidos se aplicarán en el hielo de refrigeración partiendo de una disolución acuosa de dichos ácidos preparada en el laboratorio, y teniendo en cuenta los resultados del estudio previo con fórmula comercial descritos en el punto 2.1 del presente trabajo.

A esta parte corresponden los capítulos 1, 2 y 3 de la PARTE 1 de la sección de Resultados y Discusión.

2.3.2. PARTE 2. Aplicación de láminas biodegradables incluyendo componentes conservantes.

Tiene como objeto la utilización de láminas biodegradables que incluyen compuestos conservantes para la preservación de una de las especies objetivo de la flota de Gran Sol: gallo (*Lepidorhombus spp*).

Nuevamente se tiene en cuenta la adaptación de la metodología de trabajo a bordo para la propuesta del método de conservación innovador. En el almacenamiento en refrigerado, se utiliza habitualmente una fina capa de plástico no biodegradable entre la capa de hielo en escamas superior y el pescado. Se pretende utilizar este hábito para la introducción por una parte de plástico biodegradable (respetuoso con el medioambiente) y por otra la de sustancias preservantes integradas en dicha lámina.

Se utilizará como base para la lámina el ácido poliláctico (PLA), un material polimérico sintetizado utilizando monómeros de naturaleza biológica. A esta matriz se le añadirán ácido sórbico (en disolución) y extracto de algas (alga pulverizada), ambos con probada acción preservante. El alga es un macroalga con presencia en la costa gallega, de forma que su obtención es fácil: *Fucus spiralis*. Las láminas serán obtenidas mediante extrusión (proceso a elevada temperatura donde en la matriz de PLA se mezclan el sórbico y el alga, pasando a continuación por un prensado que permite obtener láminas de poco espesor).

Mediante la utilización de estas láminas biodegradables se intentará conseguir una mejora en la conservación de las especies mencionadas.

Esta parte será expuesta en el capítulo 4 de la Parte 2 de la sección de Resultados y Discusión.

2.3.3. PARTE 3. Aptitud tecnológica de una especie infravalorada (*Munida spp*): conservación en refrigeración y congelación.

Se trata de valorar la posible conservación a bordo de una de las especies descartadas en Gran Sol, a la cual se le conoce el valor nutritivo gracias a un proyecto de investigación IN.CI.TE (financiado por la Xunta de Galicia), realizado por la Cooperativa de Armadores de Pesca de Vigo entre los años 2007 y 2010 titulado “**Estudio de las posibilidades de la utilización de varias especies de crustáceos descartadas por la flota gallega en sus pesquerías tradicionales en las costas de Galicia, Portugal y Gran Sol**”, entre las cuales se encontraba la langostilla (*Munida spp*) con resultados óptimos en la valoración para consumo humano. (Ficha técnica del proyecto: <http://www.arvi.org/innovapesca/fichas/3.5.%20FICHA%20TECNICA.pdf>).

Respecto a sus cualidades organolépticas, durante el proyecto se comprobó que su sabor era similar al de la cigala, al igual que su textura, por lo que se verificó su potencial comercial.

Una vez seleccionada la especie, se establece un plan para su conservación, tanto en refrigeración como en congelación, para lo cual se probará el efecto de varias concentraciones de metabisulfito sódico (agente antimelanósico que inhibe las reacciones que causan el pardeamiento enzimático post mortem en crustáceos). Dicho agente será aplicado mediante inmersión en agua con una concentración conocida.

Tras el tratamiento con metabisulfito las capturas seguirán dos vías de conservación: refrigeración con hielo en escamas y congelación (vías de conservación disponibles a bordo de un barco de Gran Sol).

Se pretende obtener una concentración óptima de metabisulfito sódico que permita la conservación de la langostilla a bordo para la apertura de un nicho de comercialización que lleve al aprovechamiento de una especie actualmente descartada y cumplir así con las directrices de la nueva Política de Pesca Común de la Unión Europea.

Esta parte será referida en los capítulos 5 y 6 de la sección de Resultados y Discusión.

2.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO

Las especies de estudio son el gallo (*Lepidorhombus spp*), la merluza (*Merluccius merluccius*), el rape (*Lophius spp*) y la langostilla (*Munida spp*), todas capturadas por la flota de Gran Sol. A continuación se describe cada una de ellas.

2.4.1. Gallo (*Lepidorhombus spp*).

Existen dos especies de gallo capturadas por la flota de Gran Sol: gallo de cuatro manchas (*Lepidorhombus boscii*) y gallo del norte (*Lepidorhombus whiffiagonis*). Son peces planos, con ojos en la parte dorsal mirando a la izquierda. Cuerpo ovalado, alargado y comprimido. Escamas de tamaño pequeño. Boca con mandíbula inferior prominente. Aletas

dorsal situada cerca de la boca. Poseen aleta caudal rematada en punta obtusa. Las aletas pectorales son asimétricas, siendo de mayor tamaño la dorsal y la línea lateral presenta una curvatura pronunciada.

La principal diferencia entre las dos especies es el color; así *Lepidorhombus whiffiagonis* es de un color más pardo o gris rosáceo, con pequeñas manchas oscuras, mientras que *L. boscii* es gris pardusco o ceniza, con dos manchas negras características en la parte posterior de la aleta dorsal y anal (Figuras 4 y 5). Otra diferencia está en el tamaño medio, que en *L. whiffiagonis* está entre 60 y 75cm y en *L. boscii* entre 35 y 40cm.



Figuras 4 y 5. Imágenes de las dos especies de gallo: *L. boscii* y *L. whiffiagonis* respectivamente.

Es un pez bentónico, con una capacidad natatoria reducida, moviéndose principalmente por ondulación sobre fondos blandos (arenosos o arcillosos). Es carnívoro, se alimenta de pequeños peces, crustáceos y moluscos. La época de reproducción es entre marzo y abril, cuando realizan la puesta.

Se encuentra normalmente a una profundidad de entre 100 y 400m, aunque pueden vivir hasta profundidades de 900m.

La distribución se puede ver en la Figura 6, aunque cada especie tiene su zona de mayor abundancia. Mientras el *L. whiffiagonis* abunda más en aguas atlánticas, el *L. boscii* es más común en la zona del Mediterráneo.



Figura 6. Mapa de distribución de *Lepidorhombus* spp.

La especie capturada en un porcentaje mayor por la flota de Gran Sol es el *Lepidorhombus whiffiagonis*,

Para esta especie se ha establecido una valoración nutricional. Al ser un pescado blanco, su contenido en grasa es bajo (en torno a 1.9g por cada 100g de carne). Es rico en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y con alto valor proteico. Respecto al aporte mineral, destacan el selenio y el fósforo (con un aporte de hasta el 40% de las ingestas diarias recomendadas) y con menor importancia el yodo y el magnesio (aportes de hasta el 15%). La vitamina B12 es la mayoritaria para este género, seguida por la B6.

2.4.2. Merluza EUROPEA (*Merluccius merluccius*).

Este pez pertenece a la familia de los *gádidos*, con cuerpo cilíndrico y alargado, con cabeza grande y plana en la parte superior, y un maxilar grande que finaliza a la altura del ojo. La mandíbula inferior sobresale a la superior, con numerosos dientes. Posee dos aletas dorsales, una aleta anal y otra caudal en forma de horquilla. También presenta dos aletas pectorales y dos pelvianas.

Su color es gris azulado o metálico en la parte dorsal y blanca plateada en la parte ventral (Figura 7). Puede llegar a medir más de 1.5m, pero el tamaño medio está entre 20 y 60cm. La época de reproducción se ha registrado a finales de invierno y en la primavera.



Figura 7. Imagen de la especie *Merluccius merluccius*.

Se conoce comúnmente como merluza europea, ya que existen muchas variedades de merluza (argentina, negra, del Cabo,..).

Se encuentra habitualmente entre los 150 y 1.000m de profundidad. Es un animal carnívoro voraz y agresivo (se ha descrito canibalismo en la especie). Vive cerca del fondo, por lo que es demersal, aunque durante la noche puede subir a la superficie a cazar. Se alimentan de peces menores, calamares,...

Su distribución geográfica es amplia, desde la costa atlántica de Europa y el oeste de África del Norte, hacia el norte a Noruega e Islandia, hacia el sur a Mauritania. También se encuentra en el mar Mediterráneo y en la costa sur del Mar Negro, tal y como se muestra en la Figura 8.

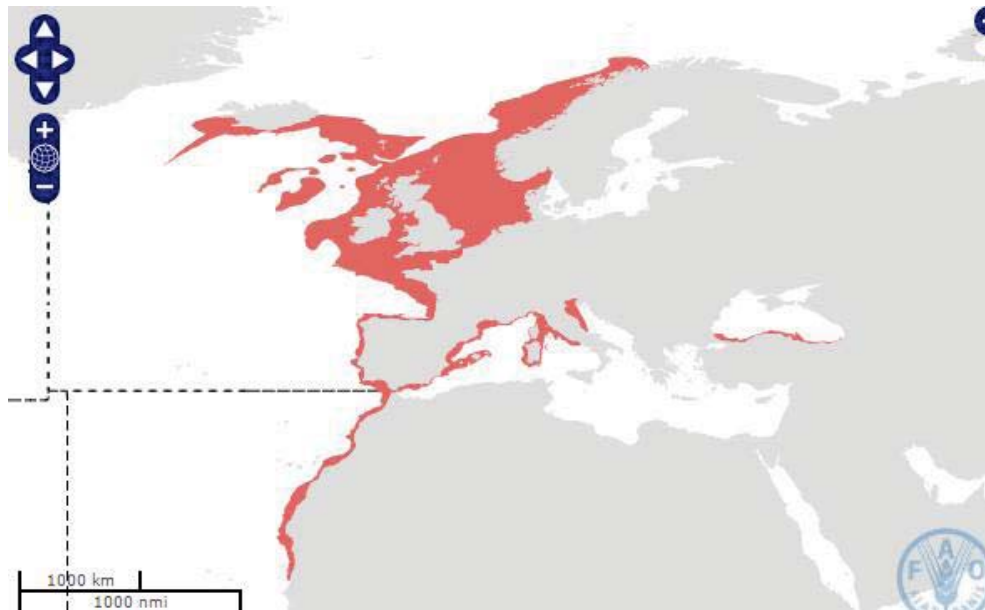


Figura 8. Mapa de distribución de la especie *Merluccius merluccius*.

El valor nutricional asociado a esta especie magra (pescado blanco) detalla un porcentaje de grasa inferior al 3%, destacando la presencia de ácidos grasos poliinsaturados omega 3. Presenta alto contenido en proteínas de alto valor biológico. Es fuente de minerales como el selenio y el fósforo, así como de hierro, potasio y magnesio, aunque en menor medida. La vitamina B12 es la más destacable, siendo dignas de mención la niacina, la vitamina B6 y la tiamina.

2.4.3. Langostilla (*Munida spp*).

Langostilla o araña de mar, son denominaciones que agrupan a especies del género *Munida* capturadas en el Atlántico Norte y el Mediterráneo (Figura 13). Sin embargo, el género *Munida*, posee especies que están presentes también en otros océanos como el Pacífico.



Figura 13. Mapa de distribución de langostilla.

Al ser un género descartado en la zona de pesca de Gran Sol, no se han realizado muchos estudios en cuanto a la composición de especies, biología y valor nutricional.

Pertenece a la familia de los *galateidos*, que agrupa cangrejos anomuros de cuerpo deprimido dorsoventralmente. Posee caparazón duro cubriendo cabeza y tórax más largo que ancho con espinas en el borde que se extienden lateralmente por el cefalotórax. El rostro está bien desarrollado. Cabeza y tórax están divididos en metámeros. El género *Munida* presenta 3 espinas frontales largas y afiladas, el rostro sobrepasa los ojos. El abdomen posee 6 metámeros. Es simétrico y puede plegarse centralmente.

Se asocian a sustratos blandos, preferentemente fango o arena y se encuentran en un amplio rango batimétrico (se han encontrado ejemplares hasta 800m).

Basándonos en el ya mencionado proyecto “Estudio de las posibilidades de la utilización de varias especies de crustáceos descartadas por la flota gallega en sus pesquerías tradicionales en las costas de Galicia, Portugal y Gran Sol”, podemos decir que en la zona de Gran Sol se presentan 4 especies principales: *M. sarsi*, *M. tenuimana*, *M. rugosa* y *M. microphthalmia*, siendo la más común la *M. sarsi*.

Es un animal detritívoro demersal consumidor de depósitos superficiales principalmente, aunque también puede ser depredador. Su reproducción muestra una marcada estacionalidad.

Respecto a su composición nutricional, como buen organismo marino el porcentaje de agua es elevado, y como posee caparazón también lo es el de cenizas. Su composición lipídica y proteica se encuentran en el rango de otros crustáceos, y no posee cantidades elevadas de metales perjudiciales para la salud como cadmio, plomo y mercurio, basándonos en datos del estudio mencionado anteriormente.

Se comprobó que la textura y sabor eran similares a los de camarón o cigala.



2.5. BIBLIOGRAFÍA

Ashie, I., Smith, J. & Simpson, B. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 87–121.

Cooperativa de Armadores de Pesca del Puerto de Vigo (ARVI). Utilización de crustáceos Descartados. 2010. <<http://www.arvi.org/innovapesca/fichas/3.5.%20FICHA%20TECNICA.pdf>> [Consulta: 9 de enero de 2015].

Cooperativa de Armadores de Pesca del Puerto de Vigo (ARVI). Valorización de descartes del atlántico y mediterráneo. 2008. <<http://www.arvi.org/innovapesca/fichas/3.3.%20FICHA%20TECNICA.pdf>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Cooperativa de Armadores de Pesca del Puerto de Vigo (ARVI). Promoción de productos. 2015. <<http://www.arvi.org/idi-innovapesca/promocion-de-productos.html>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

García-Soto, B., Sanjuás, M., Barros-Velázquez, J., Fuertes-Gamundi, R. & Aubourg, S. Preservative effect of an organic acid-icing system on chilled fish lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2011, 113, 487–496.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [En línea]. *Species Fact Sheets: Lepidorhombus whiffiagonis (Walbaum, 1792)*. 2015. <<http://www.fao.org/fishery/species/2560/en>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [En línea]. *Species Fact Sheets: Merluccius merluccius (Linnaeus, 1798)*. 2015. <<http://www.fao.org/fishery/species/2238/en>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Froese, R. FishBase [En línea]. *Lepidorhombus whiffiagonis. (Walbaum, 1792)*. 2015. <<http://www.fishbase.org/summary/Lepidorhombus-whiffiagonis.html>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Froese, R. FishBase [En línea]. *Merluccius merluccius (Linnaeus, 1798)*. <<http://www.fishbase.org/summary/Merluccius-merluccius.html>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Froese, R. FishBase [En línea]. *Lepidorhombus boscii (Risso, 1810)*. 2015. <<http://www.fishbase.org/summary/Lepidorhombus-boscii.html>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). *Gallo*. http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/gallo_tcm7-315702.pdf [Consulta: 10 de enero de 2015].

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). *Merluza*. <http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/merluza_tcm7-315709.pdf> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). *Galateidos*. <http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/0012galateidos_tcm7-355002.pdf> [Consulta: 10 de enero de 2015].

NAFC Marine Centre [En línea]. *Imagen*. 2015. <<http://www.nafc.uhi.ac.uk/departments/marine-science-and-technology/research/research-activities/megrim3.JPG>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Plataforma de Promoción de Descartes (www.idescartes.com). *Arete, Granadero, Langostilla*. 2013. <<http://www.idescartes.com/especies.php>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

SeaLifeBase. *Species under Munida*. 2015. <<http://www.sealifebase.fisheries.ubc.ca/nomenclature/SpeciesList.php?genus=Munida>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

World Register of Marine Species (WoRMS). *Munida sarsi, Huus, 1935*. 2014. <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=107163>> [Consulta: 10 de enero de 2015].

Whittle, K., Hardy, R., Hobbs, G., Chilled fish and fishery products. in: Gormley, T. (Ed.), *Chilled Foods. The State of the Art*, Elsevier Applied Science, New York (USA) 1990, pp. 87–116.





3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN APLICADOS

De acuerdo con las tres partes establecidas en el Plan de Trabajo, se han aplicado los siguientes métodos de conservación innovadores:

3.1.1. Aplicación de hielo incluyendo componentes conservantes.

Se preparó hielo en escamas fabricado a partir de disolución conocida de una mezcla de ácidos orgánicos naturales con capacidad preservante de cara a su utilización durante el almacenamiento en refrigeración de pescado fresco.

Para la preparación del hielo a partir de disolución conocida de ácidos orgánicos naturales se utilizó una mezcla de ácidos cítrico y láctico preparada en laboratorio (Capítulos 1-3)

Se llevaron a cabo ensayos preliminares para establecer la concentración óptima de ácido cítrico, ácido láctico y ácido ascórbico que deberían utilizarse para preparar el hielo. Se evaluaron las modificaciones en la apariencia externa del pescado como resultado de la presencia de los ácidos en el hielo. Según los resultados obtenidos, se eligieron las combinaciones más apropiadas.

Se prepararon tres soluciones acuosas incluyendo los siguientes valores de concentración (w/v) de ácido cítrico y ácido láctico respectivamente: 0.075% y 0.050% (lote C-75), 0.125% y 0.050% (lote C-125) y 0.175% y 0.050% (lote C-175). Se descartó el ácido ascórbico porque no parecía aportar ningún efecto a mayores, esto puede deberse a que su acción es básicamente antioxidante y las especies estudiadas (gallo y merluza) son especies magras.

Todas las disoluciones se envasaron en bolsas de polietileno y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su uso. El hielo tradicional partió de agua sin ácidos (control; lote C-0), congelada de igual forma que las soluciones con ácido. Antes de añadirlos a los especímenes en los lotes, se molió el contenido de las distintas bolsas, para obtener hielo en escamas. Como ya se mencionó en la sección anterior, los ácidos orgánicos utilizados se consideran seguros (GRAS) para su uso en alimentos de acuerdo a las administraciones europeas y americanas (Giese, 1996; Madrid et al., 1994).

En el experimento del capítulo 1 se ensayaron las tres condiciones (lotes C-75, C-125 y C-175), mientras que en el del capítulo 2 se ensayaron solo las condiciones de los lotes C-125 y C-175.

Tras estos dos experimentos se eligió la condición del lote C-125 para ensayar a bordo de un buque de Gran Sol, con la misma metodología que en el laboratorio, dando lugar al capítulo 3.

3.1.2. Aplicación de láminas biodegradables incluyendo componentes conservantes.

Se utilizaron láminas biodegradables con compuestos preservantes en su matriz, aplicadas como interfase entre el pescado fresco y el hielo en escamas durante el almacenamiento en refrigeración (Capítulo 4).

Las láminas biodegradables basadas en ácido poliláctico (PLA) se obtuvieron por medio de un proceso de extrusión. Se utilizó PLA comercial (Bio-Flex® F 6510, FKUR Kunststoff GmbH; Willich, Alemania) con un índice de flujo de fusión (MFI) de $4,3 (\pm 0,2) \text{ g } 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ (190°C, 2,16 kg) y una densidad de $1,29 (\pm 0,01) \text{ g cm}^{-3}$. El alga liofilizada *Fucus spiralis* fue suministrada por PORTOMUÑOS (Cerceda, A Coruña, España) y se incorporó al biofilm en una concentración de 8% (W/W, alga/PLA). El ácido sórbico (Merck, Darmstadt, Alemania) fue incorporado en dos concentraciones diferentes (w/w, ácido sórbico /PLA): 0.5% (lote S-0.5) y 1.0% (lote S-1).

Las películas de PLA se obtuvieron por medio del citado proceso de extrusión. Los extractos de ácido sórbico y liofilizado de algas se incorporaron durante la preparación de la mezcla original. Para ello se utilizó una Brabender DSE-20 de doble tornillo extrusor (Duisburg, Alemania) con una boquilla plana para procesar la lámina (también llamados biofilm o biopelícula): la temperatura se mantuvo alrededor de 165°C y la velocidad del tornillo fue de 20rpm. Las formulaciones obtenidas fueron enfriadas en un rodillo y estiradas en la dirección de la máquina. El rodillo se mantuvo a 80°C con una velocidad de rotación de 1.4rpm. El espesor de las biopelículas se midió con un micrómetro a mano, siendo los valores promedio de 357µm para S-0.5 y de 300µm para S-1. El control se realizó con el uso de una película de polietileno (control; lote C) con un espesor de 150 micras.

Se midió el contenido total de polifenoles del *Fucus Spiralis* liofilizado, que fue de $53.3 \pm 5.0 \text{ mg GA / g}$.

3.1.3. Aplicación de bisulfito sódico para la conservación de una especie infravalorada.

Utilización de metabisulfito sódico (SMB) para la conservación de una especie descartada (*Munida spp*) mediante la aplicación una disolución del mismo por inmersión previa a su almacenamiento refrigerado (Capítulo 5) o congelado (Capítulo 6).

Las disoluciones utilizadas durante la inmersión fueron de 0.25% (w/v) y de 0.75% (w/v), lotes SMB-25 y SMB-75. Las inmersiones previas de langostilla fueron de 10 minutos de duración, procediéndose a continuación a iniciar su conservación en hielo tradicional (capítulo 5) o en congelación (-18°C) (capítulo 6). El control fue obtenido en ambos casos mediante la realización de la inmersión de langostilla en agua.

3.2. MATERIA PRIMA, APLICACIÓN DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS.

Se describe a continuación el origen de la materia prima empleada, forma de aplicación del método de conservación y el proceso de toma de muestra en los distintos experimentos, que han dado lugar a los consiguientes capítulos de la presente memoria:

3.2.1. Capítulo 1. Extensión de la vida útil de la merluza refrigerada (*Merluccius merluccius*) mediante la aplicación de hielo que contiene ácidos orgánicos naturales.

153 individuos de merluza fresca (*Merluccius merluccius*) fueron capturados cerca de la costa atlántica gallega por buques de arrastre de litoral del caladero Cantábrico-Noroeste y transportados al laboratorio en hielo 10 horas después de ser capturados. Los individuos de merluza medían y pesaban de media lo siguiente: 32-35cm y 180-210g, respectivamente.

Al llegar al laboratorio, se separaron 9 individuos para analizar y obtener datos de partida del experimento (día 0). Para ello se reunieron en tres grupos diferentes (3 piezas en cada grupo), que se analizaron de forma independiente de forma que el análisis estadístico fuese posible (n=3).

El resto de los ejemplares se dividieron en 4 lotes (36 individuos por lote) que fueron colocados en cajas y rodeados por hielo con concentración de ácidos conocida y el control sin ácidos (lotes C-0, C-75, C-125 Y C-175). Se utilizó una relación hielo-pescado 1:1. Todos los lotes fueron conservados en una cámara de refrigeración de temperatura constante (4°C). Las cajas empleadas permitieron el drenaje del hielo derretido que era repuesto por otro nuevo si era necesario.

Los muestreos de cada uno de los lotes tuvieron lugar los días 2, 6, 9 y 13 para la realización de los análisis de calidad pertinentes. En cada tiempo de muestreo y para cada lote, se tomaron individuos en 3 grupos (3 piezas por grupo) que fueron estudiados de forma independiente (n=3). El análisis sensorial se llevó a cabo en el pescado entero, mientras que los análisis microbiológicos y químicos se llevaron a cabo en el músculo blanco.

3.2.2. Capítulo 2. Inhibición de la pérdida de calidad en el gallo refrigerado (*Lepidorhombus whiffiagonis*) mediante el empleo de ácido cítrico y ácido láctico en la formación de hielo.

117 individuos de gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*) fresco fueron capturados cerca de la costa atlántica gallega por un buque arrastrero de litoral del caladero Cantábrico-Noroeste, para a continuación transportarlos al laboratorio en hielo 10 horas después de su captura. Su longitud osciló entre 20 y 23cm, mientras que su peso estuvo en el rango de 95 a 120g.

Tras su llegada al laboratorio, se separaron 9 piezas para analizarlos a día 0 y obtener datos de partida sobre la calidad del pescado. Estos fueron divididos en 3 grupos de 3 individuos, los cuales se analizaron de forma independiente para conseguir un análisis estadístico fiable (n=3).

El pescado restando se dividió en 3 lotes de 36 individuos cada uno, que fueron colocados en cajas y conservados con tres tipos de hielo que corresponden a los lotes C-0, C-125 y C-175, siendo conservados en una cámara de refrigeración de temperatura constante (4°C). Las cajas permitieron el drenaje del hielo que se renovaba si era necesario. Los

muestreos fueron realizados a los siguientes tiempos de almacenamiento: 2, 6, 9 y 13 días. A cada tiempo se analizó cada lote por triplicado, de forma que tras tomar 9 individuos se obtenían 3 grupos de 3 individuos cada uno (n=3). El análisis sensorial se llevó a cabo en el pescado entero, mientras que los análisis microbiológicos y químicos se llevaron a cabo en el músculo blanco.

3.2.3. Capítulo 3. Uso de los ácidos cítrico y láctico en el hielo para mejorar la calidad de dos especies de pescado a bordo durante el almacenamiento refrigerado.

Este experimento se llevó a cabo a bordo. De las capturas de merluza (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*) realizadas en el banco de Gran Sol (Atlántico Norte) durante una marea (periodo de pesca de un buque) realizada entre mayo y junio de 2012, tras su evisceración, se tomaron individuos para conservar en hielo preparado con una disolución de ácidos. La merluza tuvo un tamaño de entre 32 y 35cm y un peso de 180 a 210g, mientras que el gallo estuvo en el rango de 20 a 23cm de longitud y 95 a 120g de peso.

Para cada especie se tomaron individuos que fueron inmediatamente distribuidos en cajas y conservados con hielo con ácidos (lote con ácidos; lote T) y con hielo tradicional (lote control; lote C) para cada tiempo de muestreo establecido (tres tiempos a lo largo de toda la marea). Tras añadir el hielo correspondiente en cada caja los individuos se almacenaron en bodega del barco con temperatura constante de 0 a 1 °C.

Una vez que llegó el barco al puerto de Vigo, los ejemplares fueron llevados al laboratorio en hielo para ser analizados. Se realizaron los análisis sensoriales, microbiológicos y químicos después de 9, 12 y 15 días de almacenamiento refrigerado a bordo tras su captura. El análisis sensorial se llevó a cabo en el pescado entero, mientras que los análisis microbiológicos y químicos se realizaron en el músculo blanco.

3.2.4. Capítulo 4. Efecto de un film biodegradable (líoilizado del alga *Fucus spiralis* y ácido sórbico) sobre las propiedades de calidad de gallo refrigerado (*Lepidorhombus whiffiagonis*).

Se capturaron 120 ejemplares de gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*) cerca de la costa atlántica gallega por buque arrastrero de litoral del caladero Cantábrico-Noroeste, para a continuación transportarlos frescos al laboratorio en hielo, 10 horas después de su captura. La longitud y peso de las muestras variaron entre 21 y 24cm y 97 y 125g, respectivamente.

A su llegada al laboratorio se cogieron 12 individuos para analizar a día 0 la calidad de partida. Se dividieron en 3 grupos de 4 individuos, analizados independientemente para conseguir un análisis estadístico representativo (n=3).

Los individuos restantes se dividieron en 3 lotes de 36 individuos cada uno, que se colocaron en cajas independientes, y a los que se les aplicaron los distintos tipos de láminas (C, S-0.5 y S-1). A continuación se añadió hielo en escamas a proporción 1:1 pescado/hielo, de modo que la película se posiciona entre el pescado y el hielo, conservándose el conjunto en una cámara de temperatura constante (4°C). Las cajas permitieron el drenaje del hielo, que se repuso cuando fue necesario.

Los muestreos se realizaron en los días 4, 7 y 11 de almacenamiento para la realización de los análisis, tomando siempre 3 grupos de 4 individuos, estudiados de forma independiente

(n=3). El análisis sensorial se llevó a cabo en el pescado entero, mientras que los microbiológicos y químicos se llevaron a cabo en el músculo blanco.

3.2.5. Capítulo 5. Mejora de la calidad de un crustáceo abundante e infravalorado, langostilla (*Munida spp*), durante su almacenamiento refrigerado.

Se capturaron 15kg de langostilla cerca de la costa atlántica gallega por un buque arrastrero de litoral del caladero Cantábrico-Noroeste, para a continuación transportarlos frescos al laboratorio en hielo, 10 horas después de su captura. La longitud y peso de los individuos oscilaron entre 5 y 11cm y 9.5 y 10.5g, respectivamente.

A su llegada al laboratorio se dividieron 1.5kg de langostilla en 3 grupos de 0.5kg cada uno, que se analizaron de forma independiente para proporcionar valores de partida de calidad (día 0). Los kilogramos restantes se dividieron en 3 lotes de 4.5kg cada uno tratados por inmersión durante 10 minutos en las condiciones establecidas para los lotes SMB-25, SMB-75 y Control. A continuación se colocaron en cajas y se les aplicó hielo en escamas para conservarlas en una cámara de conservación a temperatura constante (4°C). En todos los casos las cajas permiten el drenaje y el hielo se renovó cuando fue necesario.

Se tomaron muestras de cada lote para analizar los días 3, 6 y 10 de almacenamiento. En cada muestreo se tomaron 1.5kg de langostilla, que fueron divididos en 3 grupos de 0.5kg para ser estudiados de forma independiente (n=3) con el fin de permitir el análisis estadístico. El análisis sensorial se llevó a cabo en especímenes enteros (con caparazón), mientras que los microbiológicos y químicos se llevaron a cabo en la carne.

3.2.6. Capítulo 6. Cambios de calidad durante el almacenamiento congelado del crustáceo langostilla (*Munida spp*).

Se capturaron 25.5kg de langostilla de entre 9.0 y 11.5cm de longitud y 8.5 y 11.5g de peso cerca de la costa atlántica gallega por un buque arrastrero de litoral del caladero Cantábrico Noroeste en enero de 2013. Se transportaron frescos y en hielo al laboratorio.

En el laboratorio se tomaron 1.5kg de langostilla que se dividieron en 3 grupos de 0.5kg para analizar de forma independiente, de forma que se obtuviesen datos de calidad a día 0. El resto de ejemplares se dividieron en 4 lotes de 6.0kg tratados de la siguiente forma:

1. El primer lote se empaquetó directamente en bolsas de polietileno (0.5kg por bolsa). Es el control en blanco (lote BC).
2. El segundo se sumergió en agua durante 10 minutos para luego empaquetarlos en bolsas de 0.5kg. Es el control en agua (lote WC).
3. El tercero se sumergió en solución al 0.25% de SMB durante 10 minutos, empaquetando luego los ejemplares en bolsas de 0.5kg. Es el lote SMB-25.
4. El último se sumergió en solución al 0.75% de SMB durante 10 minutos, y a continuación se empaquetó en bolsas de 0.5kg cada una. Es el lote SMB-75.

Todas las bolsas se llevaron inmediatamente a congelación a -30°C durante 2 días, para luego almacenarlo a -18°C.

Los muestreos se llevaron a cabo en los meses 1, 3, 6 y 10 de almacenamiento congelado a -18°C. En cada muestreo y para cada lote, se tomaron 3 bolsas (n=3; 0.5kg de langostilla por bolsa) que se analizaron por separado tras la descongelación (almacenamiento a 4°C durante

12 horas). El análisis sensorial se llevó a cabo en especímenes enteros (con caparazón), mientras que los microbiológicos y químicos se llevaron a cabo en la carne.

3.3. TIPO DE ANÁLISIS DE VALORACIÓN DE LA CALIDAD REALIZADOS

3.3.1. Análisis sensorial.

El análisis sensorial lo llevó a cabo un panel sensorial formado por personal experimentado, siguiendo los REGLAMENTOS DEL CONSEJO de 1989, 1990 y 1996 que establecen normas comunes de comercialización para determinados productos pesqueros, y que muestran los baremos de clasificación específicos por tipos de productos pesqueros para la definición del grado de frescura. Estos baremos fueron adaptados a las especies de estudio (Tablas 7 y 8).

Antes de comenzar cada experimento, el personal recibió capacitación especial en los productos que iban a testar. Esta capacitación estuvo centrada en la evaluación de muestras refrigeradas de las especies de estudio con diferentes cualidades sensoriales. Se prestó especial atención a la evolución de los diferentes parámetros sensoriales desde el estado inicial al estado en el cual los atributos sensoriales ya no eran aceptables.

De acuerdo con el procedimiento de los Reglamentos del Consejo mencionados de 1996, de 1990 y de 1989, se tuvieron en cuenta cuatro categorías de clasificación: Calidad Extra (E), Buena Calidad (A), Calidad baja (B) y Calidad Inaceptable (C). La evaluación sensorial del pescado incluyó los siguientes atributos: piel y desarrollo de mucosidad, ojos, olor externo, apariencia y olor de las branquias, consistencia, y olor y sabor de la carne (cruda y cocinada). Para langostilla se tuvieron en cuenta los siguientes atributos: olor externo, color del caparazón, olor carne cruda, y olor y sabor de la carne cocinada.

En cada muestreo se presentaron los individuos de cada lote a los panelistas, que puntuaron de forma individual. Cada atributo de cada muestra se obtuvo una vez por miembro del panel. Las muestras fueron compartidas por todos los miembros.

Descriptor	Highest quality (E)	Good quality (A)	Fair quality (B)	Unacceptable (C)
Skin and mucus development	Very intense pigmentation; transparent mucus	Milky mucus; insignificant pigmentation losses	Slightly greyish mucus; pigmentation without shine	Widely opaque mucus; important pigmentation losses
Eyes	Convex; transparent cornea; bright and black pupil	Convex and slightly sunken; slightly opalescent cornea; black and cloudy pupil	Flat; opalescent cornea; opaque pupil	Concave and milky cornea; Internal organs blurred
External odour	Sharply seaweed and shellfish smell	Weakly seaweed and shellfish smell	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
Gills appearance and odour	Brightly red; lamina perfectly separated; without odour	Rose coloured; lamina adhered in groups; without odour	Slightly pale; lamina adhered in groups; incipient fishy odour	Grey-yellowish colour; lamina totally adhered; intense ammonia odour
Consistency	Presence of partial disappearance of rigor mortis symptoms	Firm and elastic; pressure signs disappear immediately and completely	Presence of mechanical signs; elasticity notably reduced	Important shape changes due to mechanical factors
Flesh odour (raw fish)	Sharply seaweed and shellfish	Weakly seaweed and shellfish	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
Flesh odour (cooked fish)	Sharply fresh and agreeable	Weakly fresh and agreeable	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
Flesh taste	Sharply fresh and agreeable	Weakly fresh and agreeable	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour

Tabla 7. Baremos de clasificación de frescura utilizados para las especies de pescado estudiadas (gallo, merluza y rape).

Descriptor	Highest quality (E)	Good quality (A)	Fair quality (B)	Unacceptable (C)
General odour	Sharply seaweed and shellfish	Weak seaweed and shellfish	Slightly sour and putrid	Sour and putrid
Carapace colour	Pink-orange and bright; without black spots	Pink-orange and pale; without black spots	Incipient formation of brown spots	Important formation of brown spots
Flesh odour (raw)	Sharply seaweed and shellfish	Weakly seaweed and shellfish	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
Flesh odour (cooked)	Sharply fresh and agreeable	Weakly fresh and agreeable	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
Flesh taste (cooked)	Sharply fresh and agreeable	Weakly fresh and agreeable	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour

Tabla 8. Baremos de clasificación de frescura utilizados para langostilla.



3.3.2. Análisis microbiológicos.

3.3.2.1. Preparación de muestras.

Inicialmente se tomó una porción de muestra en cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas. Esta porción de muestra se colocó en una bolsa estéril con un volumen (1/9) (p/v) de agua de peptona (Merck, Darmstadt, Germany). Esta mezcla se homogeneizó en un masticador (AES, Combourn, France) (Ben-Gigirey et al., 1998, 1999). En el caso del análisis de la microbiota superficial, se frotaron 5cm² de la superficie de las muestras con un hisopo. La carga microbiológica del hisopo fue resuspendida en 10ml de agua de peptona.

Se realizaron diluciones seriadas de los extractos microbiológicos preparados con el agua de peptona para los dos casos anteriores y posteriormente se llevó a cabo el análisis microbiológico cuantitativo. Los recuentos se dieron en log CFU/g de músculo.

3.3.2.2. Parámetros microbiológicos.

3.3.2.2.1. *Microbiota aerobia mesófila.*

Los microorganismos aerobios mesófilos fueron investigados en Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd, London, UK), después de incubación a 30°C durante 48 horas (Ben-Gigirey et al., 1998, 1999).

3.3.2.2.2. *Microbiota anaerobia.*

Los microorganismos anaerobios fueron investigados en Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd, London, UK), después de incubación a 30°C durante 48 horas en el interior de una jarra de anaerobiosis y bajo atmósfera anaerobia (Oxoid) (Ben-Gigirey et al., 1998, 1999).

3.3.2.2.3. *Microbiota psicrófila.*

Los microorganismos psicrófilos fueron investigados en Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd, London, UK), después de incubación a 7-8°C durante 7 días (Ben-Gigirey et al., 1998, 1999).

3.3.2.2.4. *Enterobacteriaceae.*

Enterobacteriaceae fueron investigados mediante agar glucosa rojo violeta bilis (VRBG) (Merck, Darmstadt, Alemania) después de incubación a 30°C durante 24h (Merck Microbiology Manual, 2002).

3.3.2.2.5. *Microbiota proteolítica.*

Los microorganismos que exhiben un fenotipo proteolítico fueron investigados en agar-caseína tras su incubación a 30°C durante 48h (Ben-Gigirey et al., 2000; Phaff et al., 1994).

2.3.3. Análisis químicos.

2.3.3.1. Preparación de extractos.

3.3.3.1.1. *Extracto lipídico:*

La extracción lipídica se realizó de acuerdo al método de Bligh and Dyer (1959). Para ello se pesaron 5g de músculo blanco y se le añadieron 8ml de metanol y 4ml de diclorometano. Se homogeneizó dicha mezcla con un ultraturrax durante 60 segundos en frío. A continuación se le añadieron 4ml de agua miliQ fría y 4ml de diclorometano y se volvió a homogeneizar 60 segundos en frío. Después se centrifugó la mezcla durante 10 minutos a 3000rpm.

Una vez centrifugada la mezcla, se observan 2 fases. La fase superior acuosa se separa y se reserva para realizar las medidas de fluorescencia. La fase orgánica se guarda y el músculo resultante es nuevamente extraído con 3ml de metanol, 3ml de diclorometano y 1.5ml de agua miliQ. Se agita en vórtex y se centrifuga durante 10 minutos a 3000rpm. Una vez centrifugada la mezcla, se observan las dos fases de nuevo. Se desecha la fase acuosa y se recoge la orgánica que se adiciona a la recogida anteriormente. A continuación, el total de fase orgánica se lava con ClNa al 0.5% en proporción 2:1, respectivamente. A la fase orgánica resultante se le añade una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro para secar los restos de fase acuosa que pudieran quedar. El extracto orgánico seco se recoge en un tubo graduado y se conserva a -40°C en atmósfera de nitrógeno hasta su utilización.

3.3.3.1.2. *Extracto de ácido tricloroacético (TCA):*

Para la preparación de este extracto se tomaron 10g de músculo blanco en un vaso de precipitados y se homogeneizaron con 30ml de ácido tricloroacético al 5% durante 45 segundos. A continuación se mantuvo la mezcla durante 10 minutos a -30°C, se pasó a través de filtros de papel, recogiendo la fase líquida en matraces aforados de 50ml. El extracto se almacenó en congelador a -10°C hasta su utilización.

3.3.3.1.3. *Extracto de ácido perclórico.*

Para la preparación de este extracto se tomaron 10g de músculo blanco en un vaso de precipitados y se homogeneizaron con 30ml de ácido perclórico al 6% durante 45 segundos. A continuación se mantuvieron las mezclas durante 10 minutos a -30°C, se pasaron a través de filtros de papel, recogiendo la fase líquida en matraces aforados de 50ml. El extracto se almacenó en congelador a -10 C hasta su utilización.

3.3.3.2. Medición del pH.

Se utilizó un pHmetro (Crison, Barcelona) provisto de un electrodo de penetración de 6mm de diámetro. Para su calibración, se emplearon disoluciones patrón de pH 4 y 7, respectivamente. La lectura del pH se efectuó mediante penetración del electrodo en el músculo de la especie marina analizada, procurando cubrir todo o electrodo.

3.3.3.3. Cuantificación de constituyentes.

3.3.3.3.1. *Humedad (contenido de agua).*

El contenido en agua fue determinado por diferencia entre el peso del homogeneizado fresco de músculo blanco (alícuota de 1-2g) y el peso de éste después de 24h a 105°C. Los resultados se expresaron como g agua/100g de músculo.

3.3.3.3.2. *Lípidos.*

A partir del extracto lipídico se hace la cuantificación lipídica por el método de Herbes y Allen (1983). Para ello se pesaron previamente cápsulas de papel de aluminio en una balanza analítica operando con 4 decimales. A continuación se añadieron 500µl de extracto lipídico en las cápsulas y se colocaron sobre una placa calefactora hasta la completa evaporación del disolvente. Una vez finalizada la evaporación se retiran las cápsulas de la placa calefactora y se colocan en un desecador con el fin de enfriarlas en ambiente seco. Una vez a temperatura ambiente, se vuelven a pesar las cápsulas para calcular la variación de peso de las mismas. Obtendremos así los g lípidos /100g de músculo.

3.3.3.4. Estudio de la alteración lipídica.

3.3.3.4.1. *Ácidos grasos libres (hidrólisis de lípidos – FFA).*

Los ácidos grasos libres (FFA) fueron determinados por el método de Lowry y Tinsley (1976) basado en la formación de un complejo coloreado entre el grupo ácido del ácido graso y el acetato cúprico en presencia de piridina. Para ello se llevó a evaporación con corriente de nitrógeno una alícuota del extracto lipídico y a continuación se le adicionaron 5ml de tolueno y 1ml de acetato cúprico al 5% a pH de 6.1 estabilizado con piridina. Se llevó la mezcla a agitación con vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 3000rpm durante 10 minutos. Una vez centrifugado se mide la absorbancia de la fase orgánica en el espectrofotómetro a 715nm. Se realiza la cuantificación mediante la preparación de una curva patrón con ácido oleico. El resultado se expresó en g ácidos grasos libres/ 100g de lípidos.

3.3.3.4.2. *Peróxidos (oxidación primaria de lípidos - PV).*

El índice de peróxidos (PV) fue determinado por el método de Chapman y McKay (1949) basado en la reacción de los hidroperóxidos presentes en la muestra oxidando iones Fe^{+2} a iones de Fe^{+3} en presencia de iones tiocianato. Como resultado se produce un compuesto que presenta coloración púrpura, cuya absorbancia es susceptible de ser medida a 500nm. Para ello se toma una alícuota del extracto lipídico que variará en función del contenido en grasa que presente la muestra. Se evapora el diclorometano presente en la alícuota con corriente de nitrógeno y se le añaden 200µl de hexano, 5ml de etanol al 96% y 100µl de una disolución ferrosa. Se agita la mezcla con un vórtex y finalmente, se mide la absorbancia a 500nm. Se realiza la cuantificación mediante la preparación de una curva patrón con 200µl de hexano, 5ml de etanol al 96% y 100µl de disolución acuosa de tiocianato amónico al 30%. Posteriormente se añaden cantidades crecientes de disolución férrica (10, 20, 40, 60, 80 y 100µl) y se lleva a un volumen final de 100µl con ácido clorhídrico al 35%. Se mide la absorbancia a 500nm tras añadir el cloruro férrico. Se realiza previamente un blanco con etanol al 96%. Los resultados se expresan como miliequivalentes (meq) de oxígeno activo/Kg de lípido.

3.3.3.4.3. *Índice de ácido tiobarbitúrico (oxidación secundaria de lípidos – TBA-i).*

Este análisis fue realizado de acuerdo al método de Vyncke (1970) para la determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBA-i). Para ello se toma una alícuota del extracto de tricloroacético (TCA) y se le añade 5ml de una disolución de ácido tiobarbitúrico 0.02M. Se hace una agitación suave y la mezcla se mantiene 40 minutos en un baño de agua a 97°C. A continuación, la muestra se agita, enfría y centrifuga durante 15 minutos a 2700rpm. Finalmente se mide la absorbancia a 532nm. Se realiza la cuantificación mediante la preparación de una curva patrón con tetraetoxipropano. Se calcula el índice de TBA como mg malondialdehído/Kg de músculo.

3.3.3.4.4. *Formación de compuestos fluorescentes (oxidación terciaria de lípidos- FR)*

La formación de compuestos fluorescentes fue determinada con el fluorímetro Perkin Elmer LS 3B mediante medidas a 393/463nm y 327/415nm descrito por Aubourg S, Sotelo C, Gallardo J (1997) y Aubourg S, Rey- Mansilla M, Sotelo C (1999). La fluorescencia relativa (RF) fue calculada de acuerdo con la fórmula: $RF = F/F_{st}$, donde F es la fluorescencia medida en un par excitación/emisión, y F_{st} es la intensidad de fluorescencia de una disolución de sulfato de quinina (1µg/ml en H₂SO₄ 0.05 M) en el mismo par. La relación de fluorescencia (FR) fue calculada como la relación entre los dos valores relativos: $FR = RF_{393/463\text{ nm}}/RF_{327/415\text{ nm}}$. El valor de FR fue determinado en las fases acuosa y orgánica resultantes de la extracción lipídica.

3.3.3.4.5. *Índice de polienos (PI)*

Los extractos lipídicos fueron transmetilados mediante el método de Lepage y Roy (1986). Para ello una alícuota del extracto lipídico, correspondiente a 200µg de lípidos, se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso y se añadieron 0.4ml de tolueno, 0.1ml de patrón interno (C 19:0; 0.1mg/ml) y 2.0ml de ácido sulfúrico al 1% en metanol. La alícuota de patrón interno contenía 0.1mg de ácido graso 19:0 por ml. Las muestras se mezclaron mediante agitación intensa con vórtex durante 30s y se incubaron a 50°C durante aproximadamente 12h. Una vez atemperadas las muestras se añadieron 5ml de una disolución acuosa de cloruro de sodio al 5%, y las muestras se mezclaron por agitación intensa durante 30s. La adición de la disolución de cloruro sódico y la centrifugación a 2500rpm durante 10 minutos permitieron la separación de fases de tolueno y metanol/agua. La fase orgánica fue lavada con una disolución acuosa salina (5%NaCl) y secada con sulfato sódico anhidro. Para el análisis de los ácidos grasos se inyectó 1µl de la fase de tolueno, situada en la parte superior en el equipo GC-FID.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron por cromatografía de gases (Perkin-Elmer modelo 8700), provisto de un inyector de vaporización de temperatura programada (PTV) y un detector de ionización de llama (FID), empleando una columna capilar SP-2330 (0.25mm d.i. x 30m, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Se utilizó nitrógeno como gas portador. Los picos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de mezclas estándares (Larodan, Qualmix Fish; Supelco, FAME Mix). Los picos fueron integrados de forma automática y se empleó el ácido 19:0 como patrón interno. El índice de polienos fue calculado como la siguiente relación de concentraciones de ácidos grasos: $C20:5 + C22:6 / C16:0$ (Z. Lubis and K. Bucle, 1990).

3.3.3.5. Estudio de la alteración de la fracción de nitrógeno no proteico.

3.3.3.5.1. Bases volátiles totales (TVB-N)

Fueron determinadas de acuerdo al método de Antonacopoulos (1960) con ligeras modificaciones posteriores (Aubourg et al., 1997). Para ello se tomaron entre 5 y 10ml del extracto de ácido perclórico al 6% que se colocan en un matraz de destilación con 6.5ml de hidróxido sódico al 20%. Se procedió a su destilación mediante arrastre de vapor, recogiendo el destilado en un vaso de precipitados conteniendo 5ml de indicador Shiro Tashiro diluido (200ml de ácido bórico al 4% + 2ml de Shiro Tashiro concentrado, preparado el mismo día del análisis y en oscuridad). El Shiro Tashiro concentrado se preparó disolviendo 0.125g de rojo de metileno en 10ml de una disolución de NaOH al 20% y se le adicionó 0.02g de azul de metileno en 90ml de agua destilada. Transcurridos 10 minutos de destilación, el destilado se valora con ácido clorhídrico al 0.01N. El resultado final se expresa en mg de nitrógeno incluido en las bases volátiles totales TVB-N/ 100g de músculo.

3.3.3.5.2. Formación de trimetilamina (TMA-N).

Se determina por el método denominado del “picrato” descrito por Tozawa et al, (1971). A partir del extracto de TCA al 5% se toma una alícuota y se le adicionan 0.5ml de formol al 10%, 5ml de tolueno y 1.5ml de hidróxido potásico al 25%. Se incuba la mezcla en un baño de agua a 30°C durante 5 minutos. Terminado este tiempo, la mezcla se extrae del baño, se agita enérgicamente durante 1 minuto y se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente hasta que las dos fases estén completamente separadas. A continuación se transfiere la fase orgánica a un tubo conteniendo una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro para eliminar restos acuosos y se añade a 2.5ml de ácido picrico estándar (2g/100ml de tolueno). Se transfiere a una cubeta de espectrofotómetro y se mide la absorbancia frente a tolueno a 410nm. Se realiza la cuantificación mediante la preparación de una curva patrón con trimetilamina. El resultado final se expresa en mg de nitrógeno de trimetilamina N-TMA/100g de músculo.

3.3.3.6. Determinación de la degradación de nucleótidos.

Para la separación e identificación de nucleótidos se partió del extracto de PCA*, cuya técnica se describe en el punto 3.3.3.1.

La determinación de nucleótidos se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Se empleó para la separación de los distintos nucleótidos una columna con una fase estacionaria reversa compuesta de partículas esféricas de sílice y cadenas de 18 carbonos. Como fase móvil se utilizó un tampón fosfato a pH = 7 y acetonitrilo. Para la identificación de los nucleótidos se utilizó un detector ultravioleta-visible a una longitud de onda de 254nm. Los datos obtenidos por el detector se registraron en un PC y se trataron con el software System Gold 8.1, mediante el cual se obtuvieron los distintos picos, el tiempo de retención, el área de pico y la altura de pico.

Con objeto de realizar diferentes rectas de calibrado de ATP, ADP, AMP, IMP, Inosina e Hipoxantina en el cromatógrafo, se parte de distintas disoluciones estándar 1mM de cada molécula involucrada a partir de las cuales se obtienen las siguientes diluciones: 0.0 mM, 0.1mM, 0.15mM, 0.2mM, 0.25mM y 0.3mM, utilizando para ello agua bidestilada miliQ.

Una vez obtenidos los resultados del análisis de nucleótidos se calculó el índice de frescura K. El concepto del valor K fue introducido por primera vez por Saito et al. (1959) y se define de la siguiente manera:

$$\text{Valor K} = \frac{([\text{INO}] + [\text{Hx}])}{([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + [\text{INO}] + [\text{Hx}])} * 100$$

3.3.3.7. Análisis complementarios relacionados con la calidad.

3.3.3.7.1. Contenido total de polifenoles.

Se midió el contenido total de polifenoles en algas deshidratadas mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (espectrofotómetro Cary 3E UV-Visible, VARIAN; Mulgrave, Victoria, Australia) de acuerdo con Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., (2010). El ácido gálico (GA) se utilizó como estándar. Las mediciones se realizaron por triplicado. El contenido total de polifenoles se muestra en mg GA /g alga.

3.3.3.7.2. Determinación de metabisulfito.

El contenido en metabisulfito de sodio (SMB) en langostilla se midió de acuerdo con investigaciones anteriores (Aubourg et al., 2007). Para ello una porción de 5g de músculo se destiló en presencia de 20ml de agua y 2ml de HCl concentrado. El dióxido de azufre resultante se recoge en un matraz que contiene 0.5ml de una solución de almidón al 1% (w/v), 4.5ml de agua, y una gota de una solución acuosa saturada de yodo. La determinación de dióxido de azufre se realizó con una solución 0.05N de yodo. Los resultados obtenidos se expresaron como mg de dióxido de azufre / kg de carne.

2.3.4. Análisis estadístico.

Resultados bioquímicos: Al objeto de realizar el análisis estadístico, cada tratamiento tecnológico en cada experimento fue llevado a cabo por triplicado (n=3). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Statsoft, 1994) al objeto de comprobar diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) tanto como resultado del proceso/tratamiento, como por resultado del tiempo de conservación en refrigeración o congelación. La comparación de medias se llevó a cabo utilizando el método de diferencias de mínimos cuadrados (LSD) y el no-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Resultados microbiológicos: A los resultados obtenidos se les aplicó un tratamiento estadístico de análisis de varianza (ANOVA) considerando como variable fija el tipo de tratamiento, y como variables dependientes los parámetros correspondientes a la muestra analizada: aerobios mesófilos, aerobios psicrófilos, anaerobios, enterobacterias, microbiota lipolítica, microbiota proteolítica y el pH en el músculo. Todos los análisis estadísticos estudiados fueron realizados empleando el programa informático SPSS 15.0 para Windows, con los métodos Tukey y Scheffe, con el fin de evaluar las diferencias significativas existentes entre los distintos métodos de conservación utilizados. Las diferencias significativas se establecieron para un $p < 0.05$.

Resultados sensoriales: al no ser datos cuantitativos se utilizó un método no-paramétrico (test de Kruskal-Wallis) (Statística, Statsoft 1994).

Asimismo se estudiaron los **valores de correlación** entre los distintos parámetros como tiempos de conservación, índices microbiológicos y químicos y valoraciones sensoriales.

2.4. BIBLIOGRAFÍA.

- Antonacopoulos, N., Verbesserte Apparatus zur quantitativen Destillation wasserdampfllüchtiger Stoffe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1960, 13, 113-160.
- Aubourg, S., Medina, I., J Gallardo: Quality assessment of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) during chilled storage by monitoring lipid damages. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3662–3666.
- Aubourg, S. Review: recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1999, 76, 409-419.
- Aubourg, S., Piñeiro, C., Gallardo, J., Barros-Velázquez, J. Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chem.* 2005, 90, 445-452.
- Aubourg, S., Losada, V., Gallardo, J., Miranda, M., Barros-Velázquez, J. On-board quality preservation of megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) by a novel ozonised-slurry ice system. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 223, 232-237.
- Aubourg, S., Losada, V., Prado, M., Miranda, J., Barros-Velázquez, J., Improvement of the commercial quality of chilled Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in slurry ice: Effects of a preliminary treatment with an antimelanolic agent on enzymatic browning. *Food Chem.* 2007, 103, 741-748.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T., & Barros-Velázquez, J. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection.* 1998, 61, 608-615.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T., & Barros-Velázquez, J. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection.* 1999, 62, 933-939.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T., & Barros-Velázquez, J. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology.* 2000, 57, 19-31.
- Bligh, E., Dyer, W., A rapid method of total extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37, 911–917.
- Chapman, R., McKay, J., The estimation of peroxides by the ferric thiocyanate method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1949, 26, 360–363.
- Council Regulations (1989) Baremo de Clasificación de Frescura. In: *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*. Pp. 5-6. Brussels, Belgium: European Commission
- Council Regulation. (1990). *Official Journal of the European Communities*, 19, 69. February, No C84.
- Council Regulations, (1996). European community, No 2406/96, 26 November 1996. *Off. J. Eur. Commun.* L-334, 2:23.12.
- Giese, J., Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technol.* 1996, 50, 73–80.
- Losada, V., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J., Aubourg, S., 528 Effect of advanced chilling methods on lipid damage during sardine (*Sardina pilchardus*) storage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2004, 106, 844-850.

Lowry, R., Tinsley, I., Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1976, 53, 470-472.

Madrid, A., Madrid, J., & Madrid, R. Chilling, freezing and ultra-freezing of fish and derivatives. In A. Madrid (Ed.), *Technology of fish and its derivatives*. 1994, (pp. 45-103). Madrid, Spain: AMV Ediciones y Mundi-Prensa Libros, S. A.

Rodríguez-Bernaldo de Quiros, A., Frecha-Ferreiro, S., Vidal-Perez, A. & Lopez-Hernandez, J. Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research Technology*. 2010, **231**, 495-498.

Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Research International*. 2001, 34, 441-447.

Torres, A., Vázquez, M., Saraiva, J., Gallardo, J., Aubourg, S., Lipid damage inhibition by previous high pressure processing in white muscle of frozen horse mackerel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2013, 115, 1454-1461.

Tozawa, H., Erokibara, K., & Amano, K. Proposed modification of Dyer's method for trimethylamine determination in codfish. In R. Kreuzer (Ed.), *Fish inspection and quality control*. 1971 (pp. 187-190). London, UK: Fishing News Books Ltd.

Vyncke, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*. 1970 72, 1084-1087

LOSADA-IGLESIAS, Vanesa. Aplicación de técnicas basadas en hielo líquido en la comercialización de productos marinos: Efectos sobre los cambios químicos relacionados con la pérdida de calidad. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo: Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, 2006.

SANJUÁS-REY, Minia. *Aplicación de sistemas avanzados para la mejora de la calidad de productos marinos refrigerados de interés comercial*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago: Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, 2012.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio los resultados y la discusión se presentan en tres partes, en función de los métodos de conservación usados. Dentro de cada parte se muestran las distintas publicaciones realizadas al respecto. Así tenemos la siguiente división:

PARTE 1. Aplicación de hielo incluyendo componentes conservantes.

Capítulo 1. EXTENSIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LA MERLUZA REFRIGERADA (*Merluccius merluccius*) POR UN MEDIO DE FORMACIÓN DE HIELO NOVEDOSO QUE CONTIENE ÁCIDOS ORGÁNICOS NATURALES.

Capítulo 2. INHIBICIÓN DE LA PÉRDIDA DE CALIDAD EN EL GALLO REFRIGERADO (*Lepidorhombus whiffiagonis*) MEDIANTE EL EMPLEO DE CÍTRICO Y ÁCIDO LÁCTICO EN LA FORMACIÓN DE HIELO.

Capítulo 3. INCORPORACIÓN DE LOS ÁCIDOS CÍTRICO Y LÁCTICO EN EL HIELO PARA MEJORAR LA CALIDAD DE DOS ESPECIES DE PESCADO A BORDO DURANTE SU ALMACENAMIENTO REFRIGERADO.

PARTE 2. Aplicación de láminas biodegradables incluyendo componentes conservantes.

Capítulo 4. EFECTO DE UN FILM BIODEGRADABLE (ÁCIDO SÓRBICO Y LIOFILIZADO DEL ALGA *Fucus spiralis*) SOBRE LAS PROPIEDADES DE CALIDAD DE GALLO REFRIGERADO (*Lepidorhombus whiffiagonis*).

PARTE 3. Aplicación de bisulfito sódico para la conservación de una especie infravalorada.

Capítulo 5. MEJORA DE LA CALIDAD DE UN CRUSTÁCEO ABUNDANTE E INFRAVALORADO, LANGOSTILLA (*Munida spp*), DURANTE SU ALMACENAMIENTO REFRIGERADO.

Capítulo 6. CAMBIOS DE CALIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO CONGELADO DEL CRUSTÁCEO LANGOSTILLA (*Munida spp*).



**4.1. PARTE 1. APLICACIÓN DE HIELO INCLUYENDO COMPONENTES
CONSERVANTES.**





ANEXO I. CAPÍTULO 1.

Título: Extension of the shelf life of chilled hake (*Merluccius merluccius*) by a novel icing medium containing natural organic acids.

Autores: B. García-Soto, S. P. Aubourg, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez.

Revista: Food Control; ISSN: 0956-7135; Índice de impacto: 2.819; Cuartil: Primero;

Editorial: Elsevier;

Año: 2013. Volume, pág.: 34, 356-363

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351300248X>





4.1.1. Capítulo 1. Extensión de la vida útil de la merluza refrigerada (*Merluccius merluccius*) mediante la aplicación de hielo que contiene ácidos orgánicos naturales. (ANEXO I)

4.1.1.1. Introducción.

Se evaluaron tres combinaciones de dos ácidos orgánicos naturales (ácido cítrico y ácido láctico), en forma de sistemas de conservación novedosos bajo el formato de hielo en escamas, para la preservación de la merluza europea (*Merluccius merluccius*), una de las especies magras más comercializadas en Europa.

Los sistemas de hielo en escamas se prepararon con agua fresca y 0.075%/0.050% (lotes C-75), 0.125%/0.050% (lotes C-125) y 0.175%/0.050% (lotes C-175), relación de ácido cítrico/ácido láctico, respectivamente.

Se llevaron a cabo análisis microbianos y químicos en el músculo de merluza en todos los lotes durante 13 días de almacenamiento refrigerado y los resultados se compararon con los resultados obtenidos en el análisis sensorial.

4.1.1.2. Resultados y discusión.

4.1.1.2.1. Análisis microbianos

Los resultados de este estudio revelaron que el lote C-175, incluyendo hielo en escamas formado con una solución que contiene 0.175% de ácido cítrico y 0.050% de ácido láctico, proporcionó una reducción significativa del crecimiento de todos los grupos microbianos considerados en el mismo (Tabla 1 y Fig. 1-3 del anexo I), lo que lleva a un mejor mantenimiento de la calidad microbiana de la merluza, incluso después de 13 días de almacenamiento refrigerado.

En informes anteriores sobre el aumento de la vida útil de la merluza y otras especies marinas bajo sistemas de almacenamiento refrigerado, como hielo en escamas preparado a partir de agua marina, se demostró que la solución de sal resultante de la fusión de los cristales de hielo durante el almacenamiento refrigerado ejerce un efecto de lavado en la superficie del pescado, lo que reduce tanto la contaminación de la superficie del pescado como la difusión de las bacterias hacia el músculo (Campos et al, 2005; Losada, Piñeiro, Barros-Velázquez, y Aubourg, 2004; Rodríguez et al, 2004.). En el presente estudio, la fusión de los cristales de hielo que contienen la solución de ácidos orgánicos naturales podría ejercer un efecto de lavado similar, dando lugar a la subsiguiente reducción de la carga microbiana de la superficie y a su difusión hacia el músculo.

Este estudio también apoya los resultados de un estudio previo sobre métodos de conservación novedosos para la merluza refrigerada desarrollado por el mismo grupo de trabajo. Dicho estudio incluía la evaluación de un sistema de formación de hielo preparado con una fórmula comercial acuosa que contenía ácido cítrico, ácido láctico y ácido ascórbico (Sanjuás-Rey, García-Soto, Fuertes-Gamundi, Aubourg, y Barros-Velázquez, 2012). Los resultados de este estudio indicaron que existía un efecto inhibitorio sobre aerobios mesófilos en músculo de merluza, así como en gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*) y en rape (*Lophius piscatorius*). Del mismo modo, otros estudios también han mostrado la utilidad de incluir compuestos conservantes en el sistema de formación de hielo para la inhibición del desarrollo microbiano. Estos estudios incluyen una mezcla de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido

láctico y ácido ascórbico) durante el almacenamiento refrigerado de caballa (*Scomber scombrus*) (Sanjuás-Rey, Gallardo, et al, 2012; Sanjuás-Rey, García-Soto, et al, 2012) y un extracto de tomillo en la especie *Capoeta capoeta capoeta* refrigerada (Oral et al., 2008).

4.1.1.2.2. Análisis químicos.

La presencia de ácidos orgánicos en los sistemas de formación de hielo se traduce en un efecto inhibitorio del contenido de TMA-N, apreciándose un efecto mayor en los lotes con mayor concentración de ácido cítrico en el hielo. Los compuestos volátiles de amina, como TMA-N, se producen en parte por medio de la actividad enzimática endógena, pero sobre todo como resultado del crecimiento microbiano (Ashie et al, 1996;. Whittle et al, 1990.). En este caso, el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos está de acuerdo con el efecto antimicrobiano observado para aerobios, anaerobios, psicrótrofos, bacterias proteolíticas y enterobacterias (Figs. 1-3 y Tabla 2 del anexo I). Estudios anteriores han mostrado el efecto inhibitorio de la inclusión de componentes conservantes en el sistema de formación de hielo sobre el contenido de TMA-N. Por ejemplo, la presencia de ácido cítrico, ácido láctico y ácido ascórbico condujo a una menor formación de TMA-N en caballa refrigerada (Sanjuás-Rey, Gallardo, et al, 2012;.. Sanjuás-Rey, García-Soto, et al, 2012). Se observó un efecto inhibitorio sobre el contenido de TMA-N también en merluza y rape durante el almacenamiento refrigerado cuando estos tres ácidos orgánicos se incluyeron a partir de una fórmula comercial y se aplicaron al sistema de formación de hielo (Sanjuás-Rey, Gallardo, et al, 2012;. Sanjuás-Rey, García-Soto, et al., 2012).

La formación de compuestos fluorescentes fue baja durante los primeros 9 días de almacenamiento, (Tabla 3 del anexo I). Sin embargo, se observó un efecto inhibitorio derivado de la presencia de ácidos orgánicos en el hielo en escamas en la formación de compuestos fluorescentes para tiempos avanzados del almacenamiento refrigerado, de acuerdo con la siguiente secuencia: C-0 > C-75 > C-125, C-175.

En el presente estudio, solo se observó una ligera formación de compuestos de oxidación primaria y secundaria, de acuerdo a que el desarrollo de la oxidación de lípidos no es una vía de alteración importante durante el almacenamiento refrigerado de especies magras (Losada et al, 2004; Whittle et al, 1990). La naturaleza electrofílica de tales compuestos de oxidación de lípidos provoca su interacción con los componentes de los alimentos que poseen características nucleófilas (Aubourg, 1999; Howell, 1995). Así, la evaluación de la fluorescencia (compuestos de oxidación lipídica terciaria) resultó ser la más precisa dentro del desarrollo de la oxidación lipídica en este estudio. Además se observó una correlación lineal bastante alta entre los valores de fluorescencia y de TMA-N. Por ello se puede decir que existe una buena concordancia entre la actividad microbiana y la oxidación lipídica.

Investigaciones anteriores describen un efecto inhibitorio sobre la oxidación de lípidos de pescado como resultado de la inclusión de compuestos preservantes en el sistema de formación de hielo. Por ejemplo, la oxidación de lípidos fue inhibida en jurel chileno como resultado de la inclusión de extracto de orégano y romero en el sistema de formación de hielo (Quitral et al., 2009), así como en jurel por la aplicación de una mezcla en el hielo que incluye ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido láctico, ácido ascórbico) (Sanjuás-Rey et al., 2011) y en sardina mediante la inclusión de extracto de romero durante el almacenamiento refrigerado (Özyurt et al., 2012).

4.1.1.2.3. *Análisis sensorial.*

Se observó un efecto conservante de los ácidos orgánicos presentes en el hielo sobre la calidad de la merluza. Las muestras de pescado correspondientes a los lotes C-75 y C-0 no eran aceptables a día 13 por el panel de expertos que llevó a cabo los análisis. Sin embargo las muestras de pescado pertenecientes a los lotes C-125 y C-175 eran aceptables en dicho momento. Los factores limitantes fueron el olor externo, y el olor y sabor de la carne (cruda y cocida). Se concluyó un leve efecto inhibitor para el lote C-75 ya que presentaba mejores puntuaciones para apariencia del ojo (día 9), olor externo (día 6) y branquias (día 6). Finalmente se observaron algunas diferencias entre los lotes C-125 y C-175. Así, se obtuvieron mejores puntuaciones para C-125 en las categorías de apariencia del ojo (día 9) y sabor de la carne (día 2).

También se había observado previamente un aumento de la vida útil como resultado de la inclusión de compuestos conservantes en el hielo. Por ejemplo, se observó un aumento de la vida útil para gallo, merluza y rape refrigerados aplicando una fórmula comercial con ácido cítrico, ácido láctico y ácido ascórbico en el sistema de formación del hielo (Sanjuás-Rey, Gallardo, et al, 2012;. Sanjuás-Rey, García-Soto, et al., 2012), extracto de romero para el almacenamiento refrigerado de sardina (Özyurt et al., 2012), orégano y extractos de romero en almacenamiento refrigerado de jurel chileno (Quitral et al., 2009), una mezcla ácida (ácido cítrico, ácido láctico y ácido ascórbico) para el almacenamiento refrigerado de jurel (Sanjuás-Rey et al., 2011), e hidrosol de tomillo salvaje en la especie *Transcaucasian barb* (Oral et al., 2008).





ANEXO II. CAPÍTULO 2.

Título: Inhibition of quality loss in chilled megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) by employing citric and lactic acid icing.

Autores: B. García-Soto, K. Böhme, J. Barros-Velázquez, S. P. Aubourg

Revista: Internacional Journal of Food Science & Technology; ISSN: 0950-5423; Índice de impacto: 1.354; Cuartil: Segundo; Editorial: Wiley

Año: 2014. Volume, pág.: 49, 18-26

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12268/abstract>





4.1.2. Capítulo 2. Inhibición de la pérdida de calidad en el gallo refrigerado (*Lepidorhombus whiffiagonis*) mediante el empleo de ácido cítrico y ácido láctico en la formación de hielo. (ANEXO II)

4.1.2.1. Introducción

Este estudio se centra en el mantenimiento de la calidad del gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*) durante su almacenamiento refrigerado. Se emplearon soluciones acuosas de dos concentraciones diferentes de cítrico (CA) y láctico (LA) para la formación de hielo (0,125 % CA -0,050 % LA y 0,175 % CA-0.050% LA respectivamente; w/v). Los efectos de cada solución en la actividad microbiana, así como la alteración lipídica y la aceptación sensorial se monitorizaron durante un período de hasta 13 días de almacenamiento refrigerado.

4.1.2.2. Resultados y discusión

4.1.2.2.1. Análisis microbiológico

En este estudio se puede concluir que la incorporación de CA y LA en el hielo en escamas para el almacenamiento refrigerado del gallo permite un mejor control del desarrollo microbiano en el músculo de dicho pescado, si lo comparamos con la utilización del hielo en escamas tradicional. De hecho, este efecto fue importante en el caso de los aerobios mesófilos y de los psicrótrofos (Tabla 2 del anexo II), pues los ácidos orgánicos proporcionaron un mejor mantenimiento de la calidad microbiana del gallo durante su almacenamiento.

El presente estudio complementa trabajos previos sobre tecnologías de conservación relacionadas que se centraron en la preservación del gallo y de otras especies marinas utilizando sistemas avanzados de almacenamiento en refrigeración, como el hielo líquido.

Se ha demostrado que la utilización de hielo en escamas fabricado a partir de agua salada implica un crecimiento microbiano más lento en el músculo del pescado debido al efecto de lavado de la solución salina en la superficie del pescado mientras el hielo se derrite (Losada et al., 2004; Campos et al., 2005). En este trabajo, el derretimiento de las láminas de hielo que contienen la solución natural de CA y LA podría ejercer un efecto de lavado similar que reduciría la carga de microbiana de la superficie, así como gracias a su difusión hacia el músculo.

El presente estudio se encuentra respaldado por estudios previos realizados por el mismo grupo de trabajo, para evaluar un sistema novedoso de formación de hielo consistente en la utilización de una fórmula comercial compuesta por una solución acuosa a base de CA y LA y ácido ascórbico (AA). Se ha demostrado que el uso de esta solución ácida ayuda a controlar los aerobios mesófilos en el gallo, así como en la merluza (*Merluccius merluccius*) y en el rape (*Lophius piscatorius*) (Sanjuás-Rey et al., 2012). Además, en el músculo de la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), se obtuvieron niveles inferiores de bacterias aerobias y psicrótrofos (Sanjuás-Rey et al., 2011) mediante la aplicación de la misma fórmula comercial en una estrategia en dos pasos (baño de desinfección previo y almacenamiento refrigerado utilizando hielo en escamas). Otros autores han demostrado que la inclusión de compuestos naturales conservantes en el sistema de formación de hielo puede inhibir eficazmente la actividad microbiana, de forma similar a los resultados que se obtuvieron en este estudio. Por ejemplo, hay trabajos que han demostrado la eficacia del extracto de romero durante el almacenamiento refrigerado de sardina (*Sardinella aurita*) (Özyurt et al., 2012) y

del hidrosol de tomillo silvestre en el almacenamiento en frío de la especie *Capoeta capoeta capoeta* (Oral et al., 2008).

4.1.2.2.2. *Análisis químico*

Como resultado del almacenamiento refrigerado, se observó un incremento de la trimetilamina (TMA) en las muestras de cada lote (Tabla 2 del anexo II). Este incremento fue notablemente significativo el día 13 de almacenamiento refrigerado y respalda investigaciones anteriores, que mostraron una formación elevada de TMA en el músculo del gallo durante su almacenamiento refrigerado (Civera et al., 1995; Aubourg et al., 2006; Sanjuás-Rey et al., 2012). Tras aplicar la mayor concentración de ácido en el sistema de formación de hielo, se observó una menor formación de TMA.

Investigaciones previas mostraron también el efecto inhibitor en la formación de TMA al incluir compuestos conservantes en el sistema de formación de hielo. Por ejemplo, la presencia de CA, LA y AA en una fórmula comercial utilizada para la formación de hielo en escamas, resultó tener un efecto inhibitor en el contenido de TMA en el músculo de la merluza y el rape durante su almacenamiento en refrigeración (Sanjuás-Rey et al., 2012). Además, la aplicación de hielo líquido (Aubourg et al., 2006) y de hielo ozonizado (Pastoriza et al., 2008) condujeron a un contenido menor de TMA en el músculo del gallo durante su almacenamiento refrigerado.

La evaluación de la formación de compuestos fluorescentes (FR) aumentó con el paso del tiempo en todos los lotes de pescado estudiados (Tabla 3 del anexo II). La presencia de ácido demostró un efecto inhibitor en el día 13 de almacenamiento a las dos concentraciones de ácido estudiadas. Además, el lote control exhibió valores medios más altos que el pescado conservado con hielo ácido durante todo el experimento.

No se considera que la oxidación lipídica sea la vía que produce un daño mayor durante el almacenamiento refrigerado del pescado magro, y este estudio confirma una oxidación lipídica baja, tanto primaria como secundaria, tal y como se había constatado con anterioridad (Whittle et al., 1990; Sanjuás-Rey et al., 2011). El carácter electrofílico de los compuestos de oxidación lipídica facilita la interacción con constituyentes de los alimentos que poseen funciones nucleofílicas (Howell, 1995; Aubourg, 1999) para formar compuestos fluorescentes (compuestos terciarios de la oxidación lipídica). Así el lote control presentó el mayor valor de fluorescencia, lo que sugiere que el ácido ejerce un efecto inhibitor importante en los ejemplares tratados con hielo ácido.

Investigaciones previas mostraron que incluir compuestos naturales conservantes en el sistema de formación de hielo inhibe la oxidación lipídica en el pescado. Por ejemplo, en el jurel chileno se inhibió la oxidación lipídica incluyendo extracto de orégano y romero en el sistema de formación de hielo (Quitral et al., 2009) y en sardina, incluyendo extracto de romero (Özyurt et al., 2012). Del mismo modo, el empleo de una fórmula comercial que contiene CA, LA y AA, ligado directamente con el presente estudio, condujo a un menor desarrollo de mecanismos de oxidación durante el almacenamiento en refrigeración de diferentes especies de pescado, entre las que se incluyen la merluza, el gallo y el rape (García Soto et al, 2011) y la bacaladilla (Sanjuás-Rey et al., 2011).

4.1.2.2.3. *Análisis sensorial*

Se observó una degradación progresiva durante el tiempo de almacenamiento refrigerado para todos los lotes de pescado. Se podría deducir un efecto inhibitor derivado de la presencia de ácido en el hielo sobre la pérdida de calidad sensorial, ya que el pescado control resultó no ser apto en el día 13, mientras que el pescado tratado con hielo ácido (lotes C-125 y C-175) todavía era apto en ese momento. Los factores limitantes fueron el olor externo, el olor de la carne (tanto cruda como cocinada) y su sabor.

Como resultado de la inclusión de compuestos naturales conservantes en el sistema de formación de hielo, se observó un incremento de la vida útil. De hecho, la vida útil del gallo refrigerado, así como la de la merluza, la del rape (Sanjuás-Rey et al., 2012) y la de la bacaladilla (Sanjuás-Rey et al., 2011) se prolongaron mediante la aplicación de una fórmula comercial con CA, LA y AA en el hielo de conservación. Se obtuvo el mismo resultado con el uso de extracto de romero durante el almacenamiento en refrigeración de la sardina (zyurt et al., 2012), de extracto de orégano y romero durante el almacenamiento en frío del jurel chileno (Quitral et al., 2009) y de hidrosol de tomillo silvestre durante el almacenamiento refrigerado de la especie *Capoeta capoeta capoeta* (Oral et al., 2008).





ANEXO III. CAPÍTULO 3.

Título: Use of citric and lactic acids in ice to enhance quality of two fish species during on-board chilled storage.

Autores: B. García-Soto, I. C. Fernández-No, J. Barros-Velázquez, S. P. Aubourg

Revista: International Journal of Refrigeration. ISSN: 0140-7007; Índice de impacto: 1.702; Cuartil: Segundo; Editorial: Elsevier

Año: 2014. Volume, pág.: 40, 390-397

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140700713003897>





4.1.3. Capítulo 3. Incorporación de los ácidos cítrico y láctico en el hielo para mejorar la calidad de dos especies de pescado a bordo durante su almacenamiento refrigerado. (ANEXO III)

4.1.3.1. Introducción.

Este trabajo se centró en el almacenamiento refrigerado a bordo de merluza europea (*Merluccius merluccius*) y gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*). Para mejorar la calidad del pescado se incluyó una solución acuosa de ácido cítrico (1.25 g / L) y ácido láctico (0.50 g / L) preparada en laboratorio en el agua de formación del hielo empleado como medio de conservación del pescado a bordo. Se controló su efecto sobre la calidad sensorial, microbiológica y química después de 9, 12 y 15 días de almacenamiento a bordo.

4.1.3.2. Resultados y discusión.

4.1.3.2.1. Análisis microbiológico.

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos indican que el lote T, correspondiente al sistema de formación de hielo que incluía 1.25 g / L de ácido cítrico y 0.50 g / L de ácido láctico, vio ralentizado significativamente el crecimiento de todos los grupos microbianos analizados en el caso de la merluza, lo que condujo a una mejora de la calidad microbiana de esta especie de pescado, incluso después de 15 días de almacenamiento refrigerado.

En el caso de gallo se observó un efecto beneficioso similar en los lotes con presencia de ambos ácidos para mesófilos aerobios y psicrótrofos.

Por lo tanto, y de acuerdo con los resultados del análisis microbiano, la presencia de ácidos orgánicos en el sistema de formación de hielo evaluada en este estudio ralentizó significativamente el crecimiento de ciertos grupos microbianos en el músculo del pescado, siendo este resultado especialmente relevante para merluza y en menor medida para gallo.

Esta inhibición de la actividad microbiana está de acuerdo con investigaciones anteriores llevadas a cabo en tierra, donde ambas especies se mantuvieron en las mismas condiciones de formación de hielo (García-Soto et al., 2013, 2014); en dichos experimentos se analizaron los períodos de almacenamiento de 0 a 13 días para ambas especies. Asimismo, otros autores informaron de la eficacia de inhibición de la actividad microbiana mediante la inclusión de compuestos conservantes y compuestos naturales en el sistema de formación de hielo. Esto ocurre para el ozono durante el almacenamiento refrigerado a bordo de gallo (Pastoriza et al., 2008), extracto de romero durante almacenamiento refrigerado a bordo de sardina (*Sardinella aurita*) (Özyurt et al., 2012) e hidrosol de tomillo silvestre en la especie *Capoeta capoeta capoeta* refrigerada.

Estudios previos con hielo líquido preparado a partir de agua marina indicaron que cuando los cristales de hielo microscópicos se funden, la solución de sal ejerce un efecto de lavado de la superficie del pescado, lo que reduce la carga microbiana de la superficie del mismo, reduciendo así la difusión microbiana de la piel al músculo (Campos et al., 2005; Aubourg et al., 2006). Del mismo modo, la fusión de los cristales de hielo elaborados con ácido cítrico y ácido láctico en el presente estudio, podría ejercer un efecto de lavado similar,

lo que también prevendría la formación de biopelículas en la superficie del pescado, lo que limitaría su deterioro.

4.1.3.2.2. *Análisis químicos.*

Se analizó la formación de aminas volátiles midiendo los contenidos en TVB-N y TMA-N (Tabla 2 del anexo III). En todas las muestras se observó un aumento de los valores para ambos parámetros con el incremento del tiempo de almacenamiento refrigerado. En el período de almacenamiento analizado, este incremento se encontró más relevante para la formación de trimetilamina (TMA).

En la evaluación de TMA se obtuvieron valores medios más bajos en el pescado correspondientes al lote conservado en hielo con ácidos orgánicos. Se encontraron diferencias significativas en los días 12 y 15 de almacenamiento para merluza y en el día 12 para gallo. Cabe señalar que la merluza que se almacenó en hielo sin ácidos superó el límite legal establecido para esta especie (5mg / kg) (Baixas-Nogueras et al., 2003), mientras que las muestras de gallo no alcanzaron su límite legal (12 mg / kg; Directiva 91/493/CEE) (Aubourg et al., 2006).

Los compuestos de amina volátiles se producen parcialmente por medio de la actividad enzimática endógena pero sobre todo como resultado del desarrollo microbiano (Whittle et al., 1990). En el presente estudio, se observó una concordancia entre los resultados de los análisis microbiológicos (recuento de aerobios, anaerobios, psicrótrofos, proteolíticos y enterobacterias) y los análisis químicos (valores de TVB-N y TMA-N) de los parámetros relacionados con el desarrollo de la actividad microbiana durante el almacenamiento en refrigeración de ambas especies de pescado.

Investigaciones anteriores muestran un efecto inhibitorio sobre la formación de aminas como resultado de la inclusión de un componente conservante en el sistema de hielo. Así, la presencia de extracto de tomillo en el medio de formación del hielo llevó a una marcada disminución de la formación de TVB-N durante el almacenamiento refrigerado de *Capoeta capoeta capoeta* (Oral et al., 2008). Sin embargo, la inclusión de extracto de romero en el hielo no se tradujo en una disminución del contenido en TVB-N, sino que originó una menor formación de aminas biógenas durante el almacenamiento refrigerado de sardina (Özyurt et al., 2012). También se incluyeron con éxito en el hielo extractos de orégano y romero para el almacenamiento refrigerado de jurel chileno (*Trachurus murphyi*) (Quitral et al., 2009); así se detectó un contenido inferior de TVB-N en el pescado almacenado en hielo con el extracto de la planta. También se observó una menor formación de aminas (TVB-N y TMA-N) en merluza y gallo mediante la aplicación de dicho hielo durante su almacenamiento de 0 a 13 días (García-Soto et al., 2013, 2014).

4.1.3.2.3. *Análisis sensorial.*

Se logró aumentar el tiempo de vida útil para la merluza almacenada en hielo con ácidos en comparación con la merluza almacenada en hielo tradicional. Así, la merluza del lote control resultó inaceptable a día 15, mientras que la merluza conservada en hielo con ácidos todavía era válida en ese momento. El factor limitante fue el olor del músculo, tanto para producto crudo como cocido. También se obtuvo una mejor valoración para la merluza tratada al considerar otros atributos como olor externo, aspecto de las branquias y el olor de las mismas. Esta mejora de la calidad sensorial está de acuerdo con los resultados anteriormente mencionados para los índices de calidad microbiológicos y químicos.

Investigaciones anteriores en merluza europea refrigerada (Ruiz-Capillas y Moral, 2001) mostraron tiempos de vida útil más largos (de 20 a 25 días) que en el presente trabajo, lo que se explica por el menor tamaño relativo de los ejemplares de merluza examinados en el estudio actual, lo que coincide con lo observado en estudios anteriores (Rodríguez et al., 2003; Losada et al., 2004).

En el caso del gallo, el efecto de los ácidos orgánicos presentes en el hielo fue menor que en la merluza. Ambos, ejemplares tratados y ejemplares control, resultaron aceptables a día 15; sin embargo se obtuvo un mejor resultado para el gallo tratado a día 9 (para el olor externo y la apariencia y olor de las branquias), y a día 15 para la apariencia de los ojos. Esta ligera mejora de la calidad evaluada mediante análisis sensorial está de acuerdo con los resultados microbiológicos y químicos mencionados anteriormente.

Además, la evaluación sensorial llevada a cabo para el gallo está de acuerdo con un estudio anterior realizado a bordo (Aubourg et al., 2006); en dicho estudio, el gallo resultaba aceptable a día 16 con hielo tradicional e inaceptable a día 20. Las diferencias encontradas entre merluza y gallo pueden ser explicadas en términos de la mayor vida útil mostrada por el gallo (Aubourg et al., 2006) con respecto a la merluza (Rodríguez et al., 2003; Losada et al., 2004). El hecho de que la merluza sea un pescado más perecedero que el gallo puede explicar también que la mejora en condiciones de almacenamiento, en este caso a través de la incorporación de ácido cítrico y ácido láctico en el medio de formación de hielo, sea más relevante en la merluza en comparación con el gallo.

Investigaciones anteriores revelaron un aumento de la vida útil y una mejora de la calidad sensorial gracias a la inclusión de compuestos conservantes en el sistema de hielo. Este es el caso de extractos de orégano y romero durante el almacenamiento refrigerado de jurel chileno (Quitral et al., 2009), un hidrosol de extracto de tomillo silvestre durante el almacenamiento refrigerado de *Capoeta capoeta capoeta* (Oral et al., 2008), extracto de romero durante el almacenamiento de sardina refrigerada (Özyurt et al., 2012), y ozono durante el almacenamiento refrigerado a bordo de gallo (Pastoriza et al., 2008).



4.2. PARTE 2. APLICACIÓN DE LÁMINAS BIODEGRADABLES INCLUYENDO COMPONENTES CONSERVANTES.





ANEXO IV. CAPÍTULO 4.

Titulo: Effect of biodegradable film (lyophilised alga *Fucus spiralis* and sorbic acid) on quality properties of refrigerated megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*).

Autores: B. García-Soto, J. M. Miranda, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, R. Sendón, A. V. Rodríguez-Martínez, J. Barros-Velázquez, S. P. Aubourg

Revista: International Journal of Food Science & Technology

Año: 2015. Volume, pág.: Aceptado. Pendiente de publicación. DOI: 10.1111/ijfs.12821





Original article

Effect of biodegradable film (lyophilised alga *Fucus spiralis* and sorbic acid) on quality properties of refrigerated megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*)

Bibiana García-Soto,¹ José M. Miranda,² Ana Rodríguez-Bernaldo de Quirós,³ Raquel Sendón,³Ana V. Rodríguez-Martínez,³ Jorge Barros-Velázquez² & Santiago P. Aubourg^{4*}

1 Cooperativa de Armadores de Pesca del Puerto de Vigo (ARVI), Vigo, Spain

2 Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

3 Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Pharmacy Faculty, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

4 Department of Food Science and Technology, Marine Research Institute (CSIC), Vigo, Spain

(Received 13 January 2015; Accepted in revised form 19 March 2015)

Summary The effect of replacing the on-board currently employed polyethylene film by a novel type of environmentally friendly packaging was studied. For it, a polylactic acid (PLA) biodegradable film including lyophilised alga *Fucus spiralis* and sorbic acid was applied during megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) refrigeration and its effect on fish quality loss was evaluated. Thus, sensory assessment showed that samples wrapped up with PLA film including 8% alga and 1% sorbic acid were still acceptable on day 11, while control fish specimens (kept under polyethylene film) were rejected at that time. Under such biodegradable film condition, a preservative effect was also implied according to chemical indices assessment related to microbial activity (trimethylamine-N) and lipid oxidation development (peroxide and fluorescent compounds formation); additionally, lower mean numbers for different microbiological groups (aerobes, Enterobacteriaceae and psychrotrophs) were detected. This result provides a promising replacement strategy to enhance refrigerated fish quality and reduce the waste material content.

Keywords biodegradable film, *Fucus spiralis*, *Lepidorhombus whiffiagonis*, quality, refrigeration, sorbic acid.

Introduction

For years, refrigerated fish has shown to dominate the markets and represent very high proportions in fish production and human consumption, being flake-ice chilling the most commonly used method. However, deterioration of sensory quality and nutritional value occurs in refrigerated fish as a result of microbial and biochemical degradation mechanisms. This fast degradation can be explained on the basis that seafood arise from poikilothermic organisms with both a high water and nonprotein nitrogen content, a soft muscular and skin structure, a low collagen content and a highly unsaturated lipid composition (Campos *et al.*, 2012). According to the actual need for high-quality fresh products, flake ice has been combined with other preservative strategies to

enlarge the shelf life of the refrigerated products (Ashie *et al.*, 1996; Sivertsvik *et al.*, 2002).

One of such strategies has been the employment of natural low molecular weight organic acids. Such compounds represent a relevant choice because of their easy availability, low commercial cost and wide range of permitted concentration for use (Madrid *et al.*, 1994; Sanjuás-Rey *et al.*, 2012). Among them, sorbic acid and its salts have shown a marked preservative activity, this leading to a higher freshness and quality retention in refrigerated fish products (Erkan *et al.*, 2001; Yesudhason *et al.*, 2010). On the other side, natural products of marine origin such as red, green and brown macroalgae have offered the possibility of exploring a wide variety of natural compounds with potential antioxidant and antimicrobial activity (Wang *et al.*, 2010; Halldorsdóttir *et al.*, 2014). Additionally, macroalgae are known to be part of the diet in different countries and constitute a source of beneficial nutrients, such as vitamins, trace

*Correspondent: Fax: +34986292762; e-mail: saubourg@iim.csic.es

CE: Saranya	Dispatch: 2.4.15	WILEY	12821	I J F S
PE: Rathi	No. of pages: 10		Manuscript No.	Journal Code
				

minerals, lipids, amino acids and dietary fibres (Díaz-Rubio *et al.*, 2009; Paiva *et al.*, 2014).

During on-board storage, unloading and retail distribution, fish specimens are often wrapped up with plastic films to avoid direct contact with extra-cold ice that may lead to an important surface damage. These films are known to be made of synthetic polymers such as polyethylene and can constitute great quantities of nondegradable waste material in harbours and related locations during the distribution chain. The replacement of such synthetic films by biodegradable ones including preservative compounds constitutes a promising strategy to be applied to refrigerated fish (López-Rubio *et al.*, 2006). In this sense, polylactic acid (PLA) is increasingly being adopted as a biodegradable thermoplastic polyester for packaging application (Fortunati *et al.*, 2012; Sansone *et al.*, 2012). Additionally, different kinds of preservative compounds have been introduced into the PLA-packaging system to increase the antimicrobial (nisin, EDTA, sodium benzoate, potassium sorbate) (Jin *et al.*, 2010) and antioxidant (ascorbyl palmitate, α -tocopherol) (Jamshidian *et al.*, 2012) properties.

The present research focuses on the quality retention of megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) during refrigerated storage. This flatfish species is considered one of the most fished species in the Grand Sole North Atlantic Fishing bank and has been exploited by a wide number of European countries, including the United Kingdom, France, Ireland and Spain. During its commercialisation, most problems have shown to be related to the time elapsed between catching and arrival to ultimate destination. Thus, previous research on megrim has demonstrated that the quality of this species diminishes during on-board storage, so that different preservative technologies have been tested during such storage period (Aubourg *et al.*, 2006; Pastoriza *et al.*, 2008; García-Soto *et al.*, 2014).

The objective of the current work was to study the effect of replacing the on-board currently employed polyethylene film by a novel type of environmentally friendly packaging. For it, a PLA film including sorbic acid and lyophilised alga *Fucus spiralis* was applied and its effect on sensory, microbiological and chemical parameters related to quality loss in refrigerated megrim was analysed. *Fucus spiralis* was chosen for this study in agreement with its abundance in the Galician Atlantic coast (north-western Spain) and its promising preserving properties revealed in recent studies (Andrade *et al.*, 2013; Tierney *et al.*, 2013a).

Material and methods

Film systems preparation

Commercial PLA (Bio-Flex® F 6510; FKUR Kunststoff GmbH, Willich, Germany) with a melt flow index

(MFI) of $4.3 (\pm 0.2) \text{ g } 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ ($190 \text{ }^\circ\text{C}$, 2.16 kg) and a density of $1.29 (\pm 0.01) \text{ g cm}^{-3}$ was used. Lyophilised alga (*Fucus spiralis*) was provided by Porto-Muiños (Cereda, A Coruña, Spain) and incorporated into the biodegradable film at a concentration of 8% (w/w, alga/PLA). Sorbic acid (Merck, Darmstadt, Germany) was incorporated at two different concentrations (w/w, sorbic acid/PLA): 0.5% (S-0.5 film condition) and 1.0% (S-1 film condition).

Biodegradable films based on PLA were obtained by means of an extrusion process. Both sorbic acid and lyophilised alga were incorporated during the masterbatch preparation. For it, a Brabender DSE-20 twin-screw extruder (Duisburg, Germany) with a flat die was used to process the films; barrel and die temperature were about 160–170 °C and the screw speed was 20 rpm. The melted polymer formulations were cooled on a chilled roll and stretched in the machine direction. The chilled roll was kept at $80 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ with a rotation speed of 1.4 rpm. The thickness of the films was measured with a hand-held micrometre. The average values were 357 and 300 μm for S-0.5 and S-1 film batches, respectively.

A polyethylene film was employed as control (C film condition). It was manufactured in an industrial extruder and exhibited a film thickness of 150 μm .

Experimental conditions (percentages of sorbic acid and alga extract) employed in the present study are based on several preliminary tests carried out in our laboratory. Thus, sorbic acid employment was tested in a 0.2–2.0% range. It could be observed that a higher presence than 1% might damage some sensory descriptors (namely eyes and skin); accordingly, 0.5% and 1.0% were chosen for the actual research. Sorbic acid is a 'generally recognised as safe' (GRAS) natural substance for use in food technology according to European and American standards (Madrid *et al.*, 1994; Giese, 1996).

Concerning the alga extract, an increasing presence in the biodegradable film showed to infer better sensory acceptance; thus, 8% content was chosen as being the highest concentration allowed for the preparation of the actual biodegradable film. According to European Council Regulation (1997), algae are considered food or food ingredients; from the food safety point of view, their use in the biodegradable films should not constitute any hazard to health.

Fish material, processing and sampling

Fresh megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) (120 specimens) were caught near the Galician Atlantic coast (north-western Spain) and transported to the laboratory. Throughout this process (10 h), the fish were maintained in ice. The length and weight of the fish

specimens ranged from 21 to 24 cm and from 97 to 125 g, respectively.

Upon arrival to the laboratory, twelve individual fish specimens were separated and analysed as initial material (day 0). These fish specimens were divided into three different groups (four individuals per group) that were analysed independently to achieve the statistical analysis ($n = 3$). The remaining fish specimens were divided into three batches (thirty-six individuals in each batch), which were placed in independent boxes and wrapped up with different kinds of films (C, S-0.5 and S-1, respectively), prepared as previously described. Then, ice was added at a 1:1 fish/ice ratio, so that the film avoided the direct contact of fish with ice; all batches were placed inside a refrigerated room (4 ± 1 °C). Boxes that allowed draining of melted ice were used for fish storage. The ice of all batches was renewed when required. Fish samples from all of the batches were stored for a 11-day period, being sampled and analysed on days 4, 7 and 11. At each sampling time, twelve specimens were taken from each batch for analysis and divided into three groups (four individuals in each group) that were studied independently ($n = 3$). Sensory analysis was carried out on the whole fish, whereas microbiological and chemical analyses were carried out on the white muscle.

Microbiological analyses

Samples of 10 g of fish muscle were dissected aseptically from refrigerated fish specimens, mixed with 90 mL of 0.1% peptone water (Merck) and homogenised in sterilised stomacher bags (AES, Combourg, France) as previously described (Ben-Gigirey *et al.*, 1998, 1999). In all of the cases, serial dilutions from the microbial extracts were prepared in 0.1% peptone water.

Total aerobes were investigated by surface inoculation on plate count agar (PCA; Oxoid Ltd., London, UK) after incubation at 30 °C for 48 h. The anaerobe counts were also determined in PCA at 30 ± 0.5 °C, except that an anaerobic atmosphere kit (Oxoid Ltd.) was placed together with the plates inside the anaerobiosis jar. Psychrotrophs were also investigated in PCA, being the incubation carried out at 7–8 °C for 7 days. Enterobacteriaceae were investigated via pour plating using Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck) after incubation at 37 ± 0.5 °C for 24 h. In all of the cases, bacterial counts were transformed into log CFU g⁻¹ muscle before undergoing statistical analysis. All of the analyses were conducted in triplicate.

Chemical analyses

Total polyphenols content of lyophilised *Fucus spiralis* was assessed by means of the Folin–Ciocalteu colorimetric method (Cary 3E UV–Visible spectrophotome-

ter, Varian; Mulgrave, Vic., Australia) as described previously (Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.*, 2010). Measurements were taken in triplicate. Gallic acid (GA) was used as standard. Results were expressed as mg GA g⁻¹ lyophilised alga.

The evolution of pH values in megrim muscle over the storage time was determined using a 6-mm-diameter insertion electrode (Crison, Barcelona, Spain).

Trimethylamine–nitrogen (TMA-N) values were determined using the picrate colorimetric (DU 640; Beckman Coulter, London, UK) method, as previously described by Tozawa *et al.* (1971). This method involves the preparation of a 5% trichloroacetic acid extract of fish muscle (10 g/25 mL). The results are expressed as mg TMA-N kg⁻¹ muscle.

Lipids were extracted from the fish white muscle by the Bligh & Dyer (1959) method, which employs a single-phase solubilisation of the lipids using a chloroform–methanol (1:1) mixture. The results were calculated as g lipid kg⁻¹ muscle.

The peroxide value (PV) was determined spectrophotometrically (DU 640; Beckman Coulter) using the lipid extract via previous peroxide reduction with ferric thiocyanate according to the Chapman & McKay (1949) method. The results are expressed as meq active oxygen kg⁻¹ lipids.

Tertiary lipid oxidation compounds resulting from the interaction between oxidised lipids and nucleophilic compounds (namely, protein-like molecules) were measured by fluorescence spectroscopy. Such measurement has shown to be a valuable tool for assessing the fish quality changes during processing (Aubourg, 1999b). The formation of fluorescent compounds (Fluorimeter LS 45; Perkin Elmer España, Tres Cantos, Madrid, Spain) was determined by measurements at 393/463 and 327/415 nm as described by Aubourg (1999a). The relative fluorescence (RF) was calculated as follows: $RF = F/F_{st}$, where F is the fluorescence measured at each excitation/emission maximum and F_{st} is the fluorescence intensity of a quinine sulphate solution (1 µg mL⁻¹ in 0.05 M H₂SO₄) at the corresponding wavelength. The fluorescence ratio (FR) was calculated as the ratio between the two RF values: $FR = RF_{393/463 \text{ nm}}/RF_{327/415 \text{ nm}}$. The FR value was determined using the aqueous phase that resulted from the lipid extraction of the fish muscle (Bligh & Dyer, 1959).

All solvents and chemical reagents used were of reagent grade (Merck).

Sensory analysis

Sensory analysis was conducted by a sensory panel that consisted of five experienced judges who adhered to traditional guidelines concerning fresh and refrigerated fish, which was adapted to megrim (European Council Regulation, 1996). The panellists had

participated in the sensory analysis of various fish and seafood products for the previous 15 years. Before carrying out the present experiment, the judges received special training on refrigerated megrim, focused on the evaluation of refrigerated specimens that exhibited different qualities. Special attention was paid to the evolution of the sensory descriptors that were found as limiting factors for the shelf life.

Four categories were ranked (European Council Regulation, 1996): highest quality (E), good quality (A), fair quality (B) and unacceptable quality (C), according to Table 1. Sensory assessment of the fish included the following descriptors: skin and mucus development, eyes, external odour, gill appearance and odour, consistency, flesh (raw and cooked) odour and flesh (cooked) taste. Sensory evaluation began by the analysis of fish in the raw state and was followed by the analysis in the cooked state. Cooking was accomplished at 95–100 °C for 7 min in a prewarmed oven with air circulation and then submitted to the panel. At each sampling time, whole fish specimens were coded with three-digit random numbers and presented to the panellists in individual trays, which were scored individually. Each descriptor of each sample was scored a single time by each member of the panel. The panel members shared samples tested.

Statistical analysis

Data obtained from the different microbiological and chemical analyses were subjected to the ANOVA method

to explore differences resulting from the effects of both the film condition and the refrigeration time; the comparison of means was performed using the least-squares difference (LSD) method. Data obtained from the sensory evaluation were analysed by the nonparametric Kruskal–Wallis test. In all cases, analyses were carried out using the PASW Statistics 18 software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA); differences among batches and among refrigeration times were considered significant for a confidence interval at the 95% level ($P < 0.05$) in all cases.

Results and discussion

Quality loss assessment by microbiological analysis

The evolution of aerobic mesophiles in megrim is displayed in Fig. 1. No statistically significant ($P > 0.05$) differences were observed between the control batch (C) and any of the batches that included a biodegradable film. It is concluded that the present preserving conditions (S-0.5 and S-1) were not found useful to provide an activity decrease in this microbiological group. However, the contact of the fish surface with the biodegradable film harbouring alga extract and sorbic acid in S-0.5 and S-1 batches implied a slight reduction of the mean aerobe numbers, the highest difference being observed between C and S-1 batches after 7 days of storage ($0.80 \log \text{CFU g}^{-1}$). In this sense, the release of antimicrobial compounds from the film towards the fish flesh was not so intense as to

Table 1 Scale employed for evaluating the sensory quality of refrigerated megrim

Descriptor	Highest quality (E)	Good quality (A)	Fair quality (B)	Unacceptable (C)
Skin and mucus development	Very intense pigmentation; transparent mucus	Milky mucus; insignificant pigmentation losses	Slightly greyish mucus; pigmentation without shine	Widely opaque mucus; important pigmentation losses
Eyes	Convex; transparent cornea; bright and black pupil	Convex and slightly sunken; slightly opalescent cornea; black and cloudy pupil	Flat; opalescent cornea; opaque pupil	Concave and milky cornea; Internal organs blurred
External odour	Sharply seaweed and shellfish smell	Weakly seaweed and shellfish smell	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
Gills appearance and odour	Brightly red; lamina perfectly separated; without odour	Rose coloured; lamina adhered in groups; without odour	Slightly pale; lamina adhered in groups; incipient fishy odour	Grey-yellowish colour; lamina totally adhered; intense ammonia odour
Consistency	Presence of partial disappearance of rigor mortis symptoms	Firm and elastic; pressure signs disappear immediately and completely	Presence of mechanical signs; elasticity notably reduced	Important shape changes due to mechanical factors
Flesh odour (raw fish)	Sharply seaweed and shellfish	Weakly seaweed and shellfish	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
Flesh odour (cooked fish)	Sharply fresh and agreeable	Weakly fresh and agreeable	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
Flesh taste	Sharply fresh and agreeable	Weakly fresh and agreeable	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour

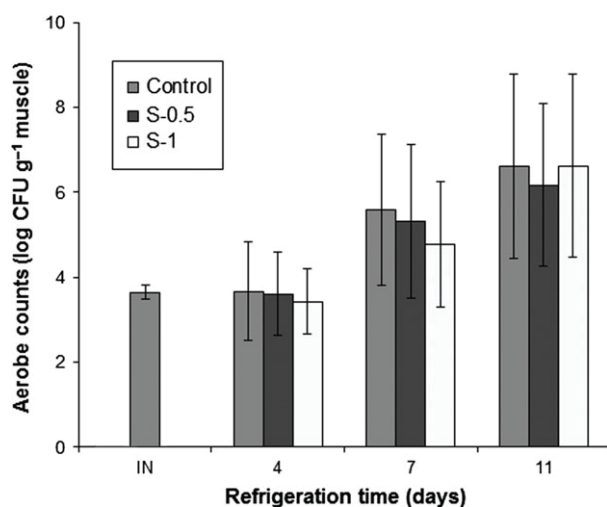


Figure 1 Aerobe count assessment* in refrigerated megrim wrapped up with different film conditions[†]. [*Mean values of three replicates ($n = 3$); standard deviations are indicated by bars. [†]Film conditions: C (polyethylene film; control), S-0.5 (polylactic acid biodegradable film including 8% lyophilised alga and 0.5% sorbic acid) and S-1 (polylactic acid biodegradable film including 8% lyophilised alga and 1.0% sorbic acid), according to the Material and Methods section. IN (initial fish; day 0)].

provide significant ($P < 0.05$) differences in the development of aerobic mesophiles among batches. This limited effect might be explained by the fact that only one side of the fish was in contact with the film. It should also be remarked that the microbial quality of the fish, in terms of aerobic mesophile counts, was good, the batches exhibiting microbial loads well below 6 log units even after 7 days of storage. This overall good microbial quality of the fish material may also explain the little differences observed among batches.

The investigation of Enterobacteriaceae (Fig. 2) provided similar results to aerobe counts, although the differences between mean numbers of S-1 and C batches were higher in the case of Enterobacteriaceae. Thus, lower mean counts were determined for this microbial group at all storage times in the S-0.5 batch and especially in S-1 batch as compared to the control batch.

The evolution of total psychrotrophs is expressed in Table 2. Such group is mainly composed of Gram-negative rod-shaped bacteria belonging to the genera *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* and *Flavobacterium*. Psychrotroph counts did not reveal any significant ($P > 0.05$) differences among batches throughout storage (Table 2). However, remarkable lower mean values were observed on days 7 and 11 in samples corresponding to PLA-based biodegradable films, as compared to C batch. Thus, the

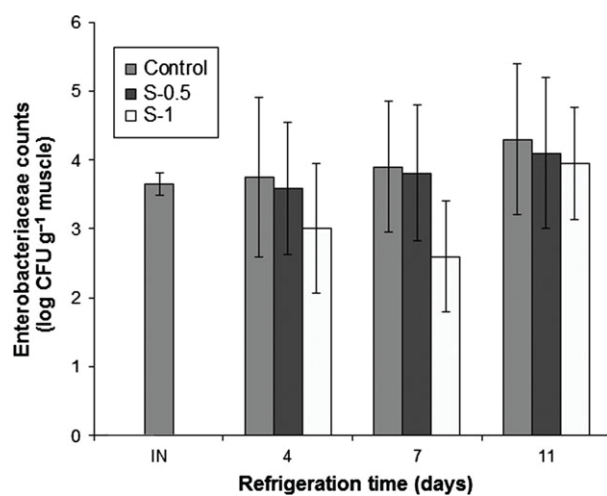


Figure 2 Enterobacteriaceae count assessment* in refrigerated megrim wrapped up with different film conditions[†]. [*Mean values of three replicates ($n = 3$); standard deviations are indicated by bars. [†]Film conditions as expressed in Fig. 1. IN (initial fish; day 0)].

greatest mean contents difference was obtained between C and S-1 batches on day 7 (0.90 log CFU g⁻¹), a result that indicated that the contact of the megrim surface with the alga-sorbic acid film was likely to provide some protection against microbes in the megrim muscle.

The investigation of anaerobe counts in megrim muscle evidenced that this microbial group did not exhibit significant ($P > 0.05$) differences among batches at any storage time (Table 2). It should be remarked that none of the batches exhibited anaerobe counts above 3 log CFU g⁻¹, even after 11 days of refrigerated storage. Thus, and in contrast with the results obtained for aerobic mesophiles, Enterobacteriaceae and psychrotrophs, no remarkable effect of the films containing alga and sorbic acid on the mean numbers of anaerobes was achieved.

Although a significant effect on the different microbial groups tested could not be obtained ($P > 0.05$) in the present experimental conditions, some profitable effect of the biodegradable films employment could be implied as a result of the reduction of the mean numbers in most microbiological groups; this effect could be observed in psychrotrophe (7–11-day period), aerobe (day 7) and Enterobacteriaceae (4–11-day period) counts. The antimicrobial effects observed in this study are a consequence of the incorporation of sorbic acid and *Fucus spiralis* extract to the films. Thus, sorbic acid is an approved food additive whose preservative effect on foods is based on the inhibition of microbial key metabolic pathways (York & Vaughn, 1964). The antimicrobial effect of *Fucus* spp. and other algae have been reported to be caused by terpenes and

Table 2 Microbial activity assessment* in refrigerated megrim wrapped up with different film conditions†

Quality index	Film condition	Refrigeration storage time (days)			
		0	4	7	11
Psychrotrophe counts (log CFU g ⁻¹ muscle)	C	3.20 a (1.06)	4.36 a (1.30)	6.57 ab (2.23)	7.62 b (2.54)
	S-0.5	3.20 a (1.06)	4.54 ab (1.34)	5.74 ab (1.77)	6.97 b (2.27)
	S-1	3.20 a (1.06)	4.44 ab (1.37)	5.67 ab (1.60)	7.23 b (2.37)
Anaerobe counts (log CFU g ⁻¹ muscle)	C	<2.00	<2.00	2.37 (1.09)	2.37 (1.02)
	S-0.5	<2.00	<2.00	2.20 (0.91)	2.55 (1.30)
	S-1	<2.00	<2.00	2.30 (0.65)	2.51 (1.25)
pH	C	6.41 a (0.04)	6.48 a (0.03)	6.70 b (0.12)	7.23 c (0.39)
	S-0.5	6.41 a (0.04)	6.51 ab (0.12)	6.62 b (0.19)	7.17 c (0.16)
	S-1	6.41 a (0.04)	6.55 ab (0.12)	6.68 b (0.12)	7.13 c (0.08)
Trimethylamine-N (mg kg ⁻¹ muscle)	C	1.7 a (0.1)	1.8 a (0.1)	13.5 b (1.4)	148.6 cC (16.8)
	S-0.5	1.7 a (0.1)	1.6 a (0.1)	23.4 b (11.6)	129.0 cB (5.2)
	S-1	1.7 a (0.1)	1.6 a (0.1)	18.1 b (6.4)	107.1 cA (13.7)

*Mean values of three replicates ($n = 3$); standard deviations are indicated in brackets. For each parameter and for each refrigeration time, mean values followed by different capital letters (A–C) indicate significant differences ($P < 0.05$) as a result of the film condition. For each parameter and for each film condition, means followed by low-case letters (a–c) indicate significant differences as a result of the refrigeration time. No letters are included when no differences ($P > 0.05$) are found.

†Abbreviations of film conditions as expressed in Fig. 1.

polyphenols (Sandsdalen *et al.*, 2003), among other compounds. Thus, previous plate bioassays carried out on our laboratory showed that ethanolic extracts of *Fucus spiralis* exhibited antimicrobial activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* (data not shown).

This study performed on megrim complements other previous reports focused on the preservation of this fish species under advanced refrigeration systems, such as on-board employment of slurry ice (Aubourg *et al.*, 2006) and addition of ozone to flake ice (Pastoriza *et al.*, 2008). Other previous studies have also reported benefits derived from the inclusion of citric acid and lactic acid in flake ice used for megrim storage (García-Soto *et al.*, 2014). Moreover, the inclusion of ascorbic acid, together with citric and lactic acids, has also proved to help in the control of aerobic mesophiles in megrim as well as in hake (*Merluccius merluccius*) and angler (*Lophius piscatorius*) (Sanjuás-Rey *et al.*, 2012).

Quality loss assessment by chemical analysis

A marked pH increase ($P < 0.05$) with refrigeration time was observed in all kinds of samples (Table 2). On day 11, all samples exhibited pH values above 7.0, this revealing a significant quality loss. Comparison among different batches did not provide significant differences ($P > 0.05$), although higher mean values were observed in fish specimens corresponding to control batch in the 7- to 11-day period.

Increase in the pH of the fish muscle indicates the accumulation of alkaline value compounds, such as ammonia compounds and TMA, which are principally derived from microbial activity. In this sense, it has been suggested that pH values above 7.0 may limit the shelf life of certain fish species such as hake (Ruiz-Capillas & Moral, 2001). However, previous research related to megrim refrigerated storage has shown that this species could still be considered as acceptable by the sensory panel with pH values slightly above 7.0 (Aubourg *et al.*, 2006; Pastoriza *et al.*, 2008).

The antimicrobial activity of sorbic acid has shown to increase as the pH of the substrate decreases and approaches the dissociation constant ($pK_a = 4.76$, 25 °C) (Sofos, 2000); thus, the inhibitory action of the undissociated acid has been reported to be greater than that of the dissociated acid (Eklund, 1983). However, sorbic acid has shown effectiveness at pH values round 6.5, while certain studies have indicated small antimicrobial activity at pH values as high as 7.0 (Statham & McMeekin, 1988; Sofos, 2000). Concerning fish-based food, sorbic acid has shown a profitable antimicrobial effect when applied to smoked blue catfish (*Ictalurus furcatus*) steaks (Antonia da Silva *et al.*, 2008), Chub mackerel (*Trachurus murphyi*) filets (Erkan *et al.*, 2001), and seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks (Yesudhason *et al.*, 2010); in such cases, the pH value was included in the 6.0–6.7 range, in agreement with the present research for the 0- to 7-day period; contrary, actual pH values resulting at the end of the experiment (7.13–7.23 range) would correspond to a nonprofitable environment for the sorbic acid preservative action.

Increasing TMA-N values ($P < 0.05$) were obtained as refrigeration time progressed in all fish batches (Table 2). At the end of the experiment, fish samples corresponding to C and S-0.5 batches overpassed the 120.0-mg kg⁻¹ score. Remarkably, at that time, an inhibitory effect ($P < 0.05$) on TMA formation could be concluded as a result of applying the biodegradable PLA-based films including alga and sorbic acid. This effect was more intense when the highest sorbic acid content was present in the film.

Volatile amine compounds are partially produced by means of endogenous enzyme activity but mostly as a result of microbial development (Campos *et al.*, 2012). As in the current study, previous studies have shown a high TMA formation in megrim muscle during chilled storage (Civera *et al.*, 1995; Aubourg *et al.*, 2006; Sanjuás-Rey *et al.*, 2012). It is worth of pointing out that megrim samples corresponding to S-1 batch did not reach its legal limit (120 mg kg⁻¹) (European Council Directive, 1991), while the other two batches overpassed such limit. TMA formation in refrigerated megrim has also been reported to be inhibited as a result of applying other preservative strategies such as slurry ice (Aubourg *et al.*, 2006) and ozonised ice (Pastoriza *et al.*, 2008).

Formation of peroxides was found to be relevant on day 4 for all kinds of samples (Table 3). After that time, only a slight increase was observed in general till the end of the experiment. In all cases, PV remained below a concentration of 7.23 meq kg⁻¹ lipids, this indicating a relatively low peroxide formation in all batches (Aubourg, 1999a), according to previous literature related to refrigerated megrim (García-Soto *et al.*, 2011). However, no significant differences ($P > 0.05$) among batches derived from the use of PLA-based films could be concluded for the PV; additionally, mean values were found very similar among batches.

Formation of fluorescent compounds was also found to be very low (Table 3), taking into account the initial fish value. No significant effect ($P > 0.05$) of the refrigeration time was observed for any of the batches under analysis. However, a higher FR score ($P < 0.05$) was observed on day 7 in control fish when compared with both PLA-based batches, this reflecting a protective effect of the biodegradable films under study; additionally, higher mean values were present in control samples at the end of the experiment.

Lipid oxidation is not considered a major damage pathway during refrigerated storage of lean fish (lipid content range in the present experiment: 4.2–5.3 g kg⁻¹ megrim muscle), and the present study confirmed that there was a low primary and tertiary lipid oxidation development, as previously reported (Sanjuás-Rey *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012). Interestingly, the control batch exhibited the highest FR value on day 7, which suggests a significant protective effect of the biodegradable films tested on fish quality.

This antioxidant effect of biodegradable films can be explained on the basis of the presence of polyphenol compounds in ethanolic extracts (53.3 ± 5.0 mg GA g⁻¹) of alga *Fucus spiralis* facilitated by the fact that PLA-packaging system has shown a valuable release of phenolic antioxidants from the extruded film (Jamshidian *et al.*, 2012). This antioxidant capacity of ethanolic extracts of alga *Fucus spiralis* was already proved in different *in vitro* tests (Andrade *et al.*, 2013), showing a marked content on polyphenols (90–205 µg phloroglucinol equivalents mg⁻¹) (Tierney *et al.*, 2013a) and α-tocopherol (511.4 mg kg⁻¹) (Paiva *et al.*, 2014). Additionally, a preliminary identification of active compounds was carried out (Tierney *et al.*, 2013b); thus, analysis by quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-Tof-MS) supported the assumption that phlorotannins were present and likely to be responsible for the observed antioxidant activities.

Table 3 Peroxide value and fluorescence ratio assessment* in refrigerated megrim wrapped up with different film conditions[†]

Quality index	Film condition	Refrigeration storage time (days)			
		0	4	7	11
Peroxide Value (meq. active oxygen kg ⁻¹ lipids)	C	0.18 a (0.01)	6.48 b (0.03)	6.70 c (0.12)	7.23 d (0.39)
	S-0.5	0.18 a (0.01)	6.51 b (0.12)	6.62 b (0.19)	7.17 c (0.16)
	S-1	0.18 a (0.01)	6.55 b (0.12)	6.68 b (0.12)	7.13 c (0.08)
Fluorescence Ratio	C	2.99 (0.87)	3.04 (0.86)	4.03 B (0.56)	3.79 (0.31)
	S-0.5	2.99 (0.87)	2.76 (0.59)	3.13 A (0.05)	3.40 (0.47)
	S-1	2.99 (0.87)	2.80 (0.48)	2.85 A (0.50)	3.22 (0.06)

*Mean values of three replicates ($n = 3$); standard deviations are indicated in brackets. For each parameter and for each refrigeration time, mean values followed by different capital letters (A, B) indicate significant differences ($P < 0.05$) as a result of the film condition. For each parameter and for each film condition, means followed by low-case letters (a–d) indicate significant differences as a result of the refrigeration time. No letters are included when no differences ($P > 0.05$) are found.

[†]Abbreviations of film conditions as expressed in Fig. 1.

Previous research had shown that other strategies also led to an inhibitory effect on lipid oxidation development in refrigerated megrim. Thus, the employment of a commercial formula including citric, lactic and ascorbic acids led to a slower lipid oxidation development during the chilled storage of several species such as megrim, hake and angler (García-Soto *et al.*, 2011).

Quality loss assessment by sensory analysis

Evaluation of the different sensory parameters was carried out for all types of batches and the results are compiled in Table 4. Sensory score decreased as refrigeration time progressed in all batches. The control

Table 4 Evaluation of sensory acceptance* in refrigerated megrim wrapped up with different film conditions†

Descriptor	Refrigeration time (days)	Film condition		
		C	S-0.5	S-1.0
Skin and mucus development	0	E	E	E
	4	A	A	A
	7	A	A	A
	11	B	B	B
Eyes	0	E	E	E
	4	A	A	A
	7	A	A	A
External odour	0	E	E	E
	4	A	A	A
	7	B ^b	B ^b	A ^a
	11	C ^b	B ^a	B ^a
Gill appearance and odour	0	E	E	E
	4	A	A	A
	7	B	B	B
	11	C ^b	B ^a	B ^a
Consistency	0	E	E	E
	4	A	A	A
	7	A	A	A
	11	B	B	B
Flesh odour (raw state)	0	E	E	E
	4	A	A	A
	7	B ^b	B ^b	A ^a
	11	B	B	B
Flesh odour (cooked state)	0	E	E	E
	4	A	A	A
	7	B	B	B
	11	C ^b	C ^b	B ^a
Flesh taste	0	E	E	E
	4	A	A	A
	7	B	B	B
	11	C ^b	C ^b	B ^a

*Quality categories: E (excellent), A (good), B (fair) and C (unacceptable). For each chilling time and descriptor, scores followed by different superscripts (a, b) indicate significant ($P < 0.05$) differences as a result of the film condition.

†Abbreviations of film conditions as expressed in Fig. 1.

batch was found to be unacceptable on day 11, whereas fish corresponding to the S-1 batch was still acceptable at that time. Thus, an inhibitory effect of the PLA-based biodegradable films on sensory quality loss could be concluded. Limiting sensory parameters were external odour, gill appearance and odour, and flesh odour and taste. There were no differences in the skin and mucus development, eyes appearance and consistency among fish corresponding to the different batches.

Concerning fish corresponding to S-0.5 batch, some sensory features were better maintained (external odour, gill appearance and odour) when compared with control batch. However, samples belonging to the S-0.5 batch were found to be unacceptable by the panel on day 11, according to the evaluation of flesh odour and taste.

This increase of sensory acceptance and shelf life for fish stored under biodegradable film conditions is in agreement with the above-mentioned results concerning microbiological and chemical assessments. Thus, under S-1 biodegradable film condition, a preservative effect ($P < 0.05$) was also implied according to chemical indices assessment related to microbial activity (TMA-N) and lipid oxidation development (PV and FR); additionally, a lower mean microbial development was detected according to the measurement of aerobic, Enterobacteriaceae and psychrotroph counts.

Previous research demonstrated an increased shelf life and a sensory quality enhancement in chilled megrim by means of including preservative compounds in the icing system. This is the case with ozone during the on-board chilled storage of this species (Aubourg *et al.*, 2006; Pastoriza *et al.*, 2008). An increased shelf life of chilled megrim has also previously been observed as a result of including natural preservative compounds in the icing system (García-Soto *et al.*, 2014). Indeed, the shelf life of chilled megrim, hake and angler has been extended by applying a commercial formula including citric, lactic and ascorbic acids in the icing medium (Sanjuás-Rey *et al.*, 2012).

Conclusions

The employment of a PLA-based film including sorbic acid and lyophilised alga *Fucus spiralis* has shown a protective effect on refrigerated megrim quality. Thus, sensory assessment showed that samples wrapped up with PLA biodegradable film including 8% alga and 1% sorbic acid were still acceptable on day 11, while control fish specimens were rejected at that time; among limiting factors, external odour, gill appearance and odour and flesh odour and taste can be mentioned. Under such biodegradable film condition, a preservative effect ($P < 0.05$) was also implied according to chemical indices assessment related to microbial

activity (trimethylamine–nitrogen) and lipid oxidation development (peroxide value and fluorescence ratio); additionally, a lower mean microbial development was detected according to the measurement of aerobic, Enterobacteriaceae and psychrotroph counts.

The present study provides a first approach focused on the replacement of the on-board currently employed polyethylene film by a novel type of environmentally friendly packaging. The results presented in this study constitute a promising basis in order to enhance fish quality retention during commercial on-board long storage and to reduce the waste material content produced during the different steps included in the fish distribution chain, from on-board storage until retail distribution. Further research is envisaged concerning the optimisation of PLA-based films application to marine species. In them, the particular role of each preserving component (i.e. lyophilised alga and sorbic acid) ought to be assessed, this including the possible synergistic or additive effect. Once the biodegradable film may be applied to the food manufacture, analysis of any undesirable compound (namely, As), its release from the film and its stability during the film extrusion process should be addressed.

Acknowledgments

The authors thank Mr. Marcos Trigo, Mrs. Monserrat López and Mrs. Melisa Sousa for their excellent technical assistance. Porto-Muiños (Cerdeja, A Coruña, Spain) is greatly acknowledged for kindly providing the lyophilised alga. This work was supported by the Secretaría Xeral de I+D from the Xunta de Galicia (Galicia, Spain) through the Research Project 10 TAL 048 E.

References

- Andrade, P., Barbosa, M., Pedro Matos, R. *et al.* (2013). Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry*, **138**, 1819–1828.
- Antonia da Silva, L., Prinyawiwatukul, W., King, J., No, H., Bankston, J. & Ge, B. (2008). Effect of preservatives on microbial safety and quality of smoked blue catfish (*Ictalurus furcatus*) steaks during room-temperature storage. *Food Microbiology*, **25**, 958–963.
- Ashie, I., Smith, J. & Simpson, B. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **36**, 87–121.
- Aubourg, S. (1999a). Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species. *Food Research International*, **32**, 497–502.
- Aubourg, S. (1999b). Review: recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76**, 409–419.
- Aubourg, S., Losada, V., Gallardo, J., Miranda, M. & Barros-Velázquez, J. (2006). On-board quality preservation of megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) by a novel ozonised-slurry ice system. *European Food Research Technology*, **223**, 232–237.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J. (1998). Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, **61**, 608–615.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J. (1999). Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*, **62**, 933–939.
- Bligh, E. & Dyer, W. (1959). A rapid method of total extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.
- Campos, C., Gliemmo, M., Aubourg, S. & Barros-Velázquez, J. (2012). Novel technologies for the preservation of chilled aquatic food products. In: *Novel Technologies in Food Science* (edited by A. McElhatton & P. Amaral Sobral). Pp. 299–323, chapter 13. New York, NY, USA: Springer.
- Chapman, R. & McKay, J. (1949). The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **26**, 360–363.
- Civera, T., Turí, R., Bisio, C., Parisi, E. & Fazio, G. (1995). Sensory and chemical assessment of marine teleosts. Relationship between total volatile basic nitrogen, trimethylamine and sensory characteristics. *Science des Aliments*, **13**, 109–117.
- Díaz-Rubio, M^a.E., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. (2009). Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **60**, 23–34.
- Eklund, T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, **54**, 383–389.
- Erkan, N., Metin, S., Varlik, C. & Özden, Ö. (2001). Der Einfluss von Kaliumsorbat auf die Qualität von Mittelmeermakrelen-Filets. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **97**, 427–431.
- European Council Directive (1991). European Community (EC), No 91/493/EEC, 22 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products. *Official Journal L-268*, 24/09/1991, Pp. 0015–0034.
- European Council Regulation (1996). European Community (EC), No 2406/96, 26 November 1996. *Official Journal of European Communities*, L-334/2:23.12.
- European Council Regulation (1997). European Community (EC), No 258/97, 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *CELEX-EUR Official Journal L-43*, 14/02/1997, Pp. 1–7.
- Fortunati, E., Armentano, I., Zhou, Q. *et al.* (2012). Multifunctional bionanocomposite films of poly(lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, **87**, 1596–1605.
- García-Soto, B., Sanjuás-Rey, M., Barros-Velázquez, J., Fuertes-Gamundi, R. & Aubourg, S. (2011). Preservative effect of an organic acid-icing system on chilled fish lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **113**, 487–496.
- García-Soto, B., Fernández-No, I., Barros-Velázquez, J. & Aubourg, S. (2014). Use of citric and lactic acids in ice to enhance quality of two fish species during on-board chilled storage. *International Journal of Refrigeration*, **40**, 390–397.
- Giese, J. (1996). Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*, **50**, 73–80.
- Halldorsdóttir, S., Sveinsdóttir, H., Gudmundsdóttir, A., Thorkelson, G. & Kristinsson, H. (2014). High quality fish protein hydrolysates prepared from by-product material with *Fucus vesiculosus* extract. *Journal of Functional Foods*, **9**, 10–17.
- Jamshidian, M., Arab Tehrani, E., Imran, M., Javeed Akhtar, M., Claymand, F. & Désobry, S. (2012). Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidants films. *Journal of Food Engineering*, **110**, 380–389.
- Jin, T., Zhang, H. & Boyd, G. (2010). Incorporation of preservatives in acid films for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and extend-

- ing microbiological shelf life of strawberry puree. *Journal of Food Protection*, **73**, 812–818.
- López-Rubio, A., Gavara, R. & Lagarón, J. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 567–575.
- Madrid, A., Madrid, J. & Madrid, R. (1994). *Technology of Fish and Its Derivatives*. Pp. 283–376. Madrid, Spain: AMV Ediciones y Mundi-Prensa Libros S. A.
- Paiva, L., Lima, E., Ferreira Patarra, R., Neto, A. & Baptista, J. (2014). Edible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health. *Food Chemistry*, **164**, 128–135.
- Pastoriza, L., Bernárdez, M., Sampedro, G., Cabo, M. & Herrera, J. (2008). The use of water and ice with bactericide to prevent onboard and onshore spoilage of refrigerated megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*). *Food Chemistry*, **110**, 31–38.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Frecha-Ferreiro, S., Vidal-Pérez, A. & López-Hernández, J. (2010). Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research Technology*, **231**, 495–498.
- Ruiz-Capillas, C. & Moral, A. (2001). Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Research International*, **34**, 441–447.
- Sandsdalen, E., Haug, T., Stensvag, K. & Styrvold, O. (2003). The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19**, 777–782.
- Sanjuás-Rey, M., García-Soto, B., Barros-Velázquez, J., Fuertes-Gamundi, J. & Aubourg, S. (2011). Effect of a two-step natural organic acid-treatment on microbial activity and lipid damage during blue whiting (*Micromesistius poutassou*) chilling. *International Journal of Food Science and Technology*, **46**, 1021–1030.
- Sanjuás-Rey, M., García-Soto, B., Fuertes-Gamundi, R., Aubourg, S. & Barros-Velázquez, J. (2012). Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species. *LWT-Food Science and Technology*, **46**, 217–223.
- Sansone, L., Aldi, A., Musto, P., di Maio, E., Amendola, E. & Mensitieri, G. (2012). Assessing the suitability of polylactic acid flexible films for high pressure pasteurisation and sterilization of packaged foodstuff. *Journal of Food Engineering*, **111**, 34–45.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W. & Rosnes, 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.
- Sofos, J. (2000). Sorbic acid. In: *Natural Food Antimicrobial Systems* (edited by A. Naidu). Cap. 23. Pp. 637–660. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Statham, J. & McMeekin, T. (1988). The effect of potassium sorbate on the structural integrity of *Alteromonas putrefaciens*. *Journal of Applied Bacteriology*, **65**, 469–476.
- Tierney, M., Smyth, T., Hayes, M., Soleer-Vila, A., Croft, A. & Brunton, N. (2013a). Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**, 860–869.
- Tierney, M., Smyth, T., Rai, D., Soler-Vila, A., Croft, A. & Brunton, N. (2013b). Enrichment of phenol contents and antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity and molecular size. *Food Chemistry*, **139**, 753–761.
- Tozawa, H., Erokibara, K. & Amano, K. (1971). Proposed modification of Dyer's method for trimethylamine determination in codfish. In: *Fish Inspection and Quality Control*. (edited by R. Kreuzer) Pp. 187–190 London, UK: Fishing News Books Ltd.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. et al. (2010). Inhibition of haemoglobin-mediated lipid oxidation in washed cod muscle and cod protein isolates by *Fucus vesiculosus* extract and fractions. *Food Chemistry*, **123**, 321–330.
- Yesudhasan, P., Srinivasa Gopal, T.K., Narayanarao Ravinshankar, C., Lalitha, K. & Ashok, K. (2010). Effect of potassium sorbate and modified atmosphere packaging on the shelf-life extension of seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks during iced storage. *Journal of Food Biochemistry*, **34**, 399–424.
- York, G. & Vaughn, R. (1964). Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, **88**, 411–417.

4.2.1. Capítulo 4. Efecto de un film biodegradable (lío­filizado del alga *Fucus spiralis* y ácido sórbico) sobre las propiedades de calidad de gallo refrigerado (*Lepidorhombus whiffiagonis*). (ANEXO IV)

4.2.1.1. Introducción

Esta investigación se centró en mantener la calidad del gallo refrigerado (*Lepidorhombus whiffiagonis*). Su objetivo fue estudiar el efecto de la sustitución de la película de polietileno actualmente empleada a bordo por un nuevo tipo de embalaje ecológico. Para ello se aplicó un biofilm de ácido poliláctico (PLA) con liofilizado de alga *Fucus spiralis* (8%) y ácido sórbico en diferentes concentraciones (0.5% y 1.0%) y se evaluó su efecto sobre parámetros sensoriales, microbiológicos y químicos relacionados con la pérdida de calidad.

4.2.1.2. Resultados y discusión

4.2.1.2.1. Análisis microbiológico

Aunque no se pudo observar un efecto significativo en los diferentes grupos microbianos estudiados bajo las condiciones experimentales descritas, se infiere cierto efecto beneficioso del empleo del film biodegradable como resultado de la disminución en los recuentos de la mayoría de los grupos microbiológicos. Los efectos antimicrobianos observados en este estudio son consecuencia de la incorporación de ácido sórbico y extracto de *F. spiralis* a las películas. El ácido sórbico es un aditivo alimentario aprobado cuyo efecto conservante en los alimentos se basa en la inhibición de las rutas microbianas metabólicas clave (York y Vaughn, 1964). Se ha estudiado que el efecto antimicrobiano de *Fucus spp.* y otras algas sería causado por terpenos y polifenoles, entre otros compuestos (Sandsalen et al., 2003).

Este estudio realizado en gallo complementa otros estudios anteriores que se centraron en la preservación de esta especie bajo sistemas de almacenamiento refrigerado avanzados, como el empleo a bordo de hielo líquido (Aubourg et al., 2006) y la adición de ozono en el hielo en escamas (Pastoriza et al., 2008). Investigaciones anteriores han descrito también los beneficios derivados de la inclusión de ácido cítrico y ácido láctico en el hielo en escamas utilizado para el almacenamiento de gallo (García-Soto et al., 2014). Por otra parte, la inclusión de ácido ascórbico, junto con ácidos cítrico y láctico, también se ha demostrado que ayuda en el control del desarrollo de la microbiota aerobia mesófila en gallo, así como en merluza (*Merluccius merluccius*) y en rape (*Lophius piscatorius*) (Sanjuás-Rey et al. 2012).

4.2.1.2.2. Análisis químico.

Se observó un aumento de los valores de TMA-N a medida que progresaba el tiempo de almacenamiento refrigerado en todos los lotes de pescado (Tabla 2 del anexo IV). Al final del estudio las muestras de pescado correspondientes a los lotes C y S-0.5 habían sobrepasado la puntuación de 120.0. Cabe destacar que en ese momento se concluyó un efecto inhibitorio de TMA, como resultado de la aplicación de las películas basadas en PLA biodegradables incluyendo extracto de alga y ácido sórbico. Este efecto fue más intenso cuando se incorporó un mayor contenido más alto de ácido sórbico en la película.

Los compuestos de amina volátiles se producen parcialmente por la actividad enzimática endógena, pero sobre todo como resultado del desarrollo microbiano (Campos et al., 2012). Al igual que el estudio actual, los estudios anteriores han mostrado una elevada formación de

TMA en músculo de gallo durante el almacenamiento refrigerado (Civera et al., 1995; Aubourg et al. 2006; Sanjuás-Rey et al. 2012). Vale la pena señalar que las muestras de gallo correspondientes al lote S-1 no llegaron a su límite legal (120 mg/kg; Directiva 91/493/CEE) (Aubourg et al., 2006), mientras los otros dos lotes sobrepasaron dicho límite. Se sabe que la formación de TMA en gallo refrigerado también se inhibe como resultado de la aplicación de otras estrategias de conservación tales como hielo líquido (Aubourg et al., 2006) y la aplicación de ozono en el hielo (Pastoriza et al., 2008).

Se observó asimismo que la formación de compuestos fluorescentes también resultó ser muy baja, teniendo en cuenta el valor inicial del pescado (Tabla 3 del anexo IV). Por otra parte, se observó un valor mayor de FR en el día 7 para el lote control por comparación con los lotes basados en PLA, lo que demuestra cierto efecto protector de las películas biodegradables en estudio.

Estudios anteriores han mostrado que otras estrategias también ejercen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la oxidación lipídica en gallo refrigerado. Así, el empleo de una fórmula comercial que incluye ácido cítrico, láctico y ascórbico llevó a un desarrollo más lento de la oxidación de lípidos durante el almacenamiento en refrigeración de varias especies como el gallo, la merluza y el rape (García-Soto et al., 2011).

4.2.1.2.3. *Análisis sensorial.*

Por otra parte, se encontró que el lote control era inaceptable sensorialmente en el día 11, mientras los individuos correspondientes al lote S-1 eran todavía aceptables en ese momento. Los parámetros sensoriales limitantes resultaron ser el olor externo, la apariencia y olor de las branquias, el olor y el sabor del músculo. No hubo diferencias en la piel, en la mucosa externa, en el aspecto de los ojos ni en la consistencia entre los individuos correspondientes a los diferentes lotes. Este aumento de la aceptación sensorial y de la vida útil de los pescados almacenados con la película biodegradable concuerda con los resultados mencionados anteriormente relativos a los análisis químicos y microbiológicos.

Investigaciones anteriores han demostrado una mayor vida útil y una mejora de la calidad sensorial de gallo refrigerado por medio de la inclusión de compuestos conservantes en el hielo. Este es el caso de la utilización de ozono durante el almacenamiento refrigerado de esta especie (Aubourg et al. 2006; Pastoriza et al. 2008). También se ha observado un aumento de la vida útil de gallo refrigerado como resultado de la inclusión de compuestos conservantes naturales en el sistema de hielo (García-Soto et al. 2014). De hecho, la vida útil de gallo, merluza y rape refrigerados se pudo prolongar mediante la aplicación de una fórmula comercial incluyendo ácido cítrico, láctico y ascórbico en el sistema de hielo (Sanjuás-Rey et al. 2012).

4.3. PARTE 3. APLICACIÓN DE BISULFITO SÓDICO PARA LA CONSERVACIÓN DE UNA ESPECIE INFRAVALORADA.





ANEXO V. CAPÍTULO 5.

Título: Quality enhancement of the abundant under-valued crustacean, lobster krill (*Munida spp.*), during its chilled storage.

Autores: B. García-Soto, J. M. Miranda, J. Barros-Velázquez, S. P. Aubourg

Revista: International Journal of Food Science & Technology

Año: 2015. Volume, pág.: 50, 708-716

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12683/abstract>





4.3.1. Capítulo 5. Mejora de la calidad de un crustáceo abundante e infravalorado, langostilla (*Munida* spp), durante su almacenamiento refrigerado. (ANEXO V)

4.3.1.1. Introducción.

La langostilla (género *Munida*) representa un crustáceo infravalorado, que es capturado con frecuencia en las pesquerías europeas. En este estudio, se evaluó su calidad sensorial, microbiológica y bioquímica durante su almacenamiento refrigerado. Además, también se estudiaron los efectos de un tratamiento antimelanósico pre-almacenamiento que consistió en sumergir los individuos en una solución con metabisulfito de sodio (SMB), a dos concentraciones diferentes (0.25 y 0.75 %).

4.3.1.2. Resultados y discusión.

4.3.1.2.1. Análisis sensorial.

Los resultados del análisis sensorial se reflejan en la Tabla 2 del anexo V. La calidad sensorial disminuyó en todos los lotes a medida que avanzaba el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, esta disminución fue menos pronunciada en el caso de los lotes SMB-25 y SMB-75 en lo que respecta al olor general y al color del caparazón, en comparación con el lote control. Así, el lote control mostró una calidad inaceptable en el día 10, siendo el olor general el factor limitante. En contraste, los dos lotes sometidos a un pre-tratamiento con metabisulfito mostraron una calidad aceptable incluso después de 10 días de almacenamiento. Además, el pre-tratamiento anterior al almacenamiento también dio lugar a un mayor mantenimiento del color del caparazón, en comparación con el lote control. El olor del músculo, tanto crudo como cocido, y el sabor del músculo cocido, no parecieron verse afectados por el tratamiento con metabisulfito.

Un estudio anterior en cigala (*Nephrops norvegicus*), describió el efecto beneficioso de un tratamiento previo al almacenamiento con 0.5% de SMB combinado con hielo líquido sobre la calidad sensorial (Aubourg et al., 2007). Se observó un aumento de la vida útil durante el almacenamiento refrigerado de la misma especie mediante la aplicación de metabisulfito de potasio con anterioridad al almacenamiento (1.25, 2.50 y 6.25%) (Rea et al., 1998) o mediante espolvoreo con un antimelanósico a base de una formulación de sulfito comercial (6%) (Martínez-Álvarez et al., 2008). El pretratamiento con SMB también condujo a la mejora de la calidad en especies de camarón tales como *Penaeus aztecus* y *Penaeus duorarum* (McEvily et al., 1991) así como *Pandalus borealis* (Martinsdóttir et al., 2001).

4.3.1.2.2. Análisis microbiológico.

El pre-tratamiento por inmersión con SMB no afecta significativamente al crecimiento de los grupos bacterianos más relevantes utilizados como indicadores de la calidad microbiana. Así, los recuentos de aerobios, anaerobios (periodo de 3 a 6 días) y bacterias lipolíticas aumentaron a medida que avanzaba el tiempo de almacenamiento para cada lote sin diferencias significativas entre lotes a lo largo del tiempo de muestreo (Tabla 3 del anexo V).

En contraste, el pre-tratamiento con SMB permite una ligera pero significativa mejora en el control de enterobacterias (Tabla 3 del anexo V), de psicrótrofos (Fig. 1 del anexo V) y de

bacterias proteolíticas (Fig. 2 del anexo V) después de 6 días de almacenamiento refrigerado, en comparación con el lote control.

Un estudio anterior en cigala sometida a un tratamiento antimelanósico previo al almacenamiento con un 0.5% de SMB también mostró efectos beneficiosos moderados a nivel microbiano (Aubourg et al., 2007). Otro estudio en cigala reveló que el pre-tratamiento con metabisulfito de potasio conducía a la reducción en los recuentos de aerobios mesófilos, mientras que no se observaba ningún efecto sobre los psicrótrofos (Rea et al., 1998).

Este mejor control microbiano se correlaciona con los resultados del análisis sensorial que indicaban un aumento de la vida útil para los lotes sometidos a tratamiento con SMB, en comparación con el lote control. Estudios anteriores también habían descrito el potencial efecto antimicrobiano de los sulfitos sobre pescado (Chinivasagam et al., 1998; Maldhavi et al., 1995).

4.3.1.2.3. *Análisis químico.*

En términos globales, los mecanismos de oxidación de lípidos en langostilla refrigerada no fueron relevantes (Tabla 4 del anexo V). Así, se determinaron valores de PV y TBA-i por debajo de 4.50 y 0.15, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros como resultado del tratamiento antimelanósico o del tiempo de almacenamiento. La única excepción fue el contenido de peróxidos en el día 10, cuando se observó un contenido significativamente menor para los dos lotes tratados con SMB.

A pesar de la falta de diferencias significativas en los parámetros de oxidación de lípidos, se observó una mayor retención de PUFAs en los lotes tratados con SMB (Fig. 3 del anexo V). De este modo, se observaron menores valores de PI en el lote control en comparación con los lotes SMB-25 (día 3) y SMB-75 (días 6 y 10). Se observaron asimismo valores de PI decrecientes a medida que progresaba el tiempo de almacenamiento en los lotes control y SMB-25. Sin embargo, la correlación encontrada entre los valores fue baja. Los valores de PI estuvieron en todos los casos en el rango de 2.44-2.59, lo que se puede considerar como valores relativamente altos con marcados efectos positivos desde el punto de vista nutricional (Simopoulos, 1997).

ANEXO VI. CAPÍTULO 6.

Título: Quality changes during the frozen storage of the crustacean lobster krill (*Munida spp.*).

Autores: B. García-Soto, J. M. Miranda, J. Barros-Velázquez, S. P. Aubourg

Revista: European Journal of Lipid Science and Technology; ISSN: 1438-7697; Índice de impacto: 2.033; Cuartil: Segundo; Editorial: Wiley

Año: 2015. Volume, pág.: 117, 431-439.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201400309/abstract>





4.3.2. Capítulo 6. Cambios de calidad durante el almacenamiento congelado del crustáceo langostilla (*Munida spp*). (ANEXO VI)

4.3.2.1. Introducción.

El presente estudio se centró en los cambios de calidad de un crustáceo infravalorado e infrautilizado, la langostilla (*Munida spp*) durante su almacenamiento congelado (10 meses a -18°C). Ejemplares de langostilla fresca fueron sumergidos en una solución acuosa de metabisulfito sódico (SMB) al 0.75 y 0.25% previamente a su congelación (lotes SMB-0.75 y SMB-0.25, respectivamente). Se llevaron a cabo comparaciones con individuos sumergidos en agua sin ningún aditivo (control en agua, lote WC) y con individuos sin sumergir (control en blanco, lote BC).

4.3.2.2. Resultados y discusión.

4.3.2.2.1. Análisis sensorial.

Se observó una vida útil más larga para las muestras sometidas a tratamiento SMB y con inmersión en agua. Así se obtuvo un aumento en la retención de la calidad según la siguiente secuencia de lotes: BC<WC<SMB-25<SMB-75. La langostilla del lote BC fue rechazada al décimo mes, mientras que las muestras restantes aún eran aceptables en ese momento. El hecho de que el olor externo (olor pútrido y a amoníaco) y el desarrollo de pardeamiento (color externo) fuese el factor limitante de la aceptabilidad indica que la degradación de constituyentes (actividad enzimática endógena) durante el almacenamiento congelado tuvo un efecto más negativo para la calidad que el pardeamiento.

De acuerdo con la evaluación del color externo y el olor del músculo (crudo), la langostilla correspondiente al lote SMB-75 mostró las puntuaciones más altas. Además, la langostilla del lote SMB-25 exhibió una mayor retención de calidad para todos los atributos, excepto el olor del músculo (crudo), en comparación con sus homólogos en el lote BC. El lote que se sumergió en agua también mostró una mayor retención de la calidad en comparación con el lote sin sumergir. Esto fue especialmente relevante para atributos tales como el olor y el color externos, así como el olor de la carne (cocida). Este resultado se puede explicar en base a un efecto de lavado de los lotes sumergidos previamente, lo que puede reducir la carga microbiana y los niveles de otros componentes presentes en la superficie. Se conoce que el lavado solo con agua proporciona una protección cuando es aplicado previamente a jurel congelado (Lugasi et al., 2007) y a caballa congelada y refrigerada (Richards et al., 2002).

4.3.2.2.2. Análisis químicos.

La evaluación de la **hidrólisis lipídica** muestra que el contenido inicial de ácidos grasos (2.12±0.25g / 100g de músculo) resultó ser similar al presente en cigala (*Nephrops norvegicus*) (Losada et al., 2006). La evaluación de la hidrólisis de lípidos reveló valores crecientes al progresar el tiempo de almacenamiento congelado para todos los lotes, excepto para el período 3-6 meses (Fig. 1 del anexo VI). Dicho aumento es el resultado de la acción de enzimas endógenas (lipasas y fosfolipasas) activas incluso durante el almacenamiento congelado de especies marinas (Sista et al., 1997; Sikorski & Kolakowski, 2000). Los valores medios de ácidos grasos libres en los lotes de langostilla SMB-25 y SMB-75 fueron en todos los casos inferiores a los de los lotes BC y WC. Así, se llegó a la conclusión de que la inmersión en SMB ejerce un efecto inhibitorio sobre la formación de ácidos grasos libres,

aunque solo se encontraron diferencias significativas para el periodo de 1-3 meses al comparar las muestras SMB-25 y SMB-75 con el lote BC. En contraste, no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos controles, de modo que no se pudo concluir un efecto inhibitor de la inmersión en agua.

La formación de ácidos grasos libres en sí no conduce a pérdidas nutricionales. Sin embargo se ha indicado que la acumulación de ácidos grasos libres en especies marinas congeladas se relaciona en cierta medida con la falta de aceptabilidad, ya que se sabe que causan deterioro de los productos marinos a través de su interacción con las proteínas, y que ejercen un gran efecto en el desarrollo de la oxidación de lípidos en especies marinas (Sista et al., 1997; Sikorski & Kolakowski, 2000). Además, se ha demostrado que los ácidos grasos libres sufren una oxidación más rápida que los lípidos de alto peso molecular (triglicéridos y fosfolípidos) debido a su mayor accesibilidad (menor impedimento estérico) al oxígeno y otras moléculas pro-oxidantes (Aubourg, 2001).

En cuanto el análisis de **oxidación de lípidos**, la formación de TBARS aumentó a medida que progresó el tiempo de almacenamiento en congelación (Tabla 2 del anexo VI). Tal formación resultó ser mayor en los lotes tratados con SMB. Así, la oxidación lipídica secundaria resultó ser más intensa en las muestras correspondientes al lote SMB-75 en comparación con langostilla correspondiente a ambos lotes control (BC y WC), observándose una marcada formación de TBARS en el lote SMB-25 en periodos de almacenamiento avanzados. A pesar de dichos aumentos de TBA-i, los valores se mantuvieron en todos los casos por debajo de 1.0mg de malondialdeído / kg de músculo.

Investigaciones anteriores han mostrado una estrecha relación entre la detección de los compuestos de oxidación secundaria y los parámetros sensoriales relacionados con el olor y el sabor (White, 1994). Así se obtuvieron claros valores de correlación con el olor externo, color externo y olor del músculo crudo para los distintos lotes.

El almacenamiento en congelación está asociado a los procesos de oxidación de lípidos en muchas especies marinas donde podrían estar involucradas diferentes tipos de enzimas endógenas (peroxidasas, oxidasas, lipoxigenasas, etc.) (Lugasi et al., 2007; Losada et al., 2007). La congelación y descongelación también pueden causar lisis de las mitocondrias y lisosomas, eventos que pueden alterar la distribución de las enzimas y factores que afectan a la velocidad de las reacciones enzimáticas en los tejidos, por lo que los daños en producto congelado podrían acelerarse (Sikorski & Kolakowski, 2000; Losada et al., 2007). De acuerdo con los resultados actuales, la inmersión previa en SMB demostró ejercer un efecto favorable sobre el control de la oxidación lipídica secundaria.

El **análisis del pardeamiento** en el músculo muestra que la fluorescencia aumentó a medida que el tiempo de almacenamiento congelado progresaba en todos los lotes (Fig. 2 del anexo VI). Se encontraron valores de fluorescencia menores en los dos lotes SMB en comparación con los correspondientes a los lotes control (BC y WC). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las muestras correspondientes a los dos lotes SMB. A partir de estos resultados, se concluyó que la inmersión previa en solución acuosa con SMB (en cualquiera de las dos concentraciones evaluadas en este estudio) conduce a una inhibición marcada del pardeamiento del músculo de los crustáceos.

Este parámetro químico (valor de fluorescencia/pardeamiento) ya había demostrado ser una herramienta precisa para evaluar la pérdida de la calidad del pescado durante el almacenamiento refrigerado (Losada et al., 2004; Losada et al., 2007) y el almacenamiento congelado (Losada et al. 2007). En el estudio actual, se sugieren dos vías que pueden influir

en este índice de calidad durante el almacenamiento congelado. Por un lado, la formación de compuestos de interacción entre los productos de oxidación de lípidos (primaria y secundaria, sustratos electrófilos), moléculas similares a proteínas (proteínas, péptidos y aminoácidos libres) y fosfolípidos (sustratos nucleofílicos, pardeamiento no enzimático) (Losada et al., 2004; Howell, 1995) que conducen a compuestos con propiedades fluorescentes. Por otro lado, el desarrollo de la melanosis, iniciado por la acción de polifenoloxidasas (PPO) sobre compuestos monofenólicos, y que conduce a la formación de compuestos de alto peso molecular de color oscuro (pardeamiento enzimático) (Montero et al., 2001; Rotllant et al., 2002). En consecuencia, los aumentos de los valores de fluorescencia determinados en este estudio serían resultado de las dos vías (pardeamiento no enzimático y enzimático).

En cuanto a la evaluación de pardeamiento no enzimático, se encontró una buena correlación con la formación de TBARS y el olor externo. En relación al desarrollo enzimático, se obtuvo una correlación razonable con el color exterior. Teniendo en cuenta ambos mecanismos de deterioro, y de acuerdo con la evaluación de la aceptación sensorial, se concluye que la inmersión previa a la congelación y al almacenamiento en congelación inhibió el desarrollo del pardeamiento, lo que conduce a una mayor retención de la calidad de la langostilla congelada.

En relación al **análisis de los grupos de ácidos grasos**, vale la pena señalar que la langostilla inicialmente mostró contenidos medios relativamente altos para ácidos grasos poliinsaturados y omega 3-PUFA (49.72 y 45.23 g/100g total de FAME, respectivamente). Se sabe que una mayoría de la población occidental no consume niveles adecuados de ácidos grasos omega 3 a través de fuentes dietéticas naturales, tales como las especies marinas. En este caso, se ha prestado gran atención a la relación omega 3 / omega 6 de los alimentos incluidos en la dieta humana, siendo recomendada una relación cercana a 1 : 6 (omega 3 / omega 6 (Simopoulos, 1994). En el presente estudio, se encontró una relación 10.12 para la langostilla.

Durante el procesamiento de alimentos marinos, los **compuestos de aminas volátiles** se producen parcialmente por medio de la actividad enzimática endógena, pero sobre todo como resultado del desarrollo microbiano (Ashie et al., 1996). En el presente estudio, la actividad microbiana fue fuertemente inhibida durante el almacenamiento en congelado. Por consiguiente, el contenido en TVB-N aumentó como resultado de la descomposición bioquímica de proteínas y compuestos NPN (Mackie, 1993; Sikorski & Kolakowska, 1994), entre los que la degradación de óxido de trimetilamina en dimetilamina y formaldehído se ha demostrado que tiene una mayor relevancia para crustáceos durante su almacenamiento en congelación (Bianchi et al., 2007).

Las comparaciones entre lotes mostraron valores más altos de TMA-N en las muestras correspondientes al lote SMB-75; sin embargo, los valores de TMA-N se mantuvieron en todos los casos muy por debajo del límite normalmente aceptado de 5mg de TMA-N / 100g de músculo (Finne, 1992).

4.4. BIBLIOGRAFÍA

Andrade, P., Barbosa, M., Pedro Matos, R., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T. & Valentao, P. Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry*, 2013, 138, 1819-1828.

Ashie, I., Smith, J., Simpson, B., Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1996, 36, 87-121.

Aubourg, S. Review: recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1999, 76, 409-419.

Aubourg, S., Fluorescence study of the pro-oxidant effect of free fatty acids on marine lipids. *J. Sci. Food Agric.* 2001, 81, 385-390.

Aubourg, S., Losada, V., Gallardo, J., Miranda, M., Barros-Velázquez, J., On-board quality preservation of megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) by a novel ozonised-slurry icesystem. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 223, 232-237.

Aubourg, S., Losada, V., Prado, M., Miranda, J. & Barros-Velazquez, J. Improvement of the commercial quality of chilled Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in slurry ice: Effects of a preliminary treatment with an antimelanogenic agent on enzymatic browning. *Food Chemistry*, 2007, 103, 741-748.

Baixas-Noguera, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogue's, T., Vidal-Carou, C., Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6-8°C) and stored in ice. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6504-6510.

Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, T., Nunes, M. L., & Vidal-Carou, C. Development of a quality index method to evaluate freshness in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Science*. 2003, 68, 1067-1071.

Barassi, C., Pe'cora, R., Roldán, H., Trucco, R., Total, nonvolatile free fatty acids as a freshness index for hake (*Merluccius hubbsi*) stored in ice. *J. Sci. Food Agric.* 1987, 38, 373-377.

Barros-Velázquez, J., Gallardo, J., Calo, P., Aubourg, S., Enhanced quality and safety during on-board chilled storage of fish species captured in the Grand Sole North Atlantic fishing bank. *Food Chem.* 2008, 106, 493-500.

Bianchi, F., Careri, M., Musci, M., Mangia, A., Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC MS analysis. *Food Chem.* 2007, 100, 1049-1053.

Boletín Oficial del Estado (BOE), *Real Decreto 142/2002* por el que se aprueba la lista de aditivos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios así como sus condiciones de utilización (no. 44, February 20th). Spanish Government, Madrid (Spain) 2002, pp. 6756-6799.

Cadun, A., Cakli, S. & Kislá, D. A study of marination of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) and its shelf life. *Food Chemistry*. 2005, 90, 53-59.

Campos, C., Gliemmo, M., Aubourg, S. & Barros-Velazquez, J. Novel technologies for the preservation of chilled aquatic food products. In: *Novel Technologies in Food Science*, 2012 (edited by A. McElhatton & P. Amaral Sobral). Pp. 299-323, chapter 13. New York, USA: Springer.

- Campos, C., Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S., & Barros-Velázquez, J. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103, 121-130.
- Chen, J., Charest, D., Marshall, M. & Wei, C. Comparison of two treatment methods on the purification of shrimp polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1997, 75, 12-18.
- Chinivasagam, H., Bremner, H. & Reeves, R. Can storage bacteria cause blackspot (melanosis) in stored prawns. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, 27, 5-8.
- Civera, T., Turi, R., Bisio, C., Parisi, E. & Fazio, G. Sensory and chemical assessment of marine teleosts. Relationship between total volatile basic nitrogen, trimethylamine and sensory characteristics. *Science des Aliments* 1995, 13, 109–117.
- Cyprian, O., Sveinsdottir, K., Magnusson, H. & Martinsdottir, E. Application of quality index method (QIM) scheme and effects of short-time temperature abuse in shelf life study of fresh water Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2008, 17, 303-321.
- Decker, E., Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci. Technol.* 1998. 9, 241–248.
- Finne, G, Non-protein nitrogen compounds on fish and shellfish, in: Flick, G., Martin, R. (Eds.), *Advances in Seafood Biochemistry*, Technomic Publishing, Lancaster, PA (USA) 1992, pp. 393-399.
- Howell, N., Interaction of proteins with small molecules. in: Gaonkar, A. (Ed.), *Ingredient: Interactions- Effects on Food Quality*, Marcel Dekker, New York (USA), 1995, pp. 269–289.
- Ingemansson, T., Kaufmann, P., Ekstrand, B., Multivariate evaluation of lipid hydrolysis and oxidation data from light and dark muscle of frozen stored rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2046–2052.
- Jamshidian, M., Arab Tehrani, E., Imran, M., Javeed Akhtar, M., Cleymand, F. & Desobry, S. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA antioxidants films. *Journal of Food Engineering*, 2012, 110, 380-389.
- King, I., Childs, M., Dorsett, C., Ostrander, J. & Monsen, E. Shellfish: Proximate composition, minerals, fatty acids and sterols. *Journal of the Dietetics Association*, 1990 90, 677-685.
- Kirschnik, P. & Viegas, E. Alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante estocagem em gelo. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2004, 23, 407-412.
- Kyranas, V. & Lougovois, V. Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 2002, 37, 319–328.
- Labuza, T., Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* 1971, 2, 355–405.
- Losada, V., Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J., Aubourg, S., Effect of slurry ice on chemical changes related to quality loss during European hake (*Merluccius merluccius*) chilled storage. *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 219, 27–31.

- Losada, V., Rodriguez, O., Miranda, J.M., Barros-Velazquez, J. & Aubourg, S.P. Development of different damage pathways in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored under different chilling systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006 86, 1552–1558.
- Losada, V., Barros-Velázquez, J., Aubourg, S., Rancidity development in frozen pelagic fish: Influence of slurry ice as preliminary chilling treatment. *LWT - Food Sci Technol.* 2007, 40, 991-999.
- Lugasi, A., Losada, V., Hóvári, J., Lebovics, V., Jakóczy, I., Aubourg, S., Effect of pre-soaking whole pelagic fish in a plant extract on sensory and biochemical changes during subsequent frozen storage. *LWT - Food Sci. 552 Technol.* 2007, 40, 930-936.
- Mackie, I., The effects of freezing on flesh proteins. *Food Rev. Intern.* 1993, 9, 575-610.
- Maldhavi, D.L., Desphande, S.S. & Salunkhe D.K. *Food antioxidants*,. 1995, New York, USA: Marcel Dekker.
- Martinez-Alvarez, O., Gomez-Guillen, M.C. & Montero, P. Chemical and microbiological quality indexes of Norwegian lobster (*Nephrops norvegicus*) dusted with sulphites. *International Journal of Food Science and Technology*, 2008, 43, 1099-1110.
- Martinsdottir, E., Sveinsdottir, K., Lutén, J., Schelvis-Smit, R. & Hyldig, G. *Reference manual for the fish sector: sensory evaluation of fish freshness*,. 2001, Ijmuiden, Netherlands: QIM Eurofish.
- McEvily, A., Iyengar, R. & Otwell, S. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technology*, 1991, 45, 82-86.
- Mendes, R., Huidobro, A., López-Caballero, E., Indole levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) from the Portuguese coast. Effects of temperature abuse. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 214, 125-130.
- Montero, P., López-Caballero, M., Pérez-Mateos, M., The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). *J. Food Sci.* 2001, 66, 1201-1206.
- Moura, A., Mayer, D., Landgraf, M. & Tenuta Filho, A. Qualidade química e microbiológica de camarão-rosa comercializado em São Paulo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 39, 203-208.
- Oral, N., Gülmez, M., Vatanserver, L., & Güven, A. Application of antimicrobial ice for extending shelf life of fish. *Journal of Food Protection*, 2008, 71, 218-222.
- Pastoriza, L., Bernárdez, M., Sampedro, G., Cabo, M. & Herrera, J. The use of water and ice with bactericide to prevent onboard and onshore spoilage of refrigerated megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*). *Food Chemistry*, 2008, 110, 31–38.
- Piclet, G., Le poisson aliment. Composition et intérêt nutritionnel. *Cahiers de Nutrition et Diététique*, 1987, XXII, 317–335.
- Pigott, G., Tucker, B., Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. *Food Rev. Int.* 1990, 3, 105–138.
- Quitral, V., Donoso, M L., Ortiz, J., Herrera, M V., et al. Chemical changes during the chilled storage of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*): Effect of a plant extract-icing system. *Food Sci. Technol.* 2009, 42, 1450–1454.

- Rea, S., Latini, M., Branciari, R. & Antonio, E. Influence of the amounts of sulfites on shrimp (*Nephrops norvegicus*) storage. *Industria Alimentari*, 1998, **37**, 178-181, 186.
- Refsgaard, H., Brockhoff, P., Jensen, B., Free polyunsaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48**, 3280–3285.
- Richards, M., Kelleher, S., Hultin, H., Effect of washing with or without antioxidants on quality retention of mackerel fillets during refrigerated and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 2002, **46**, 4363-4371.
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Res. Int.* 2001, **34**, 441–447.
- Ruiz-Capillas, C., Morales, J., & Moral, A. Combination of bulk storage in controlled and modified atmospheres with modified atmosphere packaging system for chilled whole gutted hake. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001, **81**, 551-558.
- Rodríguez, O., Barros-Velázquez, J., Ojea, A., Pineiro, C., & Aubourg, S. Evaluation of sensory and microbiological changes and identification of proteolytic bacteria during the iced storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science* 2003, **68**, 2764-2771.
- Rodríguez, Ó., Losada, V., Aubourg, S., & Barros-Velázquez, J. Enhanced shelflife of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International*, 2004, **37**, 749-757.
- Rosa, R., Nunes, M^aL., Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). *J. Sci. Food Agric.* 2003, **84**, 89-94.
- Rotllant, G., Arnau, F., Garcia, J., Garcia, N., Rodriguez, M. & Sarda, F. Effect of metabisulphite treatments and freezing on melanosis inhibition in rose shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Food Science and Technology International*, 2002, **8**, 243-247.
- Sandsdalen, E., Haug, T., Stensvag, K. & Styrvold, O. The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, **19**, 777-782.
- Sanjuás-Rey, M., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. Effect of different icing conditions on lipid damage development in chilled horse mackerel (*Trachurus trachurus*) muscle. *Grasas y Aceites*, 2011, **62**, 436-442.
- Sanjuás-Rey, M., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. Microbiological activity inhibition in chilled mackerel (*Scomber scombrus*) by employment of an organic acid-icing system. *Journal of Food Science*, 2012, **77**, M264-M269.
- Sanjuás-Rey, M., García-Soto, B., Fuertes-Gamundi, R., Aubourg, S., & Barros-Velázquez, J. Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, **46**, 217-223.
- Sista, R., Erickson, M., Shewfelt, R, Quality deterioration in frozen foods associated with hydrolytic enzyme activities, in: Erickson, M., Hung, Y.-C. (Eds.), *Quality in frozen food*, Chapman and Hall, New York (USA), 1997, pp. 101-110.
- Sikorski, Z., Kolakowska, A., Changes in protein in frozen stored fish. in: Sikorski, Z., Sun Pan B., Shahidi, F. (Eds.), *Seafood Proteins*, Chapman and Hall, New York (USA), 1994, pp. 99–112.

Sikorski, Z., Kolakowski, E., Endogenous enzyme activity and seafood quality: Influence of chilling, freezing, and other environmental factors, in: Haard, N., Simpson, B. (Eds.), *Seafood enzymes*, Marcel Dekker, New York (USA), 2000, pp. 451-487.

Simopoulos, A., Fatty acids, in: Goldberg, I. (Ed.), *Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*, Chapman and Hall, New York (USA), 1994 pp. 355-392.

Simopoulos, A. Nutritional aspects of fish. In: *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality* (edited by J. Luten, T. Borrensen & J. Oehlenschlager). 1997, Pp. 589-607. London, UK: Elsevier Science.

Stodolnik, L., Blasiak, E., Broszedzka, H., Effect of Tween 80, citric acid and acetylsalicylic acids on changes in muscle tissue lipids of Baltic herrings during storage. *Chlodnictwo*, 1992, 27, 29–35.

Sveinsdottir, K., Hyldig, G., Martinsdottir, E., Jorgensen, B. & Kristbergsson, K. Application of Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Quality and Preference*, 2002, 14, 237-245.

Tejada, M., Huidobro, A., Mohamed, G., Comparison of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and hake (*Merluccius merluccius*) muscle proteins during iced and frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 2003, 83, 113–122.

Tierney, M., Smyth, T., Hayes, M., Soleer-Vila, A., Croft, A. & Brunton, N. Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology*, 2013, 48, 860-869.

White, P., Conjugated diene, anisidine value and carbonyl value analyses. in: Warner, K., Eskin, M. (Eds.), *Methods to Assess Quality and Stability of Oils and Fat-containing Foods*, AOCS Press, Champaign, Illinois, (USA), 1994, pp. 159–178.

Whittle, K., Hardy, R., Hobbs, G., Chilled fish and fishery products. in: Gormley, T. (Ed.), *Chilled Foods. The State of the Art*, Elsevier Applied Science, New York (USA), 1990, pp. 87–116.

York, G. & Vaughn, R. Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 1964, 88, 411-417.

Se han utilizado también las publicaciones de cada anexo de los capítulos para la discusión dentro de otros capítulos relacionados.

5. CONCLUSIONES

Se muestran las conclusiones específicas de cada capítulo y las conclusiones generales para cada una de las tres partes en las que se ha dividido el presente trabajo.

PARTE 1. APLICACIÓN DE HIELO INCLUYENDO COMPONENTES CONSERVANTES.

Capítulo 1.

La incorporación de ácido cítrico y ácido láctico al 0.175% y 0.050%, respectivamente, en el hielo en escamas, permitió ralentizar el desarrollo microbiano en merluza refrigerada, observándose reducciones de más de 2 log UFC/g para ciertos grupos microbianos. Este resultado se correlacionó con una menor formación de TMA-N, menor oxidación lipídica y una mayor vida útil del producto.

Capítulo 2.

La presencia de ácido cítrico y ácido láctico en el hielo en escamas permitió un mayor control microbiológico en gallo refrigerado, correlacionándose este resultado con una menor formación de TMA-N y de compuestos de amonio. Este efecto se tradujo en un aumento de la vida útil del producto, lo que hace pensar que este sistema de hielo con ácidos orgánicos sería una interesante estrategia productiva en la obtención de pescado refrigerado de mayor calidad.

Capítulo 3.

La presencia de ácido cítrico y ácido láctico en el medio de formación del hielo en escamas, condujo a una inhibición del deterioro y a una mejora de la calidad en merluza y gallo durante su almacenamiento refrigerado a bordo. Dicho efecto derivó de una ralentización significativa del crecimiento microbiano y de parámetros químicos asociados. Los resultados descritos en este estudio permiten concluir que el empleo a bordo del sistema de hielo con ácidos orgánicos naturales sería una estrategia rentable de cara a obtener productos de mayor calidad y seguridad, pudiendo alcanzar mayor valor comercial durante la venta.

CONCLUSIONES PARTE 1.

Partiendo del efecto conservante encontrado para distintas especies de pescado magro conservadas en refrigeración con hielo en escamas formado a partir de una solución acuosa con una mezcla comercial basada en ácido láctico, ácido cítrico y ácido ascórbico tal y como se ha descrito en el apartado 2.1 del presente trabajo, se ha diseñado una formulación en base acuosa con concentraciones conocidas y mejoradas de ácido cítrico y ácido láctico puros, cuya actividad conservante para distintas especies de pescado magro conservadas en refrigeración con hielo producido a partir de dicha solución ha sido demostrada en laboratorio y a bordo. Esta mezcla es de fácil preparación, además de ser una opción más económica. De esta forma se ha demostrado la viabilidad de su utilización a bordo, obteniendo así una alternativa interesante, tanto económicamente como por la facilidad de su uso, para la preservación de la calidad y alargamiento de la vida útil de especies de pescado magro capturadas por la flota de fresco.

PARTE 2. APLICACIÓN DE LÁMINAS BIODEGRADABLES INCLUYENDO COMPONENTES CONSERVANTES

Capítulo 4.

El empleo de una película a base de PLA incluyendo ácido sórbico y un liofilizado del alga *Fucus spiralis* ejerce un efecto protector sobre la calidad de gallo refrigerado. El análisis sensorial reveló que los lotes del pescado que estuvieron en contacto con el biofilm de PLA que incluía 8% de alga y 1% de ácido sórbico todavía eran aceptables a día 11 de almacenamiento, a diferencia del lote control. Dicho efecto es el resultado de un mayor control de los mecanismos microbiológicos y bioquímicos responsables del deterioro del producto.

CONCLUSIONES PARTE 2.

Este estudio ofrece un primer acercamiento para la sustitución de la película de polietileno actualmente empleada a bordo por un nuevo tipo de embalaje ecológico. Los resultados obtenidos constituyen una base prometedora para la mejora de la preservación de la calidad del pescado durante el largo almacenamiento a bordo y para la reducción de residuos producidos durante los diferentes pasos incluidos en la cadena de comercialización de pescado, desde el almacenamiento a bordo hasta la venta al consumidor.

Se prevé la realización de investigación adicional en relación con la optimización de la aplicación de las películas basadas en PLA a especies marinas, no solo enfocado a su utilización a bordo, sino también en tierra en empresas de elaboración y procesado de pescado.



PARTE 3. APLICACIÓN DE BISULFITO SÓDICO PARA LA CONSERVACIÓN DE UNA ESPECIE INFRAVALORADA

Capítulo 5.

El tratamiento con antimelanósico con anterioridad al almacenamiento en refrigeración permitió extender la vida útil de la langostilla hasta los 10 días, a diferencia del lote control. El tratamiento con antimelanósico también permitió la inhibición significativa del crecimiento microbiano, así como una mayor retención de ácidos grasos poliinsaturados.

Capítulo 6.

La utilización de un agente anti-melanósico por inmersión permitió la extensión de la vida útil de langostilla almacenada en congelación con respecto al lote control. En relación con la retención de PUFA, la evaluación química del pardeamiento (enzimático y no enzimático) mostró asimismo una marcada inhibición en la carne de langostilla previamente tratada con agente antimelanósico, en comparación con sus homólogos de los lotes control. El tratamiento por inmersión previa a la congelación permitió asimismo ralentizar los mecanismos de hidrólisis lipídica.

CONCLUSIONES PARTE 3.

Los resultados obtenidos en este estudio abren el camino a la comercialización potencial de la langostilla, especie actualmente infrutilizada (descartada), como producto marino refrigerado y congelado. Se ha dado un pequeño paso cara a la preservación de la calidad de esta especie, con la aplicación del tratamiento previo por inmersión en un agente antimelanósico. Se necesitaría una investigación más profunda para reforzar las posibilidades comerciales y tecnológicas de cara a proporcionar al consumidor esta especie nueva, atractiva y con alto valor nutritivo, que incluye valores altos de contenido en PUFA y $\omega 3/\omega 6$. Estos resultados aportan a la flota de arrastre de fresco del caladero de Gran Sol una opción viable de cara al cumplimiento de la nueva PPC y su principal objetivo de disminución de descartes.





RESUMEN

El presente proyecto de tesis supone el estudio en profundidad de la mejora de la calidad de las principales especies marinas capturadas por la flota gallega que pesca en caladeros comunitarios, incluyendo una especie infrautilizada e infravalorada hasta la actualidad. El objetivo común ha consistido en aplicar técnicas de conservación susceptibles de mejorar o posibilitar su conservación a bordo. El aumento de la vida útil se abordó mediante distintas técnicas de aplicación de compuestos preservantes a las especies elegidas para su conservación en refrigeración o congelación. Para verificar el posible efecto inhibitor de la alteración de las distintas estrategias ensayadas, se realizaron análisis bioquímicos, microbiológicos y sensoriales en las muestras tratadas en el laboratorio o a bordo.

