



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Ciencias

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA,

NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

*Evaluación de recubrimientos comestibles
proteicos aplicados al salmón del Atlántico
(Salmo salar) congelado: estudio de diferentes
formulaciones y tratamientos tecnológicos*

Laura Rodríguez Turienzo

TESIS DOCTORAL

Lugo, 2011



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE CIENCIAS
CAMPUS DE LUGO**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA
ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

D. **Ángel Cobos García** y Dña. **Olga Díaz Rubio**, Profesores Titulares del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la **Universidad de Santiago de Compostela**.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES PROTEICOS APLICADOS AL SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) CONGELADO: ESTUDIO DE DIFERENTES FORMULACIONES Y TRATAMIENTOS TECNOLÓGICOS**”, presentada por Dña. **Laura Rodríguez Turienzo**, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en la Facultad de Ciencias de Lugo y cumple todos los requisitos exigidos por la normativa vigente. Por consiguiente, **autorizamos** su presentación ante el tribunal correspondiente.

Y para que así constefirman la presente en Lugo, a 19 de septiembre de 2011.

Fdo.: Ángel Cobos García

Fdo.: Olga Díaz Rubio

La doctoranda, Laura Rodríguez Turienzo

AGRADECIMIENTOS

Quisiera que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta, han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Ángel Cobos y a la Dr. Olga Díaz, cotutores de esta tesis, por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica en su grupo y permitirme ser la tercera pata del banco durante esta etapa.

Al Dr. Carlos Pereira por su colaboración desinteresada.

A Bea, mucho más que una compañera de facultad y laboratorio, una amiga para toda la vida. También a Loreto, amiga de importación e increíble persona.

A mis compañeros de la tercera planta; tanto a los que ya no están: Alberto, Jose, Diana, Inma (gracias por tu ayuda), Carlos (Charlie), Perejón, Belén, Noelia y Areli, como a los que siguen ahí: Cris, Juan, Santi, Sonia y Lucas. También de manera especial a Ángeles y Javi, compañeros y amigos con los que he compartido este camino y que me han enseñado y ayudado tanto. Por último, a Jorge y a Dani por su amistad, apoyo incondicional y por ayudarme a crecer cada día y sacar lo mejor de mí.

A los pilares de esta facultad, los PAS, que con su trabajo y simpatía mantienen esta entidad en funcionamiento. Especialmente a Quique por sus interminables charlas, a Manolo por ayudarme con todos los papeleos, a Felipe, Carmen y Jose Antonio por abrirme tantas puertas, a Jose por hacer las horas de trabajo más llevaderas, y a Marga, Emiliano, Conchi, Alfonso, Manuel y Juan Carlos, gracias por vuestro cariño y amistad. También quisiera incluir aquí a Ramón, nuestro Papá Noel particular.

A mis compañer@s, profesor@s y amig@s de Biología, Tecnología de los Alimentos, del Máster de Seguridad e Innovación Alimentaria y de la Escuela de Idiomas, que han compartido conmigo esta larga y dura etapa, y que espero que continúen en mi vida durante mucho más tiempo.

A mis amig@s de toda la vida, pues sin ell@s la vida no sería del mismo color. En especial a Marián, aunque no existen suficientes palabras de agradecimiento, gracias por tu apoyo, comprensión, ánimos e infinita paciencia. También a Jose, una de las mejores personas que he conocido, a pesar de sus inclinaciones futbolísticas.

Muy en especial a mis padres y hermano por su cariño, apoyo y paciencia, ingredientes sin los cuales nada de esto habría sido posible.

A Maribel y todo su equipo por su inestimable ayuda.

A la Xunta de Galicia por la financiación de los proyectos de Investigación PGIDIT06TAL00801CT y 07TAL009262PR (Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica). El primero también cofinanciado por ANFACO-CECOPESCA, a quien así mismo agradezco su colaboración en el desarrollo de parte del análisis sensorial.

Por último quisiera agradecer a todas aquellas mujeres que con su talento y tesón han abierto el camino para que las universitarias y doctorandas de hoy en día tengamos las mismas oportunidades que nuestros compañeros.

A tod@s ell@s, muchas gracias, pues me voy con mucho más de lo que vine.

"Para investigar la verdad es preciso dudar, en cuanto sea posible, de todas las cosas"
René Descartes

*"Lo escuché y lo olvidé;
lo vi y lo entendí;
lo hice y lo aprendí"*
Confucio

*"Dos caminos se bifurcaban en un bosque, y yo,
yo tome el menos transitado,
y eso marcó toda la diferencia"*
Robert Frost.

*"La ciencia es una sola luz, e iluminar con ella cualquier parte, es iluminar el mundo
entero."*
Isaac Asimov

A mis padres,

ÍNDICE

<i>Summary</i>	V
<u>PARTE I: INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u>	
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	I
I. PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES.....	1
1.1. DEFINICIÓN.....	1
1.2. HISTORIA.....	2
1.3. FUNCIONES.....	3
1.4. REQUERIMIENTOS.....	5
1.5. COMPOSICIÓN.....	8
1.5.1 Base polimérica.....	8
1.5.2 Plastificantes.....	28
1.6. ELABORACIÓN DE PELÍCULAS Y/O RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES.....	33
1.6.1 Mecanismos de formación.....	33
1.6.2 Modificación proteica y entrecruzamiento.....	37
1.6.3 Técnicas de aplicación de los envases comestibles.....	55
II. EL SALMÓN CONGELADO: ALTERACIONES DURANTE SU ALMACENAMIENTO.....	58
1.7. GENERALIDADES DEL SALMÓN DEL ATLÁNTICO.....	58
1.8. CONSERVACIÓN DEL PESCADO EN CONGELACIÓN Y ALTERACIONES DURANTE SU ALMACENAMIENTO.....	63
1.8.1 Alteración de la textura.....	65
1.8.2 Alteración del color.....	67
1.8.3 Alteración lipídica: rancidez o enranciamiento.....	70
III. APLICACIONES DE LAS ENVUELTAS COMESTIBLES EN PESCADOS Y OTROS PRODUCTOS DE ORIGEN MARINO CONGELADOS.....	75
CAPÍTULO 2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	85
<u>PARTE II: MATERIAL Y MÉTODOS</u>	
CAPÍTULO 3 MATERIAL Y MÉTODOS	89
× MATERIALES.....	89
3.1. APARATOS DE LABORATORIO.....	89
3.2. REACTIVOS, DISOLVENTES Y GASES.....	91
3.3. MATERIAL BIOLÓGICO.....	91
3.3.1 Salmón del Atlántico.....	91
3.3.2 Productos proteicos.....	91
3.3.3 Transglutaminasa.....	94
× METODOLOGÍA.....	95
3.4. PREPARACIÓN DE LOS FILETES DE SALMÓN:.....	95
3.5. PREPARACIÓN DE LAS ENVUELTAS:.....	95
3.5.1 Preparación de las envueltas con distinta base proteica.....	95

3.5.2 Preparación de envueltas de proteínas de lactosuero sometidas a tratamientos físicos y enzimáticos.....	99
3.6. APLICACIÓN DE LAS ENVUELTAS, ALMACENAMIENTO, DESCONGELACIÓN, PROCESADO Y DETERMINACIONES.....	103
3.7. DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS	107
3.7.1 Rendimiento	107
3.7.2 Rendimiento tras descongelar.....	108
3.7.3 Pérdidas por goteo al descongelar	108
3.7.4 Pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración	109
3.7.5 Pérdidas por cocinado.....	110
3.7.6 pH	110
3.7.7 Extracto seco.....	111
3.7.8 Cenizas.....	111
3.7.9 Contenido lipídico.....	112
3.7.10 Extracto seco magro	113
3.7.11 Parámetros de color	113
3.7.12 Grado de oxidación de los lípidos	115
3.8. ANÁLISIS SENSORIAL	119
3.8.1. Análisis sensorial de muestras de salmón recubiertas con CPS+glicerol sometidas a tratamiento térmico.....	119
3.8.2. Análisis sensorial de muestras de salmón recubiertas con CPS o APS+glicerol sometidas a tratamiento de ultrasonificación	127
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	129

PARTE III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4 APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ELABORADOS CON CONCENTRADOS PROTEICOS DE LACTOSUERO (CPS) EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO CONGELADO: EFECTO DEL PLASTIFICANTE Y DEL MOMENTO DE APLICACIÓN..... 131

4.1. CARACTERÍSTICAS DEL SALMÓN EMPLEADO COMO MATERIA PRIMA	131
4.2. RENDIMIENTOS, PÉRDIDAS POR GOTEO Y POR COCINADO.....	135
4.3. EXTRACTO SECO, LÍPIDOS Y CENIZAS.....	142
4.4. PARÁMETROS DE COLOR.....	147
4.5. ÍNDICES DE OXIDACIÓN.....	155

CAPÍTULO 5 APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ELABORADOS CON OVOALBÚMINA PURIFICADA (OVO) EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO CONGELADO: EFECTO DEL PLASTIFICANTE Y DEL MOMENTO DE APLICACIÓN 165

5.1. CARACTERÍSTICAS DEL SALMÓN EMPLEADO COMO MATERIA PRIMA	165
5.2. RENDIMIENTOS, PÉRDIDAS POR GOTEO Y POR COCINADO.....	167
5.3. EXTRACTO SECO, LÍPIDOS Y CENIZAS.....	172
5.4. PARÁMETROS DE COLOR.....	176
5.5. ÍNDICES DE OXIDACIÓN.....	182

CAPÍTULO 6 ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE ENVUELTAS ELABORADAS CON CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SOJA (SOJA) EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO CONGELADO: EFECTO DEL PLASTIFICANTE Y DEL MOMENTO DE APLICACIÓN.....	193
6.1. CARACTERÍSTICAS DEL SALMÓN EMPLEADO COMO MATERIA PRIMA	193
6.2. RENDIMIENTOS, PÉRDIDAS POR GOTEY Y COCINADO.	195
6.3. EXTRACTO SECO, LÍPIDOS Y CENIZAS.....	200
6.4. PARÁMETROS DE COLOR.....	204
6.5. ÍNDICES DE OXIDACIÓN.....	211
CAPÍTULO 7 EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO O CON ULTRASONIDOS CON O SIN TRANSGLUTAMINASA SOBRE RECUBRIMIENTOS ELABORADOS CON CONCENTRADO Y AISLADO PROTEICOS DE LACTOSUERO (CPS Y APS) APLICADOS A FILETES DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO CONGELADOS	221
7.1. CARACTERÍSTICAS DEL SALMÓN EMPLEADO COMO MATERIA PRIMA	221
7.2. RENDIMIENTOS, PÉRDIDAS POR GOTEY Y COCINADO.	222
7.3. EXTRACTO SECO, LÍPIDOS Y CENIZAS.....	226
7.4. PARÁMETROS DE COLOR.....	231
7.5. ÍNDICES DE OXIDACIÓN.....	234
CAPÍTULO 8 EFECTO DE LA ULTRASONICACIÓN SOBRE RECUBRIMIENTOS ELABORADOS CON CONCENTRADO Y AISLADO PROTEICOS DE LACTOSUERO (CPS Y APS) APLICADOS A FILETES DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO CONGELADOS.....	241
8.1. CARACTERÍSTICAS DEL SALMÓN EMPLEADO COMO MATERIA PRIMA	241
8.2. RENDIMIENTOS, PÉRDIDAS POR GOTEY Y COCINADO.	242
8.3. EXTRACTO SECO, LÍPIDOS Y CENIZAS.....	246
8.4. PARÁMETROS DE COLOR.....	250
8.5. ÍNDICES DE OXIDACIÓN.....	254
CAPÍTULO 9 ANÁLISIS SENSORIAL	261
9.1. ANÁLISIS SENSORIAL DE MUESTRAS DE SALMÓN RECUBIERTAS CON CPS+GLICEROL SOMETIDO A TRATAMIENTO TÉRMICO.....	261
9.2. ANÁLISIS SENSORIAL DE MUESTRAS DE SALMÓN RECUBIERTAS CON CPS O APS+GLICEROL SOMETIDAS A TRATAMIENTO DE ULTRASONICACIÓN	273
<u>PARTE IV: CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</u>	
CAPÍTULO 10 CONCLUSIONS.....	277
<i>With regard to the effects of different protein coating formulations on frozen Atlantic salmon quality parameters.....</i>	<i>277</i>
<i>With regard to the effects of whey protein coatings subjected to different treatments..</i>	<i>277</i>
<u>PARTE V: BIBLIOGRAFÍA</u>	
CAPÍTULO 11 BIBLIOGRAFÍA	279

“Evaluation of protein-based edible coatings applied on frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*): study of different formulations and technological treatments”

In a society increasingly concerned about environmental protection, our “use and throw” culture is coming to an end. This is giving way to a new sustainability awareness, in which a balance between food quality and environmental impact of packaging must be found. Accordingly, food industry and so researchers must develop new technologies which meet the market needs. Therefore, the growing interest in edible packaging development responds to the demands of consumers and producers for food with a longer shelf life and better sensory, nutritional and hygienic quality, and to a greater environmental concern about packaging production and disposal impact.

Salmon is an appreciated and well valued fish, not only for its taste and culinary qualities, but also for its healthy properties related to its high polyunsaturated fatty acids (omega-3) and vitamin D content. Moreover, salmon is one of the most valuable fishery products in the international trade. Due to the perishable character of the raw fish, different preservation methods are used in order to avoid its deterioration; among them, freezing is one of the main preservation techniques for human consumed fish. In the case of Atlantic salmon (*Salmo salar*), because of its high lipid content rich in polyunsaturated fatty acids prone to oxidation, the primary alteration during frozen storage is the lipid oxidation, which seems to be the key limiting factor of salmon shelf life. Apart from lipid oxidation, colour, yields and moisture losses are some of the key factors which determine sensory and nourishing quality of frozen fish, and eventually influence the product acceptability by consumers.

The interest in using animal or vegetal proteins as materials for coating production arises from: their ability to create a cohesive polymeric matrix with a high variety of molecular interactions, their antioxidant properties and their availability. Besides, the development of new applications for protein products (some of them even by-products of the food processing industry), is another driving force behind this interest.

The effectiveness of several technological treatments (ultrasonication or transglutaminase addition) in improving functional properties of biopolymers has been described. These treatments promote structural modifications and/or cross-linking of polymeric matrices such as proteins. Accordingly, the application of these techniques during coating preparation could improve the edible coating properties and could even substitute the heat treatment conventionally used in edible packaging obtaining.

Edible coatings made of different types of biodegradable polymers such as proteins, polysaccharides or lipid-based materials, have been shown effective to prolong shelf life and to maintain quality attributes during frozen or refrigerated storage of fish. However, there are not studies published about edible coating applied on Atlantic salmon. Moreover, despite of the existence of several works on edible coatings applied on frozen fish, there is an important lack of knowledge about important factors involved in coating elaboration and use. Parameters such as the application moment, the use of diverse types of plasticizers in different concentrations, or the application of technological treatments, which can improve the characteristics and functionality of coatings, have not been investigated yet.

Therefore, the development of edible protein-based coatings for frozen Atlantic salmon is very interesting for several reasons: firstly, they could constitute an environmental-friendly alternative to plastic packaging. Secondly, they could contribute to extend salmon shelf life maintaining the quality attributes of this fish of

widespread consumption, high nutritional properties and commercial value. Finally, these coatings could add economic value to some protein by-products.

The two main objectives of this Ph.D. thesis were:

- The evaluation of different edible protein-based coatings effects on several quality parameters of frozen Atlantic salmon fillets.
- The evaluation of the effects of different technological treatments [enzimatic (transglutaminase) and physical (ultrasonication or heat)] applied during coating elaboration on several quality parameters of frozen Atlantic salmon fillets.

In order to achieve the main objectives, the following secondary objectives were proposed:

- The evaluation of the effect of coatings based on different proteins: whey proteins, ovalbumin and soy proteins.
- The study of the influence of different types (glycerol or sorbitol) and concentrations (different protein /plasticizer ratios) of plasticizer.
- The determination of the effect of the coating application moment (before or after salmon freezing).
- The evaluation of the differences between the application of thermal or ultrasound treatment on coatings, with or without transglutaminase addition in both cases.
- The study of the effect of the ultrasound treatment duration on coating elaboration.

The methodology developed in order to achieve these objectives was divided in two parts, each of them linked to a main objective. With respect to the raw materials, the protein sources and products selected for this thesis, based on its

antioxidant activity, technological interest and availability, were: whey proteins [whey protein concentrate (WPC) and isolate (WPI)], soy [soy protein concentrate (SOY)] and egg [purified ovalbumin (OVO)]. Besides, eviscerated and ice-preserved Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) specimens were purchased at a local market.

Part I: effects of protein coatings subjected to different formulations and application moments on frozen Atlantic salmon quality parameters

Coatings were prepared from aqueous solutions of different types of proteins (WPC, OVO and SOY), using two types of plasticizers (glycerol or sorbitol) in different protein/plasticizer ratios, adjusting the pH and applying a thermal treatment according to the protein used. Moreover, coatings were applied in two different moments (before or after freezing) by immersion. Two different samples were used as controls: fillets without coating and glazed fillets (using distilled water). The latter were only compared with the samples coated after freezing. The fillets were stored at -20 °C for four months. After frozen storage and thawing, some fish samples of each fillet were cooked (90 °C/5 minutes) and others were stored at chilled temperatures (5 °C/24 hours).

The main parameters determined were: yields (yield, thaw yield, drip losses in thawing, drip losses after chilled storage, and cooking losses), physicochemical characteristics (pH, dry matter, lipid and ash content), colour, and lipid oxidation indexes [conjugated dienes, hydroperoxides and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values]. These parameters were measured on raw fish fillets, after frozen storage (before or after thawing) and some of them on chilled or cooked samples.

Part II: effects of whey protein coatings subjected to different treatments on frozen Atlantic salmon quality parameters

This part contained two studies. The first one evaluated the effect on frozen Atlantic salmon quality parameters of treated coatings with: a thermal (HEAT) or an ultrasound treatment (US), both with or without transglutaminase addition (TG). The treatment conditions were: HEAT (80 °C /30 min, using a thermostatic water bath); US (30 min, using an ultrasonic bath at a frequency of 35 kHz) and TG (adding 10 units of enzyme/g protein). Samples without coating were used as control.

In the second study, the effects of ultrasound-treated whey protein coatings on frozen Atlantic salmon quality parameters were evaluated. The experiment was performed using the ultrasonic bath at a frequency of 35 kHz and three ultrasonication times (1, 15 and 60 min). In this case, samples without coating and coated with untreated proteins were used as controls.

In both studies, coatings were prepared from aqueous solutions of whey protein concentrate (WPC) and isolate (WPI). The elaboration parameters such as protein concentration, type of plasticizer, protein/plasticizer ratio and pH were the same for all the coating preparations. All protein solutions were applied to fish pieces before freezing by immersion. Fillets were kept under frozen storage for four months at -10 °C. After frozen storage and thawing, some fish samples of each fillet were cooked or chilled as in part I. The determinations were also the same as those used in part I, with the exception of conjugated dienes.

Finally, sensory analyses were carried out on coating salmon fillets using the most suitable formulations and treatments from both experimental parts (I and II). This time, uncoated and/or glazed fish fillets were used as controls.

The most outstanding results of this Ph.D. thesis were:

Regarding each type of protein selected using different formulations and application moments (Part I):

All protein coatings (WPC, OVO, SOY) increased yield of salmon fillets comparing with uncoated ones.

The application of whey protein concentrate (WPC) coatings after freezing increased the thaw yield, decreased the drip losses and modified, to a lesser extent, the colour parameters of frozen and thawed fillets, in comparison with application before freezing. Moreover, coating the fish after freezing made the cooked fish fillets redder and yellower than non-coated and water glazed fillets. Whey coatings delayed lipid oxidation of salmon fillets, and this effect was more pronounced when glycerol was used in coating formulation. WPC+glycerol 1:1 coating was the best for the protection of frozen Atlantic salmon especially when it was applied before freezing. The sensory properties of salmon fillets were not modified by the use of this coating.

Ovalbumin-based coatings applied before freezing increased thaw yield, reduced water losses during frozen storage, decreased drip losses in thawing and modified, to a lesser extent, the colour of thawed fillets, in comparison with coatings applied after freezing. The ovalbumin coatings also delayed lipid oxidation of salmon fillets, particularly when glycerol was used in coating formulation and when they were applied before freezing. The formulation OVO+glycerol 2:1 applied before freezing was the best coating for the protection of frozen Atlantic salmon.

Soy protein-based coatings plasticized with sorbitol increased yield, thaw yield and reduced water losses during frozen storage and drip losses in thawing, comparing to glycerol added coatings. However, soy coatings with glycerol delayed lipid oxidation and modified, to a lesser extent, colour parameters of thawed pieces.

The most protective coating was SOY+glycerol 1:1 when it was applied after freezing. The quality parameters were not affected significantly by the moment of application of soy protein coatings.

Regarding the different treatments studied (Part II):

In relation to the first study, all treated whey coatings (HEAT, HEAT+TG, US and US+TG) increased the yield of salmon fillets comparing with uncoated ones. Specifically, HEAT-treated whey coatings with or without TG addition obtained higher yield values than US or US+TG. Besides, thaw yields also increased when HEAT whey coatings with or without TG addition were applied. In relation to drip losses after chilled storage and cooking losses, no significant differences between HEAT and US-treated coatings were observed.

Furthermore, all treated whey coatings (HEAT or US, with or without TG) also decreased lipid oxidation of salmon fillets comparing with uncoated ones. TBARS values were lower in US-treated coatings (without TG) than in HEAT-treated (without TG) ones, although the difference was only significant when WPC was used.

In general, the addition of transglutaminase did not affect the yields of the fillets protected by US or HEAT-treated coatings. The enzymatic treatment only decreased yield and drip losses in thawing of US-treated WPI coatings. With regard to lipid oxidation, the TG addition lowered TBARS values only to HEAT-treated WPC coatings.

Comparing the use of WPC or WPI with the different treatments studied, the employ of the former obtained lower modifications in colour parameters, lower cooking losses and reduced lipid oxidation levels (SRATB).

In relation to the second study, parameters such as the yield, the thaw yield, the drip losses in thawing, the drip losses after chilled storage and the cooking losses of

Summary

fish samples were not influenced by the ultrasound treatment of coatings, compared to fish samples with untreated whey protein coatings. Furthermore, the US treatments tested did not modify the colour of frozen and thawed fillets but increased luminosity (L^*) and whiteness of cooked samples in comparison with untreated whey protein coated samples. In addition, US-treated coating significantly delayed the lipid oxidation of salmon pieces in comparison with uncoated samples and those coated with untreated proteins.

The duration of the ultrasound treatment affected some protective characteristics of coatings. Decreases in yield, drip losses in thawing and drip losses after chilled storage were observed in samples from WPC or WPI proteins ultrasonicated 60 min compared with those ultrasonicated 15 min. The use of solutions treated with ultrasounds for 15 and 60 minutes decreased the lipid oxidation of fish fillets more than the shortest US treatment (1 min). In fact, a trend was reported, the longer is the US treatment, the lower oxidation values were determined.

Although most quality parameters studied were not influenced by the use of WPC or WPI with the different US times, the use of the former showed less impact on colour parameters of frozen and thaw fillets and reduced lipid oxidation (hydroperoxides), comparing with the latter. Finally, the sensory properties of salmon fillets were not negatively affected by the application of US-treated whey coatings.

According with the results obtained, the main conclusions of this Ph.D. thesis are the following:

With regard to the effects of different protein coating formulations and application moments on frozen Atlantic salmon quality parameters

1. The applications of whey protein concentrate, purified ovalbumin and soy protein concentrate as edible coatings increases the yield of the fillets and protects them from lipid oxidation during four months of frozen storage. All the protein coatings provide better protection against oxidation than glazing.
2. The effect of the moment at which the coating is applied (before or after freezing) is different depending on the type of protein. The best results are obtained with the application of whey protein concentrate coatings after freezing and with the application of ovalbumin before freezing. The quality parameters are not affected by the moment of application in soy protein coatings.
3. The protein+glycerol coatings are more suitable for the protection of frozen Atlantic salmon in relation to lipid oxidation than the sorbitol ones. No clear effects of the concentration of plasticizer (sorbitol or glycerol) in most quality parameters are found.
4. Whey protein concentrate+glycerol 1:1 coating is one of the best for frozen Atlantic salmon lipid protection. The sensory properties of salmon fillets are not modified negatively by the use of this coating.

With regard to the effects of whey protein coatings subjected to different treatments on frozen Atlantic salmon quality parameters

1. All treated whey coatings studied (heat, heat+transglutaminase, ultrasound and ultrasound+transglutaminase) increase the yield and decrease the lipid oxidation of salmon fillets comparing with uncoated ones. Both ultrasound and heat+transglutaminase treatments are the most protective ones from an oxidative point of view. Particularly, heat+transglutaminase coatings also obtain higher yields and thaw yields, as well as lower drip losses in thawing, comparing with ultrasound-treated coatings.
2. The ultrasound-treated coatings, significantly delays the lipid oxidation of salmon fillets in comparison with uncoated samples, those coated with untreated proteins and those coated with heat-treated whey concentrate proteins. The duration of the ultrasound treatment affects some protective characteristics of coatings. The use of ultrasound solutions for 15 and 60 minutes decreases the lipid oxidation of fish fillets more than the shortest ultrasound treatment (1 minute).
3. The addition of transglutaminase reduces the lipid oxidation in heat-treated whey protein concentrate coated fish. However, no significant effects on lipid oxidation are observed when the enzyme is added to heat-treated whey protein isolate coatings or ultrasound-treated whey coatings. In general, the yields of the samples protected by ultrasound or heat-treated coatings are not influenced by the addition of transglutaminase.
4. The sensory properties of salmon fillets are not negatively affected by the use of ultrasonicated whey coatings.

Capítulo 1 Introducción

I. Películas y recubrimientos comestibles

1.1. *Definición*

Cuando un envase, ya sea una película, una lámina, una capa fina o un recubrimiento, es parte integral de un alimento y se ingiere conjuntamente con él, entonces puede calificarse como “*envase comestible*” (Debeaufort *et al.*, 1998).

De manera general, las películas y recubrimientos comestibles pueden definirse como cualquier tipo de material utilizado para recubrir alimentos con el fin de prolongar su vida útil y que puede ser ingerido con ellos. En general su grosor es inferior a 0,3 mm (Pavlath & Orts, 2009).

Frecuentemente los términos película y recubrimiento se utilizan indistintamente para indicar que la superficie de un alimento se encuentra recubierta por una capa relativamente fina de un material con una cierta composición. Sin embargo, las películas (también denominadas films) son estructuras independientes que han sido previamente elaboradas y posteriormente aplicadas al alimento, mientras que los recubrimientos (o envueltas) son finas capas de material formadas directamente sobre la superficie de un producto alimentario con la intención de protegerlo o mejorarlo de alguna manera (Krotcha, 2002).

Las películas y recubrimientos comestibles pueden ser considerados *productos alimentarios, ingredientes, aditivos o sustancias en contacto con los*

alimentos. En la mayoría de los casos se les denomina aditivos ya que no proveen un valor nutricional significativo al alimento; sin embargo, si de alguna forma incrementan el valor nutricional del alimento, pueden ser calificadas como ingredientes (Debeaufort *et al.*, 1998).

1.2. Historia

A pesar de que la utilización de envases comestibles en alimentos pueda parecer de reciente aplicación, este tipo de tecnologías llevan empleándose desde hace siglos. Ya en China, en los siglos XII y XIII se utilizaban ceras para recubrir cítricos y evitar así su desecación durante el transporte (Hardenburg, 1967). En Europa este proceso era conocido como “larding”, el cual consistía en el almacenamiento de frutas con ceras o grasas para su posterior consumo. Este proceso prevenía la pérdida de agua, pero el grosor de la envuelta interfería en el intercambio gaseoso natural, lo que producía productos de menor calidad (Contreras-Medellín & Labuza, 1981).

Posteriormente en el siglo XV, una envuelta comestible denominada *yuba*, elaborada a partir de leche de soja hervida, se utilizaba en Japón y otras regiones de Asia para mejorar el aspecto y mantener la calidad de algunos alimentos (Gennadios *et al.*, 1993a). Durante el siglo XVI se practicaba en Inglaterra el recubrimiento con grasa de productos alimentarios, especialmente carnes, para prevenir también la pérdida de humedad (Kester & Fennema, 1986). En el siglo XIX, la sacarosa comenzó a utilizarse como envuelta protectora en nueces, almendras y avellanas para prevenir la oxidación y rancidez durante el almacenamiento. Durante ese siglo, numerosos recubrimientos gelatinosos basados en polisacáridos, incluyendo alginatos,

carragenatos, ésteres de celulosa, pectinas y derivados del almidón, se utilizaron para mejorar la calidad de la carne durante su almacenamiento (Contreras-Medellín & Labuza, 1981). Pero quizá la aplicación más importante se produciría en el siglo XX, con el desarrollo de emulsiones de ceras y aceite en agua, utilizadas en frutas para optimizar su apariencia, hacer de vehículo de fungicidas y retrasar la pérdida de agua (Kester & Fennema, 1986).

1.3. Funciones

El desarrollo de recubrimientos comestibles y biodegradables responde, por un lado, al creciente interés de consumidores y productores por alimentos de mejor calidad organoléptica, nutricional e higiénica; y, por otro lado, a una mayor concienciación del impacto medioambiental generado durante los procesos de obtención y eliminación de los envases.

El material de envasado puede evitar el deterioro de los alimentos, disminuyendo la interacción entre el alimento y el medio que le rodea, lo que representa una reducción en la pérdida o ganancia de humedad o aromas, oxidaciones y/o contaminaciones microbianas. Los envases comestibles ofrecen numerosas ventajas respecto a los materiales de envasado poliméricos tradicionales (Gennadios & Weller, 1990; Bourtoom, 2008).

Las películas y recubrimientos comestibles mejoran la calidad de los alimentos, protegiéndolos del deterioro físico, químico y biológico (Kester & Fennema, 1986). Entre sus funciones principales está la de constituir una barrera semipermeable a los gases y al vapor de agua (Krochta & Mulder-Johnston, 1997); mejorar las propiedades mecánicas y de manejo de los

alimentos (Mellenthin *et al.*, 1982), ayudando a mantener la integridad estructural de producto que envuelven; proteger los alimentos del crecimiento microbiano superficial, de cambios químicos inducidos por acción de la luz, oxidación de nutrientes, etc. (Kester & Fennema, 1986); ayudar a retener compuestos volátiles (Nisperos-Carriedo & Shaw, 1990; Miller *et al.*, 1998) y reducir el transporte de solutos y la migración de aceites y grasas. También pueden actuar de vehículo de aditivos alimentarios o sustancias activas como antimicrobianos, antioxidantes, aromatizantes, colorantes, etc. (Kester & Fennema, 1986); además, pueden mejorar las características nutritivas y sensoriales de los alimentos (Cisneros-Zevallos *et al.*, 1997; Mei *et al.*, 2002). Finalmente, la comestibilidad y biodegradabilidad son dos funciones extra, propias de los envases comestibles, y ausentes de manera conjunta en los sistemas de envasado convencional (Debeaufort *et al.*, 1998; Krochta, 2002).

Muchas de las funciones anteriormente descritas son similares a aquellas que presentan los envases sintéticos convencionales; sin embargo, los materiales de los envases comestibles deben elegirse en función del tipo de alimento al que se van a aplicar y sus principales mecanismos de deterioro de la calidad (Petersen *et al.*, 1999).

En un principio las películas y recubrimientos comestibles no se diseñaron con la finalidad de reemplazar totalmente a los materiales de envasado sintéticos, sino que su importancia radicaba en su capacidad para mejorar la calidad del alimento en general, extender el tiempo de vida útil y mejorar la eficiencia económica de los materiales de envasado (Kester & Fennema, 1986). Sin embargo, y debido a su capacidad de protección, pueden potencialmente reemplazar el uso de envases convencionales de manera

parcial, simplificando la estructura total de empaquetado, o bien de forma total, reduciendo, en ambos casos, el uso de los envases tradicionales (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997; Debeaufort *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista medioambiental, permiten reducir la generación de residuos plásticos de envasado y, a diferencia de otros recubrimientos, se formulan a partir de ingredientes que, en su mayoría, proceden de fuentes renovables o incluso de subproductos contaminantes, como en el caso del lactosuero de quesería.

En la mayor parte de las aplicaciones alimentarias, la función más importante es la reducción de la pérdida de humedad, debido a que mantener determinados valores de actividad de agua (a_w) es un factor de suma importancia en la calidad y seguridad de muchos alimentos (Contreras-Medellín & Labuza, 1981).

Los envases comestibles constituyen, por tanto, una alternativa de mayor sostenibilidad medioambiental al envasado con materiales sintéticos y una oportunidad de mejora nutricional, organoléptica y de la calidad de los alimentos envasados.

1.4. Requerimientos

Los requisitos que deben cumplir los envases alimentarios son complejos, debido a que los alimentos son sistemas dinámicos con una vida útil limitada y unas necesidades de envasado específicas y diferentes en función del tipo de producto del que se trate. Además, debido a que los envases comestibles están destinados al consumo humano junto con el

alimento, la seguridad alimentaria se convierte en un requisito clave en estos envases (Haugaard *et al.*, 2001).

De manera general, un envase comestible ideal debería reunir los siguientes requisitos (Pavlath & Orts, 2009):

- No contener componentes tóxicos o alérgicos en su formulación.
- Proporcionar estabilidad estructural y prevenir daños mecánicos durante el transporte, manipulación y utilización de los alimentos.
- Presentar una buena adhesión a la superficie del alimento a proteger, proporcionando así una protección uniforme.
- Controlar la migración de agua en el interior y el exterior del alimento, para mantener la humedad deseada.
- Ser semipermeable para mantener el equilibrio interno de gases.
- Prevenir la pérdida o ganancia de componentes que estabilizan las características nutricionales y organolépticas necesarias para la aceptación por parte del consumidor, de manera que no altere negativamente el sabor o la apariencia.
- Proporcionar una superficie bioquímica y microbiológicamente estable, protegiendo contra la contaminación, infestación, proliferación microbiana y otros tipos de deterioro.
- Mantener o mejorar el aspecto y los atributos sensoriales del producto.
- Servir como vehículo de aditivos deseables como aromas, nutrientes, vitaminas, agentes antioxidantes y microbianos, etc.
- Ser de fácil elaboración y económicamente viable.

A la hora de establecer los requerimientos de las películas y recubrimientos comestibles, hay que tener en cuenta la dualidad de su naturaleza, puesto que no son meros envases sino que también pueden ser considerados ingredientes o aditivos.

Así pues, atendiendo a su papel de envase, deben cumplir los criterios aplicables a los envases alimentarios tradicionales en lo que respecta a sus propiedades de barrera (al vapor de agua, gases, aroma, etc.), propiedades ópticas (ej.: transparencia), resistencia, cohesión, migración de componentes, resistencia a sustancias químicas y temperaturas, residuos, así como facilidad de empleo y precio competitivo (Haugaard *et al.*, 2001).

Por otro lado, debido a que forman parte integral de la porción comestible de los alimentos, los envases comestibles deberían cumplir las normativas pertinentes a los ingredientes alimentarios (Guilbert & Gontard, 1995), aditivos, alimentos, o sustancias en contacto con los alimentos (Debeaufort *et al.*, 1998).

Por último, no debe olvidarse que los envases comestibles deben estar diseñados para proteger al alimento del ambiente que lo rodea y mantener su calidad a lo largo de toda la vida útil del producto. Por ello, se debe tener en cuenta los tres factores que controlan la duración de la vida útil de un alimento y que son: las características del producto, sus propiedades y las condiciones de almacenamiento y distribución (Harte & Gray, 1987).

1.5. Composición

Las películas y recubrimientos comestibles se componen principalmente de una *base polimérica*, que proporcionan una matriz macromolecular con alta resistencia cohesiva. A esta base se le pueden adicionar diversos aditivos como: *plastificantes*, añadidos generalmente para mejorar sus propiedades elásticas, *surfactantes o emulsionantes*, para facilitar la formación del polímero, *antioxidantes o compuestos antimicrobianos*, que mejoran la efectividad del recubrimiento o película, o incluso saborizantes o pigmentos.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que todos los materiales utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles deben estar autorizados por la legislación vigente. En la Unión Europea estos materiales se regulan por la directiva 95/2/CE de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los edulcorantes. La última revisión legislativa es la Directiva 06/52/CE de 5 de julio de 2006.

1.5.1 Base polimérica

Los envases comestibles pueden agruparse en tres tipos en función de la base polimérica utilizada: *hidrocoloides*, *lípidos* y *mezclas o sistemas multi componentes*. Los hidrocoloides incluyen polisacáridos (derivados de celulosa, alginatos, pectinas y almidones entre otros) y proteínas (del lactosuero, de soja, ovoalbúmina, etc.). Los lípidos incluyen ceras, acilgliceroles y ácidos grasos y las mezclas contienen componentes lipídicos e hidrocoloidales. El tipo de componente utilizado determinará las propiedades de cada película o recubrimiento (Krochta, 2002).

1.5.1.1 Hidrocoloides

Se denominan comúnmente hidrocoloides a los biopolímeros de elevado peso molecular y que se dispersan en agua. Los polisacáridos y las proteínas son polímeros que forman redes moleculares cohesionadas por una alta interacción entre sus moléculas (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, London, Debye, de cristalización o de valencia primaria) (Sothornvit & Krochta, 2005). Su cohesión molecular les confiere buenas propiedades mecánicas, pudiendo ejercer de matriz estructural del recubrimiento (Guilbert, 1986), y buenas propiedades de barrera frente a los gases (O₂ y CO₂) (Kester & Fennema, 1986; Park *et al.*, 1993; Nisperos-Carriedo, 1994). Sin embargo, la polaridad de estos polímeros hace que sean afines al agua y que ésta se integre fácilmente en su estructura estableciendo puentes de hidrógeno con las moléculas de polímero, reemplazando las uniones entre las moléculas del propio polímero. De esta manera, el polímero pierde cohesión y aumenta la permeabilidad tanto al agua como a los gases (McHugh & Krochta, 1994a).

A. Polisacáridos

Los carbohidratos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como estabilizantes, espesantes y gelificantes. Además, debido a su capacidad de polimerización, pueden utilizarse también en la elaboración de envases comestibles (Guilbert & Biquet, 1995). En general, los carbohidratos producen películas con buenas propiedades mecánicas y son barreras eficientes contra compuestos de baja polaridad. Sin embargo, su naturaleza hidrofílica hace que presenten una baja resistencia a la pérdida de agua (Parra *et al.*, 2004). Su selectividad en cuanto a la permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono condiciona la creación de atmósferas modificadas en el

interior del alimento, lo que se traduce en un aumento de la vida útil del producto.

La formación de películas de polisacáridos implica frecuentemente la formación de un gel y/o la evaporación del solvente. Los hidratos de carbono, incluyendo almidón, derivados de la celulosa, pululano, quitosano, alginato, pectina, carragenatos, goma gelán, entre otros, han sido estudiados como materiales formadores de películas comestibles (García *et al.*, 1998, 2000; Yang & Paulson, 2000; Diab *et al.*, 2001; Lazaridou & Biliaderis, 2001; Lee *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2004; Tomás *et al.*, 2004; Tapia-Blácido *et al.*, 2005). Estos compuestos tienen las características de ser polímeros de cadena larga, solubles en agua y de producir un fuerte aumento en la viscosidad al dispersarse en ella.

B. Proteínas

Las proteínas poseen una estructura única basada en 20 monómeros (aminoácidos), lo que les confiere un amplio abanico de propiedades funcionales, especialmente un elevado potencial de unión a nivel intermolecular (Bourtoom, 2009). Las películas de base proteica pueden formar uniones en diversas posiciones y con diferentes grupos, lo que supone un elevado potencial de formación de enlaces e interacciones y, por tanto, los tipos de uniones al utilizar proteínas serían mucho más variados que en el caso de los carbohidratos.

En general, las películas a base de proteína son barreras excelentes al oxígeno, dióxido de carbono y a algunos aromas (Gennadios *et al.*, 1993c). Sin embargo, sus propiedades mecánicas no son tan buenas. Las películas

proteicas poseen mayor resistencia al vapor de agua que el resto de los hidrocoloides. A pesar de que son susceptibles a variaciones de pH, pueden proporcionar un valor nutricional añadido al producto, son buenas formadoras de films y se adhieren a superficies hidrofílicas (Baldwin *et al.*, 1995).

Las fuentes más comunes de proteínas son la leche y derivados (caseína y proteínas del lactosuero), el maíz (zeína), la soja (proteínas de soja), el huevo (ovoalbúmina), trigo (gluten) y tejidos animales (colágeno) (Baldwin *et al.*, 1995).

Un valor añadido en la utilización de proteínas en la elaboración de películas y recubrimientos para alimentos es su capacidad para actuar como antioxidantes naturales. Diversos estudios han descrito la actividad antioxidante de proteínas de origen animal y vegetal como las proteínas de la leche (Cervato *et al.*, 1999; Tong *et al.*, 2000), la zeína del maíz (Wang *et al.*, 1991) o la gliadina del trigo (Iwami *et al.*, 1987). También se ha estudiado la actividad antioxidante de péptidos generados a partir de la hidrólisis de diversas proteínas entre las que se encuentran: las proteínas de la clara de huevo (Tsuge *et al.*, 1991), las proteínas de la yema de huevo sin lecitina (Park *et al.*, 2001), la proteína de soja (Chen *et al.*, 1995), la elastina soluble (Hattori *et al.*, 1998), la caseína de la leche (Suetsuna *et al.*, 2000) y las proteínas del lactosuero (Peña-Ramos & Xiong, 2001, 2003). Finalmente, al igual que en proteínas y péptidos, se ha estudiado la actividad antioxidante de los aminoácidos individualmente. Para que un aminoácido actúe como antioxidante y evite la oxidación lipídica, debe ser oxidado preferentemente frente a los ácidos grasos poliinsaturados (Elías *et al.*, 2005). Cada aminoácido presenta una estabilidad oxidativa diferente (Stadtman, 1993), por lo que la

capacidad de los residuos aminoacídicos de interaccionar con radicales libres o productos de la oxidación lipídica determinará la capacidad antioxidante general de la proteína (Viljanen *et al.*, 2005). Sharp *et al.* (2004) estudiaron la reactividad de diferentes aminoácidos frente a la oxidación con radicales hidroxilo, observando el siguiente orden de mayor a menor capacidad de oxidación: cisteína > triptófano, tirosina > metionina > fenilalanina > histidina > isoleucina > leucina > prolina. Sin embargo, para otros autores la participación de la metionina en el sistema antioxidante no está clara (Elías *et al.*, 2005). Así pues, proteínas con elevadas cantidades de aminoácidos altamente oxidables, como la cisteína, el triptófano y la tirosina, presentan la capacidad de inhibir las reacciones de oxidación lipídica.

1) Proteínas del lactosuero

Estas proteínas se obtienen a partir del *lactosuero*, el cual es definido como “la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso” (Foegeding & Luck, 2002). La utilización y/o tratamiento del lactosuero ha sido una de las grandes preocupaciones de la industria láctea debido a que, por un lado, posee componentes valiosos que no deberían ser desperdiciados, y por otro representa un importante contaminante medioambiental (El-Salam *et al.*, 2010). El lactosuero contiene principalmente lactosa, proteínas, minerales, vitaminas y grasa. La composición y tipo de lactosuero varía considerablemente dependiendo del tipo de leche, tipo de queso elaborado y el proceso tecnológico empleado. La lactosa es el principal componente nutritivo (4,5%), seguida de las proteínas (0,8%), y los lípidos (0,5%). Si en la coagulación de la leche se utilizan enzimas, el lactosuero se denomina dulce, y si se reemplaza la enzima por ácidos orgánicos se denomina

ácido. A pesar de que las proteínas no constituyen la fracción más abundante del lactosuero, es la más interesante en los terrenos económico y nutricional (Linden & Lorient, 1996).

Comercialmente se encuentran disponibles diversos productos derivados del lactosuero de queserías como los concentrados de proteína de lactosuero (CPS) y los aislados de proteína de lactosuero (APS). Los concentrados son elaborados generalmente mediante ultrafiltración y contienen desde un 35% hasta un 80% de proteína, mientras los aislados contienen aproximadamente un 90% de proteína (Foegeding & Luck, 2002). La composición de los concentrados y aislados también difiere en los niveles de otros constituyentes. Así pues, aparte de un mayor contenido proteico, los APS presentan menores contenidos de grasa, lactosa y minerales que los CPS (Banerjee & Chen, 1995; Morr & Ha, 1993). Estas diferencias en la composición pueden influenciar en gran medida las propiedades barrera y mecánicas de las películas elaboradas a base de proteínas de lactosuero (Hong & Krochta, 2006). La grasa aumenta la hidrofobicidad de los films y mejora sus propiedades barrera frente a la humedad (Banerjee & Chen, 1995), mientras que la lactosa actúa como plastificante (Hong & Krochta, 2006).

Las proteínas del lactosuero están formadas por diferentes fracciones: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, seroalbúmina bovina y algunas inmunoglobulinas, entre otras. La β -

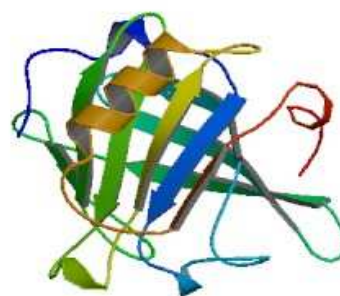


Figura 1.1. Representación tridimensional de la β -lactoglobulina (Brownlow *et al.*, 1997).

lactoglobulina (*Figura 1.1*) es el componente proteico mayoritario (50-60%) del lactosuero (Sothornvit & Krochta, 2001). Se conocen 11 variantes genéticas siendo las variantes A y B las predominantes en la leche bovina (Regalado *et al.*, 2006). La estructura primaria consiste en 162 residuos aminoacídicos con un peso molecular de 18.300 Da. La estructura secundaria y terciaria muestran un elevado grado de organización con un 43-50% de láminas β , 10-15% de hélices α y un 15-20% de giros β (Regalado *et al.*, 2006). El monómero de β -lactoglobulina contiene un grupo tiol libre, inaccesible en el interior de la estructura, y dos enlaces disulfuro. Bajo condiciones fisiológicas se encuentra predominantemente en forma dimérica. La α -lactoalbúmina es la segunda proteína más abundante del lactosuero (20%). Es una proteína globular, al igual que la β -lactoglobulina, que contiene 123 residuos aminoacídicos y cuatro enlaces disulfuro. Presenta un bajo grado de organización con 30% de hélices α , un 9% de láminas β y un 61% sin organizar (Alexandrescu *et al.*, 1993), lo que le confiere gran flexibilidad. Sin embargo, la fijación de calcio y los enlaces disulfuro mantienen su estructura globular, estabilizándola frente a la desnaturalización (Kinsella & Whitehead, 1989). Su estructura tridimensional puede dividirse en dos lóbulos: uno ácido, rico en láminas β , que contiene el dominio de unión al calcio y un lóbulo básico rico en hélices α . La seroalbúmina bovina (BSA) representa alrededor del 7% de la proteína del lactosuero. Esta proteína presenta catorce enlaces disulfuro y un enlace tiol libre, lo que la convierte en una proteína altamente estructurada (Morr & Ha, 1993).

Como ya se ha comentado, las proteínas del lactosuero en estado nativo son globulares, por lo que la mayoría de los grupos sulfhidrilo se encuentran “ocultos” en el interior de las moléculas. Por este motivo, la formación de

películas y recubrimientos a partir de estas proteínas suele implicar la desnaturalización de las mismas mediante diversos procedimientos que implican la modificación física, química o enzimática de las mismas, siendo el tratamiento térmico el mecanismo más utilizado. Estos procedimientos de desnaturalización proteica se analizarán con más detalle en un apartado posterior. Las proteínas del lactosuero son muy sensibles a las altas temperaturas y, en menor grado, al pH ácido (situación contraria a lo que sucede con las caseínas), debido a que su mecanismo de estabilización es por hidratación y no por carga eléctrica. Así pues, el calentamiento provoca una desnaturalización de las proteínas del lactosuero, particularmente de la β -lactoglobulina. Este proceso de desnaturalización incluye el reordenamiento de la estructura terciaria de manera que el grupo tiol libre de la cisteína 121, que en el estado nativo se encontraba oculto en el interior de la molécula proteica, se vuelve ahora accesible. Este grupo tiol “activado” puede reaccionar con los enlaces disulfuro, también presentes en la β -lactoglobulina o en otras proteínas del lactosuero como la α -lactoalbúmina, o puede reaccionar con otros grupos tiol, formando nuevos enlaces disulfuro (Floris *et al.*, 2008). Además de los grupos tiol, otros grupos hidrofóbicos también quedan al descubierto tras la desnaturalización (Shimada & Cheftel, 1998), por lo que también se promoverá la formación de interacciones hidrofóbicas además de los enlaces disulfuro durante la formación de las películas y envueltas (McHugh & Krochta, 1994b).

En relación a su capacidad antioxidante, aunque el mecanismo por el cual las proteínas del lactosuero inhiben la oxidación lipídica no está claro, parece que la actividad antioxidante de ciertos aminoácidos presentes en estas proteínas juega un papel crucial (Elías *et al.*, 2005). Los posibles mecanismos

incluyen por un lado, la quelación de metales de transición (catalizadores de la oxidación) por la lactoferrina y la seroalbúmina, y por otro, la neutralización de radicales libres por aminoácidos como la cisteína, el triptófano o la tirosina (Tong *et al.*, 2000). Procesos como la desnaturalización proteica o la hidrólisis parcial podrían hacer más accesibles los residuos aminoacídicos con poder antioxidante, lo que en un principio mejoraría su capacidad de neutralizar radicales libres, aunque también podría afectar a la capacidad de ciertas proteínas de quelar metales (Elías *et al.*, 2005).

Tanto la α -lactoalbúmina como la β -lactoglobulina (β -Lg) actúan como antioxidantes, aunque esta última resulta ligeramente menos efectiva a la hora de inhibir la oxidación lipídica en comparación con otros componentes proteicos del suero como la α -lactoalbúmina (α -La) (Allen & Wrieden, 1982). El efecto antioxidante de la β -Lg se atribuye a la presencia de un grupo sulfhidrilo libre (cisteína-121) parcialmente “oculto” en el núcleo proteico. Se cree que la cisteína actúa como antioxidante al ceder el hidrógeno de su grupo tiol (Taylor & Richardson, 1980). A pesar de la relativa accesibilidad de este grupo en la β -Lg, juega un papel fundamental a la hora de neutralizar radicales libres. Sin embargo, la cisteína no es el único residuo aminoacídico de las proteínas responsable del efecto antioxidante. Levine *et al.* (1996) propusieron que la metionina supone también un importante mecanismo de defensa de las proteínas frente a la oxidación. Por su parte Hernández-Ledesma *et al.* (2005) estudiaron la actividad antioxidante de diversos péptidos y aminoácidos obtenidos de la hidrólisis de la β -Lg y la α -La. En este estudio el triptófano presentó el mayor poder antioxidante seguido de la metionina y cisteína. También varios péptidos presentaron elevadas actividades antioxidantes, destacando el péptido con secuencia: Triptófano-Tirosina-Serina-Leucina-

Alanina-Alanina-Serina-Asparagina-Isoleucina, el cual presentó una actividad incluso superior a la del hidroxianisol butirato, un antioxidante sintético utilizado en alimentación. Se cree que el triptófano funciona como antioxidante al actuar como donador del hidrógeno de su grupo indólico, neutralizando así a los radicales libres (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005).

El interés por las proteínas de lactosuero nace de su habilidad para formar películas transparentes, con excelentes propiedades de barrera al oxígeno, aromas y aceites, a bajas humedades relativas (McHugh & Krochta, 1994b; Maté & Krochta, 1996; Osés *et al.*, 2009). Se ha observado que al utilizar proteína completamente desnaturalizada, la permeabilidad al vapor de agua se reduce significativamente; esto se debe a que la desnaturalización con calor permite la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, lo que disminuye los coeficientes de difusividad y solubilidad (McHugh & Krochta, 1994b). Las películas obtenidas son, en casi todos los casos, insolubles en agua, transparentes, de aroma y sabor suave, flexibles, blandas, biodegradables y con excelentes propiedades mecánicas (Cuq *et al.*, 1998; Khaoula *et al.*, 2004).

Los recubrimientos a base de proteínas de lactosuero se han utilizado con éxito para reducir la rancidez de cacahuets tostados a bajas humedades relativas (Maté & Krochta, 1996). También mejoran la consistencia y las pérdidas de peso en el pollo congelado (Alcántara & Krochta, 1996). En el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), envueltas de suero con antioxidante retrasan la oxidación lipídica y reducen los valores de productos primarios de oxidación (peróxidos) durante el almacenamiento en congelación (Stuchell & Krochta, 1995). También en salmón rosado (*Oncorhynchus*

gorbuscha), envueltas elaboradas con proteínas de suero retrasan la oxidación lipídica tras tres meses de almacenamiento en congelación (Ambardekar, 2007).

2) Proteína de soja

El contenido proteico de los granos de soja (38-44%) es mucho mayor que el contenido en proteína de los granos de cereales (8-15%) (Bourtoom, 2008). Comercialmente se encuentran disponibles numerosos productos derivados de la soja como la harina de soja, los concentrados de soja y los aislados de soja. La harina de soja contiene aproximadamente un 56% de proteína y un 34% de carbohidratos. Los concentrados proteicos de soja, elaborados mediante la elución de compuestos solubles a partir de la harina, contienen más del 65% de proteína y un 18% de carbohidratos. Los aislados proteicos de soja son un preparado altamente refinado que contiene más del 90% de proteínas, normalmente obtenidos mediante precipitación a pH 4,5 (Swain *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de las proteínas de los granos de soja pueden clasificarse como globulinas, existe un sistema de clasificación ampliamente utilizado basado en las velocidades relativas de sedimentación. Así pues se clasifican en las siguientes fracciones: 2S, 7S, 11S y 15S. La fracción 7S (conglucina) (*Figura 1.2*) y la 11S (glicinina) son las mayoritarias, suponiendo hasta un 37% y un

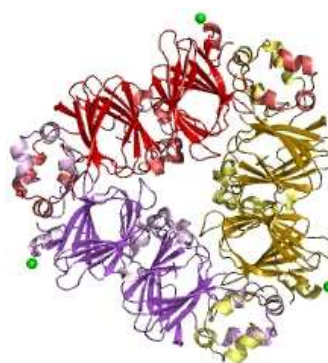


Figura 1.2. Representación tridimensional de la conglucina (Maruyana *et al.*, 2004).

31%, respectivamente, de la proteína total (Gennadios *et al.*, 1994). Las proteínas de la soja son ricas en residuos de asparragina y glutamina.

Los enlaces disulfuro intermoleculares, las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno son, en orden de importancia, las principales fuerzas asociativas involucradas en la formación de películas de proteínas de soja (Gennadios *et al.*, 1993b). Las fuertes cargas e interacciones polares existentes entre las cadenas de las moléculas proteicas de la soja restringen la rotación y la movilidad molecular, incrementando la rigidez y la fuerza tensil, dando lugar a películas quebradizas, por lo que la adición de plastificantes es necesaria para su elaboración. Como plastificante, el glicerol reduce la interacción entre las moléculas proteicas incrementando la flexibilidad, extensibilidad y la capacidad de procesamiento de las películas de proteínas de soja (Zhang *et al.*, 2001).

La fuerza iónica o el pH pueden ser manipulados para reducir las repulsiones electrostáticas entre cadenas proteicas, permitiendo así el acercamiento entre dichas cadenas y, por lo tanto, favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares (Arvanitoyannis *et al.*, 1998). En este sentido, Gennadios *et al.* (1993a) lograron la formación de películas de proteína de soja, homogéneas e independientes, dentro de intervalos de pH de 1 a 3 y de 6 a 12. Por el contrario, no hubo formación de películas entre valores de pH de 4 y 5, ya que en esta región la proteína de soja presenta su punto isoeléctrico (4,5), definido como el pH en el cual las proteínas presentan el mismo número de cargas positivas que negativas, y cuya carga neta es cero. Además, a valores de pH por encima del punto isoeléctrico, observaron menores permeabilidades al vapor de agua.

Diversos productos obtenidos a partir de la soja como los granos de soja, harina de soja sin grasa, y concentrados y aislados proteicos de soja, se ha demostrado que poseen una actividad antioxidante importante, debido principalmente a los compuestos polifenólicos presentes en su composición. Los principales antioxidantes polifenólicos de la soja son las isoflavonas, los isómeros del ácido clorogénico y el ácido ferúlico, entre otros (Pratt & Birat, 1979; Akitha Devi *et al.*, 2009).

Los envases comestibles elaborados con soja pueden obtenerse de dos formas: produciéndose en la superficie por el calentamiento de “leche” de soja, o elaborándose a partir de disoluciones de concentrado o aislado proteico de soja (Gennadios & Weller, 1991). En la elaboración, en ambos casos, debe calentarse la solución para modificar la estructura de las proteínas, rompiendo los enlaces disulfuro iniciales y exponiendo los grupos sulfhidrilo y otros grupos hidrofóbicos. A continuación, durante el secado de la envuelta se formarán nuevos enlaces disulfuro, hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno, que determinarán la estructura de la envuelta proteica creada (Gennadios *et al.*, 1994; Subirade *et al.*, 1998).

La utilización de las proteínas de soja en la formación de películas y recubrimientos para alimentos ha sido estudiada por diversos autores (Baker *et al.*, 1994; Gennadios *et al.*, 1994; Stuchell & Krochta, 1994; Kunte *et al.*, 1997; Rhim *et al.*, 2000, 2002). Las proteínas de la soja han sido estudiadas por su excelente capacidad para formar películas, su bajo coste, y sus buenas propiedades barrera al oxígeno y a los lípidos, especialmente en condiciones de bajas humedad relativa (Cho & Rhee, 2002; Rhim *et al.*, 2006). Sin embargo, los films de soja presentan pobres propiedades barrera frente a la

humedad, debido a su carácter hidrofílico y a la elevada cantidad de plastificante requerida en su elaboración (Gennadios *et al.*, 1994).

Recubrimientos elaborados con aislado proteico de soja han sido eficaces a la hora de reducir la oxidación y limitar la pérdida de humedad superficial en hamburguesas de ternera precocinadas, durante tres días de almacenamiento en refrigeración (Wu *et al.*, 2000). También la adición de proteínas de soja mejora las propiedades de una envuelta elaborada con derivados de la celulosa (Natural Seal[®]), al reducir su permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, prolongando así la vida útil de manzanas y patatas cortadas hasta una semana almacenadas en refrigeración (Baldwin *et al.*, 1996). Además, la utilización de envueltas de aislado proteico de soja reduce la absorción de grasa durante la fritura de discos de masa de rosquillas (Rayner *et al.*, 2000).

3) Ovoalbúmina

La ovoalbúmina (*Figura 1.3*) es una fosfoglicoproteína monomérica constituida por 385 residuos aminoacídicos (la mitad hidrofóbicos), con un peso molecular aproximado de unos 44,5 kDa, un punto isoelectrico (pI) de 4,5 y una temperatura de desnaturalización de 84 °C (Nisbet *et al.*, 1981). Constituye la proteína mayoritaria de la clara de huevo o albumen, el cual se considera un sistema proteico complejo constituido por fibras de

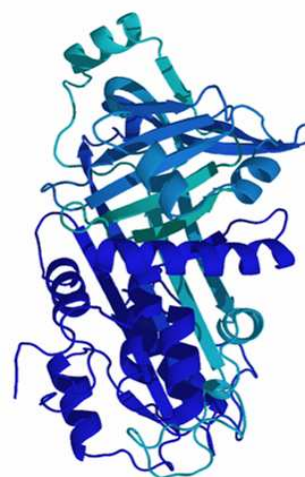


Figura 1.3. Representación 3D de la ovoalbúmina (Stein *et al.*, 1991).

ovomucina en una solución acuosa de proteínas globulares (Powrie & Nakai, 1986).

La fracción proteica del albumen está constituida por diversas proteínas globulares: ovoalbúmina (A₁, A₂ y A₃), ovotransferrina, ovomucoide, ovomucina, lisozima, ovoglobulina (G₂ y G₃) y avidina. Las proteínas mayoritarias son la ovoalbúmina, la ovotransferrina y la ovomucoide, constituyendo el 54%, 12% y 11% del peso proteico final, respectivamente.

Los enlaces disulfuro se consideran de gran importancia en la formación de películas de proteínas que contienen los aminoácidos cisteína o cistina (Okamoto, 1978; Gennadios *et al.*, 1994; Krochta & McHugh, 1996). Las proteínas de la clara de huevo presentan un contenido importante de cisteína (2,17 g/100 g peso seco) (Handa *et al.*, 1999). Sin embargo la ovoalbúmina supone la única fracción que contiene grupos sulfhidrilos libres (SH), en concreto tres, y un solo enlace disulfuro (S-S). Otras proteínas presentes en la clara, como la ovotransferrina, la ovomucoide y la lisozima contienen varios enlaces disulfuro (S-S) (15, 9 y 4 respectivamente) (Mine, 1995).

El uso de proteínas de huevo en la elaboración de películas y recubrimientos presenta un interés nutricional, debido a sus propiedades antioxidantes (Negbenebor & Chen, 1985). Estos autores observaron que añadiendo clara de huevo a carne de ave picada se reduce su oxidación durante el almacenamiento y cocinado. Como se ha comentado anteriormente, las proteínas del huevo pueden suponer una fuente natural de péptidos antioxidantes. Éstos se han encontrado en las proteínas de la yema de huevo sin lecitina (Park *et al.*, 2001) y en las proteínas de la clara de huevo (Tsuge *et*

al., 1991; Dávalos *et al.*, 2004). Concretamente cuatro péptidos (Tir-Ala-Glu-Glu-Arg-Tir-Pro-Ile-Leu, Ser-Ala-Leu-Ala-Met, Tir-Gln-Ile-Gli-Leu y Tir-Arg-Gli-Gli-Leu-Glu-Pro-Ile-Asn-Fe), incluidos en la secuencia de la ovoalbúmina, poseen una elevada actividad como captadores de radicales libres y actividad inhibidora de la enzima conversora de angiotensina I (Dávalos *et al.*, 2004). Además de las secuencias: Ala-His, Val-His-His y Val-His-His-Ala-Asn-Glu-Asn anteriormente descritas por Tsuge *et al.* (1991), las cuales se caracterizaron por tener residuos de histidina en la segunda posición de la secuencia.

La mayoría de los métodos utilizados para la elaboración de envueltas con proteínas de huevo implican la desnaturalización de una solución acuosa proteica seguida de un proceso de evaporación (casting) (Gennadios *et al.*, 1996a; Handa *et al.*, 1999). Para la obtención de películas homogéneas es necesario que las disoluciones de proteína de huevo se encuentren en un rango de pH de entre 10 y 12 (Okamoto, 1978; Gennadios *et al.*, 1996a; Handa *et al.*, 1999). Valores por encima de 12 deben evitarse debido a que la solución se volvería demasiado viscosa o podría coagular durante el tratamiento térmico de manera que la evaporación posterior se vería entorpecida. En el otro extremo, a pesar de que pueden obtenerse películas a valores de pH de 3, la superficie de éstas es rugosa y granulada debido a la insolubilización proteica (Lim *et al.*, 2002). En general, en el mecanismo de formación de las películas intervienen enlaces disulfuro (S-S) intra e intermoleculares. A pH alcalino, los enlaces disulfuro existentes en las moléculas proteicas son reducidos a grupos sulfhidrilo (SH), facilitando de este modo la dispersión de la proteína en el medio acuoso. El tratamiento térmico posterior despliega las cadenas proteicas, exponiendo más SH y grupos hidrofóbicos. Durante el secado, estos grupos

darán lugar a enlaces disulfuro covalentes intra e intermoleculares a través de la oxidación y las reacciones de intercambio disulfuro-sulfhidrilo (Mine, 1992; Gennadios *et al.*, 1996a). Estas interacciones desembocarán en la formación de redes tridimensionales. Además de los enlaces S-S, los enlaces de hidrógeno formados, así como, las interacciones hidrofóbicas y electroestáticas, serán importantes a la hora de determinar las propiedades físicas de este tipo de películas.

Las películas de ovoalbúmina presentan propiedades semejantes a las elaboradas con otro tipo de proteínas, aunque difieren en el color siendo más transparentes que las elaboradas con proteínas de trigo, soja o maíz (Gennadios *et al.*, 1996a). Las propiedades mecánicas y de barrera de estas películas pueden modificarse variando el tipo y cantidad de plastificante añadido. Por un lado, al aumentar la cantidad de plastificante se incrementa la elongación y disminuye la fuerza tensil. Por otro lado, a igual contenido de plastificante (50%), los films de ovoalbúmina con sorbitol presentan menor permeabilidad al vapor de agua, mientras que los plastificados con glicerol muestran una menor fuerza tensil y elongación en comparación con los de sorbitol (Gennadios *et al.*, 1996a).

Diversos recubrimientos elaborados con proteínas de la clara de huevo son capaces de retrasar la pérdida de humedad de pasas en mezclas de cereales de desayuno (Bolin, 1976), y reducir la pérdida de humedad en huevos, a la vez que aumentan la resistencia de la cáscara (Wong *et al.*, 1996). Así mismo, envueltas preparadas con proteínas de clara de huevo, proteínas lácteas y almidón, han reducido la pérdida de jugos tras el cocinado de productos

cárnicos (Reutimann *et al.*, 1996) y minimizado la transferencia de humedad entre componentes de una pizza (Berberat & Wissgott, 1993).

1.5.1.2 Lípidos y resinas

La naturaleza hidrofóbica de los compuestos lipídicos explica las excelentes propiedades como barrera frente a la humedad de las películas y recubrimientos de grasas y derivados. Sin embargo, su falta de estabilidad e integridad estructural hace que presenten malas propiedades mecánicas, formando recubrimientos quebradizos (Gontard *et al.*, 1995). En consecuencia, los lípidos deben asociarse con otras sustancias formadoras de polímeros, como proteínas o derivados de la celulosa (Debeaufort *et al.*, 1993). La permeabilidad al vapor de agua disminuye cuando la concentración de fase hidrofóbica aumenta en la composición de la envuelta (Bourtoom, 2008). Por regla general, se observa el siguiente orden de eficacia en sentido decreciente como barrera frente a la humedad: ceras > grasas sólidas > lecitina, acetilglícidos > aceites líquidos (Guilbert & Biquet, 1995).

Los lípidos más utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles son ceras (cera de abeja, candelilla, carnauba y parafina), ácidos grasos y diversos aceites vegetales (de cacahuete, maíz y soja), siendo los más efectivos la parafina y la cera de abeja (Bourtoom, 2008).

Como ya se ha comentado con anterioridad, la aplicación de lípidos como recubrimientos comestibles se ha practicado desde hace siglos. En la actualidad, los lípidos, solos o en emulsión con otros compuestos, se utilizan como recubrimientos comestibles para carnes, pescado, frutas, vegetales, semillas, caramelos, alimentos frescos, curados, congelados o procesados

(Rhim & Shellhammer, 2005). Posiblemente su aplicación más importante sea en frutas y vegetales, en cuyo caso los recubrimientos lipídicos previenen la pérdida de peso (debido a que evitan la pérdida de agua), ralentizan la respiración aeróbica, evitan la abrasión durante el transporte y mejoran su apariencia aportando brillo a su superficie. Al mismo tiempo, si el recubrimiento es muy grueso, su efecto sobre la transmisión de oxígeno y de dióxido de carbono puede dar lugar a procesos fisiológicos no deseados como la respiración anaeróbica, lo que producirá una disminución en la calidad del producto. En el caso de productos hortícolas con bajos procesos respiratorios, como las raíces, esta problemática es mínima y pueden emplearse recubrimientos de mayor grosor (Pavlath & Orts, 2009).

1.5.1.3 Mezclas o sistemas multicomponentes

El objetivo de emplear mezclas de biopolímeros para la elaboración de películas comestibles y recubrimientos biodegradables es contrarrestar las deficiencias propias de cada componente, y así poder mejorar las propiedades y características del material resultante (Tharanathan, 2003).

Estos recubrimientos compuestos se formulan generalmente a partir de una matriz estructural hidrocoloidal, que aporta la consistencia estructural y la barrera a los gases, y una cantidad de componente lipídico que aporta la resistencia al vapor de agua (Guilbert, 1986). Otras combinaciones también son posibles, como proteínas y polisacáridos o polímeros sintéticos y naturales, entre otros (Bourtoom, 2008).

Los recubrimientos compuestos pueden ser: *recubrimientos emulsionados*, cuando el lípido está emulsionado en la matriz del hidrocoloide

o *recubrimientos bicapa*, en los que el lípido está separado de la matriz, cada uno formando una capa (Pérez-Gago & Krochta, 2005) (*Figura 1.4*).

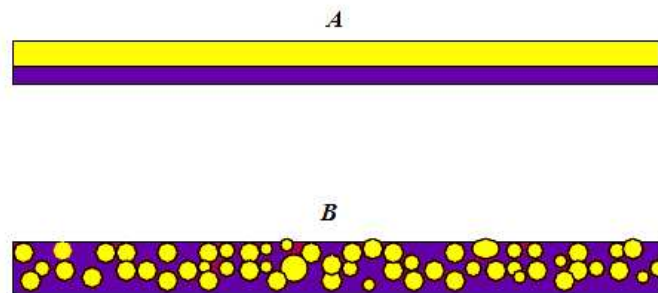


Figura 1.4. Representación de las posibles estructuras de los recubrimientos compuestos o mezclas. A) recubrimiento bicapa, B) recubrimiento emulsionado.

A pesar de que en un principio las películas bicapa suponen una barrera más eficaz frente al vapor de agua (Kamper & Fennema, 1984; Guilbert & Biquet, 1995), su preparación requiere de varios pasos: dos aplicaciones y dos etapas de secado; siendo ésta la razón por la cual la industria alimentaria se inclina por el uso de formulaciones emulsificadas. En este caso el recubrimiento se aplica directamente sobre el alimento y sólo se requiere una etapa de secado. Cabe también señalar que tanto la técnica de elaboración de la formulación como la técnica de aplicación afectan a la estructura y propiedades finales de recubrimiento.

Kamper & Fennema (1984) fueron los primeros en utilizar emulsiones de metilcelulosa y ácidos grasos para mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas de celulosa. A partir de entonces, numerosos autores han estudiado el desarrollo de películas multicomponentes basándose en el trabajo de estos autores. Algunos ejemplos de películas

multicomponentes estudiadas en la que se utilizaron matrices proteicas son: películas de aislado proteico de lactosuero y lípidos (McHugh & Krochta, 1994a), caseínas y lípidos (Avena-Bustillos, 1993), gelatina y almidón soluble (Arvanitoyannis *et al.*, 1997), aislado proteico de soja y alginato o ácido poliláctico (Rhim *et al.*, 1999b, 2007).

1.5.2 Plastificantes

Además del componente de naturaleza polimérica y de alto peso molecular (matriz), otro componente importante de los envases comestibles son los plastificantes.

Un plastificante puede definirse como una sustancia estable, de baja volatilidad y elevado punto de ebullición, la cual, cuando se adiciona a un material polimérico, modifica las propiedades físicas y/o mecánicas del mismo. Este tipo de sustancias modifica la organización tridimensional, disminuye las fuerzas de atracción intermoleculares e incrementa la movilidad de las cadenas (Banker, 1966; McHugh & Krochta, 1994b). Así mismo, los plastificantes deben ser compatibles con el polímero, permanentes en el sistema y eficientes a la hora de conseguir las propiedades deseadas en la envuelta (Sothornvit & Krochta, 2005).

La mayoría de las películas y envueltas elaboradas con proteínas son quebradizas cuando no se les añade un plastificante (Gennadios *et al.*, 1994). Así pues, la incorporación de plastificantes tiene como objetivo mejorar la flexibilidad y consistencia de las envueltas, haciéndolas menos quebradizas para evitar su rotura durante la manipulación y el almacenamiento (Torres, 1994; Sothornvit & Krochta, 2000). La rigidez de los recubrimientos se debe a

las fuerzas de cohesión que estabilizan la matriz polimérica de polisacárido o proteína. Los plastificantes debilitan estas fuerzas de cohesión al introducirse entre las cadenas poliméricas, incrementando la movilidad de las mismas y mejorando la flexibilidad y elasticidad de la matriz polimérica (Banker, 1966). Se cree que los grupos polares (-OH), a lo largo de las cadenas del plastificante, desarrollan puentes de hidrógeno entre el polímero y el plastificante, reemplazando así las interacciones polímero-polímero (Gennadios *et al.*, 1993a). El tamaño molecular, la configuración y el número total de los grupos hidroxilo funcionales del plastificante, así como su compatibilidad con el polímero, pueden afectar las interacciones entre el plastificante y el polímero (Yang & Paulson, 2000), modificando su capacidad para interferir en las uniones entre las cadenas proteicas y su capacidad para atraer agua. Por otro lado, la reducción de la cohesión del polímero se traduce en un incremento de la permeabilidad al vapor de agua, gases y a compuestos aromáticos, por parte de la envuelta (Krochta, 2002).

Así pues y de manera general, como resultado de los cambios en la organización molecular, la adición de plastificantes modifica las propiedades funcionales de las envueltas, incrementando la extensibilidad, distensibilidad y flexibilidad y disminuyendo la cohesión, elasticidad, resistencia mecánica y rigidez (Lieberman & Gilbert, 1973, McHugh & Krochta, 1994b, Park *et al.*, 1994). También cabe mencionar que su adición resulta en un descenso de la temperatura de transición vítrea (Tg: temperatura por debajo de la cual un polímero se vuelve rígido y quebradizo) de los materiales amorfos a menudo necesario para elaborar envueltas mediante el método de termoformación (Cuq *et al.*, 1998; Diab *et al.*, 2001; Lazaridou & Biliaderis, 2002). En películas a base de gelatina y almidón, Arvanitoyannis *et al.* (1997) señalan que la

disminución de la Tg con la presencia de plastificantes se debe a que el agua y los polioles establecen puentes de hidrógeno con el almidón, lo que lleva a disminuir las interacciones intra e intermoleculares entre las cadenas del polisacárido y, por ende, las energías de interacción.

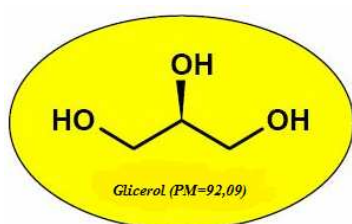


Figura 1.5. Representación de la estructura del glicerol.

Los plastificantes más utilizados en la elaboración de envueltas comestibles, aparte del agua, que puede ser considerada como el plastificante natural, son: los *polioles*; como el glicerol (Figura 1.5), el polietilenglicol, el propilenglicol, etc. y los *mono*, *di* y *oligosacáridos*, como el sorbitol, (Figura 1.6) la sacarosa y la glucosa (Cuq *et al.*, 1998).

Todos ellos son de naturaleza hidrofílica y reducen significativamente la propiedad de barrera al vapor de agua del recubrimiento. Para preservar esta propiedad pueden utilizarse otros plastificantes de naturaleza hidrofóbica, como los ácidos grasos y los aceites que, sin embargo, aumentan la permeabilidad al oxígeno del recubrimiento. Por tanto, en función de las características requeridas del recubrimiento, se pueden utilizar un tipo u otro de plastificante o una combinación de ambos (Sothornvit & Krochta, 2005).

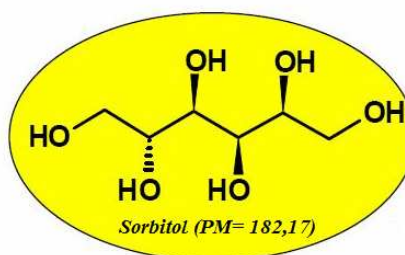


Figura 1.6. Representación de la estructura del sorbitol.

La selección de un plastificante requiere la consideración de tres criterios básicos, aparte del coste (Sothornvit & Krochta, 2005):

- a) La *compatibilidad*: depende de la polaridad, forma y tamaño del plastificante. Las mejores compatibilidades se observan cuando el plastificante y el polímero tienen una estructura química similar.
- b) La *eficiencia*: generalmente, los buenos plastificantes proporcionan una elevada plastificación a bajas concentraciones y presentan una elevada difusión e interacción con el polímero.
- c) La *permanencia*: depende del tamaño de la molécula y del coeficiente de difusión en el polímero.

En la elaboración de películas independientes basadas en proteínas (no así en recubrimientos), el efecto del tipo y proporción del plastificante empleado ha sido ampliamente estudiado, tanto con proteínas de lactosuero (McHugh & Krochta, 1994b; Sothornvit & Krochta, 2000, 2001; Dangaran & Krochta, 2007; Osés *et al.*, 2008), como con proteínas de soja (Zang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Kokoszka *et al.*, 2010), o con ovoalbúmina (Gennadios *et al.*, 1996a).

En relación a la *cantidad de plastificante adicionado*, se ha observado que, al incrementar la concentración de plastificante, se produce un descenso en la fuerza tensil y un aumento de los valores de elongación en películas de aislado proteico de lactosuero plastificadas con sorbitol y glicerol (McHugh & Krochta, 1994b), películas de albúmina de huevo plastificadas con glicerol, sorbitol o polietilenglicol (Gennadios *et al.*, 1996a), películas elaboradas con aislado proteico de soja con glicerol, sorbitol o ambos (Kim *et al.*, 2003), y en

films preparados con gelatina y almidón soluble con adición de polioles (Arvanitoyannis *et al.*, 1997). Paralelamente, el incremento de la concentración de plastificante (glicerol o sorbitol) en películas de aislado proteico de lactosuero disminuye sus propiedades barrera al oxígeno (Osés *et al.*, 2008). Mediante el desarrollo de modelos matemáticos, se ha concluido que plastificantes como el glicerol o el sorbitol presentan una dependencia exponencial negativa entre la concentración de plastificante tanto con el módulo elástico y la fuerza tensil como con la permeabilidad al oxígeno, y una dependencia lineal entre la cantidad de plastificante y la elongación de las películas (Sothorvit & Krochta, 2000, 2001).

Respecto al *tipo de plastificante utilizado*, el idóneo debería mejorar la flexibilidad de las películas o recubrimientos ejerciendo el menor impacto posible sobre la permeabilidad al oxígeno. Sothornvit & Krochta (2000) establecieron ratios de eficiencia de los plastificantes entre las propiedades mecánicas y la permeabilidad al oxígeno. Para estos autores, la sacarosa, el sorbitol y el glicerol presentarían los ratios más favorables en ese orden. Películas elaboradas a partir de β -lactoglobulina (principal proteína del lactosuero) en las que se utilizó sorbitol como plastificante presentan una menor permeabilidad al oxígeno y un mayor módulo elástico y fuerza tensil, comparadas con aquellas preparadas con glicerol a igual cantidad de plastificante añadido (Sothorvit & Krochta, 2000, 2001). También los films de ovoalbúmina con glicerol muestran una menor fuerza tensil y elongación en comparación con los de sorbitol, mientras que los plastificados con sorbitol presentan menor permeabilidad al vapor de agua, a igual contenido de plastificante (Gennadios *et al.*, 1996a). También la utilización de sorbitol da lugar a films con menores permeabilidades al vapor de agua en comparación

con el glicerol en películas de proteína de lactosuero (McHugh & Krochta, 1994b) y en películas con aislado proteico de soja plastificadas con glicerol, sorbitol o una mezcla de ambas (Kim *et al.*, 2003). El sorbitol también presenta una menor permeabilidad al oxígeno que el glicerol en películas elaboradas con aislado proteico de lactosuero (McHugh & Krochta, 1994b; Osés *et al.*, 2008) y caseínas (Chick & Ustunol, 1998).

Así pues, el sorbitol parece ser un plastificante más efectivo que el glicerol a la hora de mejorar las propiedades mecánicas y de barrera frente al vapor de agua y al oxígeno en las películas elaboradas con proteínas. Sin embargo, la cristalización del sorbitol con el tiempo endurece las películas volviéndolas menos flexibles, lo que puede limitar su aplicación (Osés *et al.*, 2008).

1.6. Elaboración de películas y/o recubrimientos comestibles

1.6.1 Mecanismos de formación

En la formulación de películas y recubrimientos se necesita al menos un componente capaz de formar una matriz estructural de suficiente cohesividad, al establecer numerosas interacciones moleculares bajo la acción de un tratamiento químico o físico (Debeaufort *et al.*, 1998).

Los biopolímeros proteicos pueden definirse como redes macromoleculares

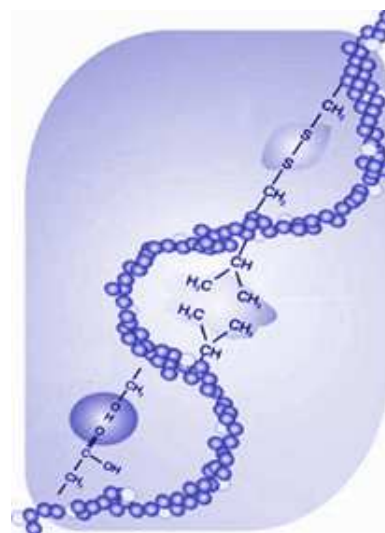


Figura 1.7. Fuerzas estabilizadoras de redes proteicas (adaptada de Verbeek & Van den Berg 2010).

tridimensionales, estabilizadas y reforzadas mediante enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro (*Figura 1.7*) (Verbeek & Van den Berg, 2010).

La probabilidad de formar enlaces inter- e intramoleculares depende de la conformación proteica y de las condiciones de fabricación. Las proteínas de elevado peso molecular y las fibrosas (ej.: colágeno, glutenina) presentan de manera general propiedades interesantes como formadoras de envueltas, mostrando buenas propiedades mecánicas (Guilbert & Graille, 1994). Las proteínas globulares o pseudoglobulares (ej.: gliadina) generalmente requieren ser desnaturalizadas antes de que una nueva red pueda formarse y estabilizarse (Cuq *et al.*, 1998).

La formación de una red macromolecular proteica requiere tres etapas: 1) la ruptura de enlaces intermoleculares de baja energía que estabilizan a los polímeros en su estado nativo, 2) reordenamiento y orientación de las cadenas poliméricas, y 3) la formación de una estructura tridimensional estabilizada por nuevas interacciones y enlaces después de la remoción del solvente (Cuq *et al.*, 1998).

Se han desarrollado dos procesos para producir materiales a partir de proteínas: el proceso húmedo, también conocido como *casting*, y el proceso seco o termoplástico.

El proceso húmedo implica la dispersión y solubilización de la proteína en grandes cantidades de solvente, seguido de la eliminación del mismo. Debido a la importancia de la adecuada solubilización de las proteínas en el soluto, es interesante conocer el grado de solubilidad de las mismas y los tipos

de interacciones que necesitan romperse para su solubilización en un determinado solvente. Además, las características y propiedades fisicoquímicas de las proteínas varían en función del pH del sistema. Esta sensibilidad de las proteínas a la variación de pH se suele asociar con un elevado contenido de aminoácidos polares ionizados, como en el caso de las proteínas de soja que contienen un 25,4%, lo que limita la formación de películas a pH ácidos (Cuq *et al.*, 1998).

La formación del envase se basa en la separación de las proteínas de la fase solvente por precipitación o cambios de fase debidos a cambios en las condiciones del solvente (variaciones de polaridad o pH, adición de electrolitos), tratamientos térmicos (calentamiento), o eliminación del solvente (secado).

Así pues la formación del envase involucraría uno de los siguientes procesos (Guilbert & Biquet, 1995; Guilbert *et al.*, 1996; Debeaufort *et al.*, 1998):

a) Una *coacervación simple*, en la que se forma la película a partir de un cambio de fase o precipitación de un hidrocoloide en disolución acuosa mediante la modificación de alguna propiedad del disolvente (pH, carga eléctrica, etc.), o por adición de otro disolvente en el cual el polímero es insoluble.

b) Una *coacervación compleja*, en la que dos soluciones de hidrocoloides con cargas opuestas se combinan, provocando la interacción y la precipitación de la mezcla de polímeros (ej.: combinación de proteínas y quitosano).

c) La *coagulación térmica o gelificación*, mediante la cual el calentamiento de la macromolécula implica su desnaturalización seguida de gelificación o precipitación, o incluso el enfriamiento de una dispersión de hidrocoloide que provoca una transición gel-sol, por ejemplo la gelatina o el agar.

d) La *eliminación del disolvente*, en el que la formación de una película sólida se lleva a cabo gracias a la evaporación del solvente en el que se aplica. Esto produce un aumento de la concentración del polímero, lo que favorece la formación de enlaces y en consecuencia de la red tridimensional.

Los solventes utilizados para preparar las soluciones proteicas formadoras de envueltas son generalmente agua y etanol y, ocasionalmente, acetona (Cuq *et al.*, 1998). Hay que tener en cuenta que, a la hora de elaborar recubrimientos comestibles, se deben utilizar solventes aptos para el consumo humano.

El proceso seco o termoplástico implica la mezcla de las proteínas y los aditivos apropiados, en condiciones de baja humedad, seguido de un moldeado termomecánico mediante distintas técnicas (moldeado por compresión, extrusión o moldeado por inyección).

El proceso termoplástico es raramente utilizado en la elaboración de envases comestibles, debido a que la mayoría de los componentes comestibles no pueden ser moldeados a temperaturas elevadas sin que se produzcan cambios estructurales irreversibles en el material. La hidroximetilcelulosa y el ácido poliláctico, dos termoplásticos biodegradables, son dos de las excepciones (Pavlath & Orts, 2009).

1.6.2 Modificación proteica y entrecruzamiento

Existen varios métodos para mejorar las propiedades funcionales de las películas y recubrimientos elaborados con proteínas. Generalmente, estos métodos implican la modificación estructural de las proteínas y/o las interacciones entre las moléculas proteicas. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo mediante *tratamientos físicos*: calentamiento (Pérez-Gago *et al.*, 1999), radiación ultravioleta (Rhim *et al.*, 1999a), ultrasonificación (Banerjee *et al.*, 1996); *tratamientos químicos*: agentes productores de entrecruzamientos o “cross-linking”, como el formaldehído, glutaraldehído, ácido láctico, etc. (Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Marquie *et al.*, 1995; Gennadios *et al.*, 1998; Rhim *et al.*, 1999b; Were *et al.*, 1999), o *tratamientos enzimáticos* como la transglutaminasa (Stuchell & Krochta, 1994; Lim *et al.*, 1998; Yildirim & Hettiarachchy, 1998). La modificación proteica también puede producirse por cambios del pH de la solución formadora de las películas (Gontard *et al.*, 1992; Brandenburg *et al.*, 1993) o de las condiciones de secado de las mismas (Gennadios *et al.*, 1996b; Ali *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1997; Alcántara *et al.*, 1998; Jangchud & Chinnan, 1999). A continuación se describen los métodos que se van a utilizar en esta investigación.

A. Calentamiento

El tratamiento térmico de las soluciones formadoras de películas provoca la desnaturalización proteica debido a la rotura de enlaces disulfuro intramoleculares, lo que supone una oportunidad para la formación de nuevos enlaces disulfuro intra e intermoleculares entre las cadenas proteicas, mejorando la consistencia de la red formada (Krotcha, 2002). Así pues, la desnaturalización térmica mejora las propiedades de barrera y tensiles de las

películas (Pérez-Gago *et al.*, 1999). Los mayores efectos de los cambios estructurales en las proteínas y su interacción ocurren en las propiedades mecánicas y en la solubilidad de las películas obtenidas (McHugh *et al.*, 1994; Stuchell & Krochta, 1994; Handa *et al.*, 1999; Pérez-Gago *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 1999; Krotcha, 2002). En general, se incrementa la tracción y reduce la elongación, la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua (Gennadios, 2004). Cabe destacar que la elaboración de la mayoría de películas y recubrimientos proteicos incluye un tratamiento térmico de las soluciones.

Como ya se comentó anteriormente, debido a la naturaleza globular de las proteínas del lactosuero, la mayoría de grupos hidrofóbicos y grupos SH se encuentran ocultos en el interior de las moléculas. Así pues, la formación de las redes tridimensionales que dan lugar a las películas y recubrimientos implica generalmente un tratamiento térmico que modifica la estructura tridimensional proteica. El aumento de temperatura expone los grupos SH, favoreciendo la polimerización a temperaturas superiores a 60-65 °C (Galani & Apenten, 1999). Sin embargo, la polimerización no es la única reacción química implicada en la formación de las películas de lactosuero. La agregación no covalente ocurre también a través de nuevas interacciones hidrofóbicas, iónicas y de Van der Waals formadas entre nuevos grupos expuestos debido a la desnaturalización térmica. Estas interacciones aumentan a medida que el pH se acerca al punto isoeléctrico de las proteínas del lactosuero (Kinsella & Whitehead, 1989).

Pérez-Gago *et al.* (1999) compararon la solubilidad, permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas de películas elaboradas con proteínas de suero desnaturalizadas por calor y sin desnaturalizar (estado

nativo). Las películas elaboradas con proteína en estado nativo eran totalmente solubles en agua, mientras que las desnaturalizadas eran insolubles. Estas últimas presentaban también mayores valores de tracción del módulo elástico y de elongación. Sin embargo, tanto las nativas como las desnaturalizadas presentaban similares permeabilidades al vapor de agua. Estos resultados sugieren que el entrecruzamiento covalente facilitado por el tratamiento térmico es el responsable del aumento de la insolubilidad y de la mejora de las propiedades mecánicas de las películas de lactosuero.

El tratamiento térmico es también importante en la formación de la matriz de películas y recubrimientos de proteína de soja, puesto que la agregación proteica es facilitada a través de la formación de enlaces disulfuro que ayudan a la cohesión de la matriz (Renkema & Vliet, 2002). En las proteínas de clara de huevo, la combinación de pH y tratamiento térmico despliega las cadenas proteicas, exponiendo también grupos SH e hidrofóbicos (Gennadios *et al.*, 1996a); durante el secado los enlaces disulfuro, además de otras interacciones, serán los que determinen las propiedades de los envases comestibles obtenidos con ellas.

B. Modificación enzimática

La utilización de enzimas que promueven el entrecruzamiento o “cross-linking” entre proteínas para mejorar las propiedades de los envases comestibles es factible (Gennadios *et al.*, 2004). Dentro las enzimas con capacidad “cross-linking” encontramos las transglutaminasas, lipooxigenasas, lisil oxidasas, polifenol oxidasas y peroxidasas, siendo las primeras las más utilizadas.

Las transglutaminasas (TG) son una familia de proteínas presentes en la mayoría de los tejidos y fluidos extracelulares de los vertebrados, e involucradas en numerosos procesos biológicos. Se han encontrado en mamíferos, pescados, plantas y microorganismos (Kuraishi *et al.*, 2001).

Las TG son proteínas- γ -glutaminiltransferasas (EC 2.3.2.13) (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992) que catalizan la reacción de transferencia de grupos acil entre el grupo γ - carboxiamida de un péptido ligado a un residuo de glutamina (donador de acilos) y una gran variedad de aminas primarias (aceptor de acilos), incluyendo el grupo amino de la lisina (*Figura 1.8a*).

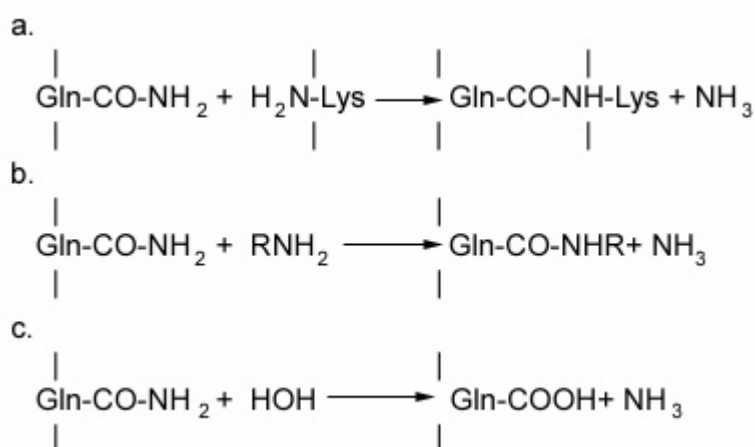


Figura 1.8. Reacciones generales catalizadas por transglutaminasa: a) reacción de transferencia de grupos acil; b) reacción “cross-linking”; c) desamidación.

Cuando el grupo ϵ -amino de la lisina es el sustrato, las cadenas de péptidos quedan unidas a través de enlaces covalentes ϵ -(γ -glutaminil) lisina (G-L) (*Figura 1.8b*). En ausencia de sustratos con grupos amino, las TG catalizan la hidrólisis del grupo γ -carboxiamida del grupo glutaminil (*Figura*

1.8c) dando lugar a una desaminación (Motoki & Seguro, 1998). La formación de los entrecruzamientos no reduce el valor nutricional del alimento, debido a que el residuo de lisina permanece disponible para la digestión (Bourtoom, 2009).

Originariamente, las TG se extraían del hígado de cobjaya o del plasma bovino, por lo que su obtención era limitada y muy costosa, entorpeciendo así su producción a gran escala y su comercialización (Zhu *et al.*, 1995). En 1989 se aisló la enzima a partir del microorganismo *Streptovercillium mobaraense*, actualmente denominado *Streptomyces mobaraense*. Esta enzima, capaz de establecer enlaces covalentes con las proteínas, se denominó transglutaminasa microbiana, disponiéndose así una fuente de enzima con un coste reducido. Desde entonces, ha sido comercializada como preparado enzimático para la industria alimentaria por Ajinomoto Corporation. Hasta el momento éste es el único producto de estas características disponible comercialmente.

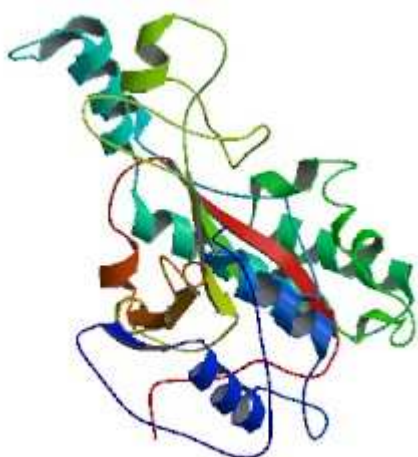


Figura 1.9. Representación de la TG microbiana (Kashiwagi, 2002).

La TG microbiana (Figura 1.9) se caracteriza por catalizar la formación de enlaces ϵ -(γ -glutaminil) lisina en la mayoría de las proteínas que contengan glutamina y lisina, como las caseínas, globulinas de soja, gluten, proteínas de huevo, miosina y fibrina, entre otras, pero debe tenerse en cuenta que la cantidad de enlaces cruzados formados dependerá de la estructura

macromolecular de cada sustrato (Dickinson, 1997).

Dado que los residuos de glutamina residen en regiones flexibles de la cadena polimérica o en regiones con giros β o inversos, las caseínas se convierten en excelentes sustratos (Nio *et al.*, 1986; Sakamoto *et al.*, 1994). Sin embargo, las proteínas globulares como la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y la seroalbúmina bovina son pobres sustratos debido a su estructura compacta, la cual limita el acceso a los residuos de lisina y glutamina por parte de la enzima (Motoki & Nio, 1983; Mahmoud & Savello, 1992; Dickinson & Yamamoto, 1996; Matsumura *et al.*, 1996). Así pues la susceptibilidad de esas proteínas puede mejorarse mediante del desdoblamiento o desnaturalización parcial de las mismas mediante la utilización de diversas técnicas (Lim *et al.*, 1998).

La TG microbiana es estable en un amplio rango de pH, entre 4 y 9, aunque su óptimo se localiza entre 6-7. Su punto isoeléctrico es 8,9 y, pese a que su temperatura óptima de actividad se encuentra entre 45-50 °C a pH 6, mantiene su actividad a temperaturas entre 0 y 50 °C (Ajinomoto, 2009). A temperaturas de congelación posee aún cierta actividad, pero su inactivación es irreversible a temperaturas de más de 80 °C (Ando *et al.*, 1989; Menéndez *et al.*, 2006).

A diferencia de la transglutaminasa endógena, la TG microbiana es totalmente independiente del calcio (Motoki *et al.*, 1990). Esta característica es muy importante a la hora de modificar la propiedades funcionales de las proteínas debido a que muchas de las proteínas presentes en los alimentos, como son las caseínas, globulinas de soja y miosina, son susceptibles a la presencia de Ca^{2+} , facilitando éste su precipitación, mientras que otros cationes

como K^+ , Na^+ , Mg^{2+} y Ba^{2+} no afectan a su actividad enzimática (Tsai *et al.*, 1996; Matsumura *et al.*, 2000). Por otra parte, la TG microbiana puede establecer enlaces cruzados con un mayor número de proteínas que cualquier otra TG obtenida de mamíferos (De Jong *et al.*, 2001).

La TG microbiana se ha utilizado en la elaboración de películas para polimerizar proteínas de lactosuero (Mahmoud & Savello, 1992, 1993; Truong *et al.*, 2004), caseínas (Motoki *et al.*, 1987), proteínas de soja (Tang *et al.*, 2005, 2006), proteínas de clara de huevo (Lim *et al.*, 1998), gelatina (Lim *et al.*, 1999) y gluten de trigo (Larré *et al.*, 2000). También se ha estudiado su efecto en mezclas de proteínas de lactosuero y proteína de soja (fracción 11S) (Yildirim *et al.*, 1996; Yildirim & Hettiarachchy, 1997, 1998), de pectina y harina de soja (Di Pierro *et al.*, 2005), y de gelatina y caseínas (Chambi & Grosso, 2006) o proteínas de lactosuero y zeína (Oh *et al.*, 2004). En general, el entrecruzamiento producido por la TG microbiana incrementa la fuerza tensil, mejora la tracción de las películas y disminuye la solubilidad de las proteínas constitutivas del film, indicando la potencial aplicación de esta enzima para la mejora de las propiedades de las películas proteicas (Gennadios *et al.*, 2004).

Mahmoud & Savello (1993) investigaron la elaboración de películas utilizando TG microbiana como catalizador enzimático del entrecruzamiento, a partir de proteínas de lactosuero (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y una mezcla equimolar de ambas). Según estos autores, el entrecruzamiento covalente de las proteínas de lactosuero debido a la acción de esta enzima puede utilizarse para la elaboración de películas o recubrimientos. Sin embargo, para la utilización de la enzima es preciso tener en cuenta el pH y la

naturaleza enzimática de la superficie del alimento a recubrir, puesto que la formación y propiedades de las envueltas se ven afectadas por ambos factores.

Truong *et al.* (2004) encontraron que las proteínas de lactosuero (obtenidas de un aislado proteico) entrecruzadas con TG microbiana presentaban una mayor viscosidad y distintas características de gelificación comparadas con las proteínas control.

Tang *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la TG microbiana sobre las propiedades y la microestructura de películas elaboradas con aislado proteico de soja y distintos plastificantes (glicerol, sorbitol y una mezcla equimolar de ambos). La adición de la enzima incrementaba la fuerza tensil y la hidrofobicidad superficial, disminuyendo a su vez la elongación y transparencia. No obstante, la permeabilidad al vapor de agua no se vería afectada de manera significativa por el tratamiento enzimático. Por otro lado, las películas tratadas presentaron superficies de mayor rugosidad, siendo más homogéneas y compactas en comparación con los controles.

Yildirim *et al.* (1996, 1997) obtuvieron heteropolímeros de aislado proteico de lactosuero y glicinina (11S) con mejores propiedades funcionales (mayor capacidad espumante y mayor estabilidad al calor) gracias al entrecruzamiento mediante TG microbiana. Además, sugirieron la aplicación de este tipo de polímeros en alimentos que requieren un fuerte tratamiento térmico como sopas, salsas, entre otros.

Yildirim & Hettiarachchy (1998) utilizaron TG microbiana para el entrecruzamiento en la elaboración de películas de proteínas de lactosuero, obteniendo films con mayor fuerza tensil que los control y con una mejor

integridad mecánica. También estos autores expusieron que la efectividad del entrecruzamiento enzimático dependería de las condiciones de acidez y actividad proteolítica existentes en la superficie del alimento a recubrir, como ya comentaron Mahmoud & Savello (1993).

Larre *et al.* (2000) demostraron la eficacia de la TG microbiana para introducir enlaces covalentes en películas elaboradas a partir de almidón parcialmente desaminado. El establecimiento de esos enlaces covalentes induciría la formación de biopolímeros de elevado peso molecular, responsables de la mayor insolubilidad de los films tratados y la reducción de su hidrofobicidad superficial.

Finalmente, Oh *et al.* (2004) utilizaron la TG microbiana para incorporar hidrolizados de zeína en la preparación de películas con proteínas de lactosuero o caseínas. Estos films presentaron una mayor elongación pero menor fuerza tensil, sin observarse modificaciones significativas en su permeabilidad al vapor de agua. Así pues, este entrecruzamiento con las moléculas de zeína mejoraría la flexibilidad de las películas de proteínas lácteas.

Hasta el momento, no se tiene constancia de la realización de estudios de las propiedades de recubrimientos proteicos modificados mediante la adición de TG aplicados sobre alimentos.

C. Ultrasonicación

Los ultrasonidos pueden definirse como ondas acústicas inaudibles para el ser humano, con una frecuencia superior a 16 kHz (Benedito *et al.*, 1995). La Figura 1.10 muestra el espectro de las ondas sonoras.

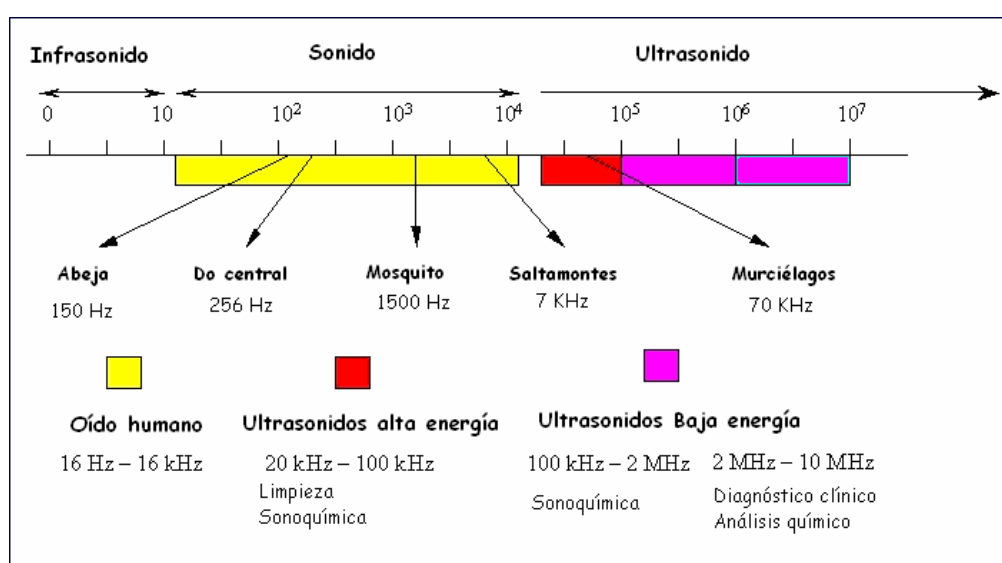


Figura 1.10. Representación del espectro vibracional de las ondas sonoras.

Generalmente, los ultrasonidos se clasifican en dos grupos según la cantidad de energía generada, la cual viene caracterizada por la potencia (W), intensidad (W/cm^2) o la densidad energética (W/m^3) (Dolatowski *et al.*, 2007):

a) *Ultrasonidos de baja energía (alta frecuencia):*

Las aplicaciones de ultrasonidos de baja energía (baja potencia, baja intensidad) implican el uso de frecuencias por encima de 100 kHz a intensidades por debajo de $1 W/cm^2$ (Mason & Luche, 1996; Villamiel & De Jong, 2000). Los ultrasonidos de baja intensidad utilizan un nivel de potencia tan bajo que las ondas ultrasónicas no causan alteraciones químicas ni físicas

en las propiedades del material a través del cual pasa la onda, por lo que se denominan no-destructivas. La aplicación más extendida de los ultrasonidos de baja intensidad en la industria alimentaria es como técnica analítica para obtener información sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, informando sobre su composición, estructura y estado físico (McClements, 1995; Fellows, 2000; Mulet *et al.*, 2002; Jayasooriya *et al.*, 2004; Knorr *et al.*, 2004). También se utilizan con éxito para controlar diversos procesos en la industria alimentaria como por ejemplo controlar el flujo de fluidos. Otras aplicaciones incluyen la estimulación de la actividad celular, la limpieza superficial de alimentos, el control de la actividad de enzimas, ayuda en procesos de extracción, cristalización, emulsificación, filtración, secado, procesos de congelación o de ablandamiento de la carne (Mason & Luche, 1996; Behrend & Schubert, 2001).

b) *Ultrasonidos de alta energía (baja frecuencia):*

Las aplicaciones de ultrasonidos de alta energía utilizan intensidades superiores a 1 W/cm^2 y frecuencias del rango entre 18 y 100 kHz (McClements, 1995; Povey & Mason, 1998; Villamiel & De Jong, 2000). Este tipo de ultrasonidos es capaz de alterar las propiedades del material a través del cual se transmiten debido al fenómeno de cavitación. La cavitación consiste en la formación, crecimiento e implosión de burbujas en un medio líquido (Suslick, 1990). Cuando los ultrasonidos se transmiten en un medio líquido, generan ondas de compresión y descompresión de manera cíclica. Durante la fase de descompresión, la presión negativa puede ser lo suficientemente intensa para vencer las fuerzas de atracción moleculares y provocar la formación de burbujas. El crecimiento de las mismas depende de

la intensidad del tratamiento. A bajas intensidades, las burbujas formadas aumentan progresivamente de tamaño en los sucesivos ciclos de compresión y descompresión hasta alcanzar un tamaño crítico (tamaño de resonancia) a partir del cual experimentan un rápido crecimiento seguido de su implosión. Sin embargo, a elevadas intensidades ultrasónicas, las burbujas implosionan prácticamente de forma instantánea tras su formación. Según consideraciones teóricas se estima que en la implosión llegan a alcanzarse temperaturas próximas a los 5.000 °C y presiones de 1.000 atmósferas (Flint & Suslick, 1991). La intensidad de la cavitación depende de las características del ultrasonido empleado (ej. frecuencia, intensidad), de las propiedades del producto sobre el que se aplica (ej. viscosidad, tensión superficial) y de las condiciones ambientales (ej. temperatura, presión) (Dolatowski *et al.*, 2007).

Durante la cavitación, las moléculas de agua pueden romperse generando radicales libres altamente reactivos ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}\cdot + \cdot\text{OH}$). Estos radicales hidroxilo generados son químicamente muy reactivos y pueden reaccionar fácilmente con compuestos susceptibles a la oxidación presentes en el alimento (Riesz & Kondo, 1992). Dependiendo del procesado y de la matriz alimentaria, los efectos de la cavitación acústica pueden ser, o bien beneficiosos, o bien perjudiciales. La actividad de los antioxidantes en los alimentos y sistemas biológicos es dependiente del grado de hidroxilación. La formación de radicales es considerada una desventaja a la hora de preservar la actividad biológica de compuestos como los fenoles (Wan *et al.*, 2005). Sin embargo, los radicales pueden mejorar la actividad antioxidante de otros componentes como flavonoides, al incrementar el grado de hidroxilación (Ashokkumar *et al.*, 2008). Finalmente, cabe destacar que para aquellas aplicaciones en las que la formación de radicales hidroxilo afecta negativamente la integridad del

alimento, es preferible la utilización de ultrasonidos de baja frecuencia. Esto se debe a que, como se ha señalado recientemente, los ultrasonidos de alta frecuencia generan una mayor cantidad de radicales (Soria & Villamiel, 2010).

Su utilización en la industria alimentaria se ha sugerido para aplicaciones tan diferentes como la preparación de emulsiones, el control y modificación de procesos de cristalización de grasas y azúcares, el ablandamiento de la carne, la desgasificación de alimentos líquidos, la promoción de reacciones de oxidación, la mejora de procesos de filtración o deshidratación de alimentos, la inactivación o extracción de microorganismos y enzimas, para la inducción de reacciones de oxidación, o pueden ser utilizados para homogeneizar, debido a su capacidad para reducir el tamaño de partícula (Roberts, 1993; McClements, 1995; Benedito *et al.*, 1996; Knorr *et al.*, 2004; Zheng & Sun, 2006).

El efecto de los ultrasonidos de alta intensidad sobre las propiedades funcionales de las proteínas ha sido poco estudiado. En general, las propiedades funcionales de las proteínas (ej. propiedades organolépticas, interfaciales, enzimáticas o reológicas, entre otras), que son de gran interés para la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, están influenciadas por la estructura molecular proteica, la cual determina las interacciones intra e intermoleculares (McClements, 1995).

La ultrasonicación provoca cambios estructurales en las proteínas, a través de diversos efectos mecánicos, térmicos y/o químicos, que dan lugar a modificaciones de las propiedades funcionales de las mismas (Gülseren *et al.*, 2007). Claramente, el grado de cambio estructural en las proteínas a

consecuencia de la ultrasonicación depende de la naturaleza de la proteína, las características del ultrasonido, el tiempo de ultrasonicación y las condiciones ambientales como la temperatura, la fuerza iónica o el solvente utilizado (Weiss *et al.*, 2011). Los cambios observados se deben a modificaciones más o menos intensas en la estructura fundamental proteica, incluyendo diferentes plegamientos y ensamblajes de las proteínas (estructura secundaria y terciaria), pudiendo producirse incluso una desnaturalización completa, así como posibles roturas de las cadenas aminoacídicas (Figura 1.11). Los ultrasonidos pueden dar lugar a la formación de agregados proteicos, posiblemente debidos a la exposición de grupos funcionales previamente escondidos en el interior de la estructura proteica. Además, los ultrasonidos alteran la actividad de las enzimas presentes en los alimentos y reducen el tamaño de partícula en ciertos alimentos, presentando un efecto homogeneizador (Weiss *et al.*, 2011).

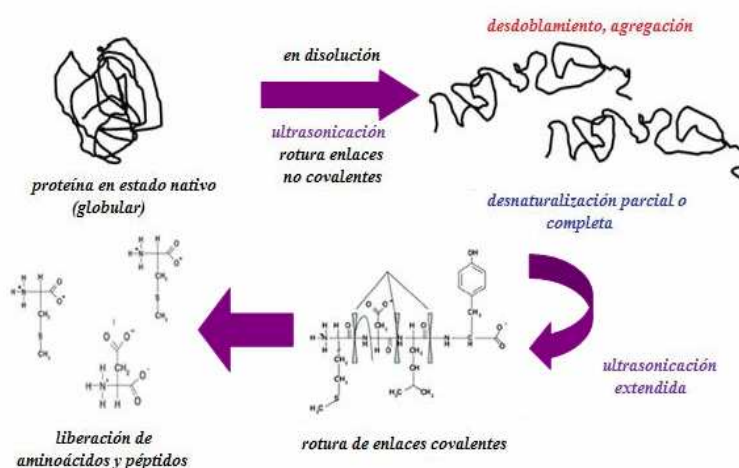


Figura 1.11. Ilustración esquemática del efecto de los ultrasonidos sobre la integridad de las proteínas (Lee & Feng, 2011).

Existen diversos estudios acerca del efecto de los ultrasonidos sobre la funcionalidad de las proteínas de la leche (Taylor & Richardson, 1980; Villamiel & De Jong, 2000), de la seroalbúmina bovina (Gülseren *et al.*, 2007), de concentrados, aislados e hidrolizados de proteínas del lactosuero (Jambrak *et al.*, 2008; Kresic *et al.*, 2008), de la α -lactalbúmina (Jambrak *et al.*, 2010) y de proteínas de soja (Fukase *et al.*, 1994; Jambrak *et al.*, 2009).

Tanto las proteínas coloidales de la leche como los glóbulos grasos pueden absorber o reflejar la energía derivada de los ultrasonidos. Taylor & Richardson (1980) observaron un incremento de la actividad antioxidante de la leche desnatada ultrasonicada, el cual atribuyeron a la alteración de las estructuras terciarias y cuaternarias de la caseína a causa de la energía ultrasónica. Además, los ultrasonidos son capaces de desnaturalizar tanto la α -lactoalbúmina como la β -lactoglobulina en la leche, siendo el efecto mayor en la leche entera que en la desnatada (Villamiel & De Jong, 2000). La desnaturalización de estas proteínas también es mayor cuando el tratamiento de ultrasonicación se aplica conjuntamente con calor. Este efecto sinérgico es más pronunciado en la leche entera, donde la concentración de sólidos es mayor y la proporción de proteína menor, debido a la reducción de la viscosidad de la leche calentada, lo que facilita la penetración de los ultrasonidos en la leche (Villamiel & De Jong, 2000).

Gülseren *et al.* (2007) estudiaron los cambios en la estructura y funcionalidad de la seroalbúmina bovina (BSA) bajo los efectos de los ultrasonidos de alta intensidad. Según estos autores, los efectos mecánicos, térmicos y químicos de la ultrasonicación dan lugar a cambios estructurales en la BSA que modifican las propiedades funcionales de la misma. Estos cambios

darían lugar a la formación de un estado inducido por la ultrasonicación diferente al estado producido térmica, mecánica o químicamente, intermedio entre el estado nativo y el estado desnaturalizado (Güzey *et al.*, 2006; Gülseren *et al.*, 2007).

Jambrak *et al.* (2008) investigaron el efecto de la ultrasonicación sobre diversas propiedades funcionales de las proteínas del lactosuero, empleando concentrados, aislados e hidrolizados. Aplicaron distintos tratamientos ultrasónicos utilizando tres frecuencias (20, 40 y 500 kHz) y dos tiempos (15 y 30 minutos), los cuales dieron lugar a diferentes modificaciones en las propiedades funcionales. En general, la ultrasonicación varía la conductividad (debido al aumento de radicales hidroxilo), la solubilidad (a causa del cambio conformacional proteico, la disminución del peso molecular y el aumento de la temperatura y de grupos cargados), y la capacidad espumante (debido al efecto homogeneizador). Los distintos tratamientos de ultrasonidos dan lugar a diferentes modificaciones en las propiedades funcionales, siendo el tratamiento con 20 kHz (ultrasonidos de alta intensidad) el que produce los mayores efectos sobre las propiedades funcionales. También el tiempo de ultrasonicación influye en el efecto sobre la funcionalidad proteica, observándose de manera general mayores efectos a mayores tiempos. El mismo diseño experimental se aplicó para la α -lactalbúmina (Jambrak *et al.*, 2010), obteniéndose resultados prácticamente idénticos.

Finalmente, Fukase *et al.* (1994) estudiaron el efecto de los ultrasonidos en la extracción de proteínas de soja de las semillas, observando que la cavitación produce la desnaturalización de las proteínas de soja y siendo el grado de desnaturalización proporcional a la intensidad del ultrasonido. De

manera complementaria, Jambrak *et al.* (2009) analizaron el efecto de distintos tratamientos de ultrasonicación (20, 40 y 500 kHz) sobre las propiedades funcionales de suspensiones de concentrados y aislados proteicos de soja. Observaron que el tratamiento con ultrasonidos causa cambios significativos en la textura, conductividad, solubilidad, diámetro y propiedades reológicas, encontrando diferencias entre los comportamientos de los concentrados y aislados, que se explicarían por la presencia de otros componentes (azúcares, grasas) en los concentrados que tendrían un efecto protector sobre las proteínas cuando se tratan con ultrasonidos.

Se han llevado a cabo pocos estudios sobre el efecto de los ultrasonidos en la estructura y comportamiento de las proteínas en la formación de películas comestibles de base proteica (Marcuzzo *et al.*, 2010).

Banerjee *et al.* (1996) estudiaron el efecto de la aplicación de distintos tratamientos de ultrasonidos con distintas frecuencias (168 kHz y 520 kHz), potencias (baja, media y alta) y tiempos de exposición (30 minutos o 1 hora) sobre las propiedades funcionales de películas elaboradas con concentrado de proteínas de lactosuero (CPS) y con caseinato sódico. El efecto del ultrasonido en los films de caseinato sódico fue más pronunciado que en los de CPS. Esto podría deberse a las distintas fuerzas implicadas en los dos tipos de films. Las moléculas de caseína están unidas principalmente por enlaces de hidrógeno, hidrofóbicos y electroestáticos, mientras que las proteínas del lactosuero se unen covalentemente mediante enlaces disulfuro. Las ondas ultrasónicas parecen capaces de afectar más a las interacciones de caseína que al entrecruzamiento de las proteínas de lactosuero. Los ultrasonidos de menor frecuencia a media potencia dieron lugar a las películas con mejores

propiedades mecánicas, siendo el tratamiento de una hora mejor que el de 30 minutos. La tracción aumentó hasta un 224% y la resistencia a la punción hasta un 120%. La elongación, la permeabilidad al vapor de agua y contenido en humedad de los films no se vieron afectados por el tratamiento. En conclusión, el tratamiento de soluciones de caseinatos mejora las interacciones moleculares de la red proteica de las películas, mejorando la fuerza mecánica de las mismas.

Liu *et al.* (2004) estudiaron el efecto de la aplicación de ultrasonidos sobre la estructura de películas elaboradas con proteína de cacahuete. Aplicaron diferentes tratamientos de ultrasonidos a las soluciones formadoras de películas durante 10 y 30 minutos. Observaron que los tratamientos empeoraban las propiedades mecánicas de las películas, con excepción de la muestra tratada 10 minutos en un baño de ultrasonicación, la cual mostraba una mejoría de las propiedades mecánicas y un ligero incremento de su solubilidad. Este incremento podría deberse a la disociación de la estructura cuaternaria y a la liberación de pequeños péptidos, lo que favorecería la solubilidad proteica. Así pues, obtuvieron mejoras de las propiedades mecánicas a expensas de la pérdida de hidrofobicidad de las películas.

Marcuzzo *et al.* (2010) comprobaron que la ultrasonicación puede ser un tratamiento útil a la hora de disolver los agregados proteicos que caracterizan los films de gluten preparados en medio ácido, sin que sea necesaria la adición de aditivos químicos. Sin embargo, el tratamiento con ultrasonidos (intensidad 600 W/cm^2 y frecuencia de 24 kHz/12 minutos) no provocó grandes cambios en las fracciones proteicas ni en su solubilidad, lo que sugiere la ausencia de importantes roturas proteicas a nivel molecular. Así

pues, parece que el gluten muestra una alta tolerancia al tratamiento con ultrasonidos.

No se ha encontrado en la bibliografía ningún estudio sobre el efecto de los ultrasonidos en recubrimientos proteicos aplicados a alimentos.

1.6.3 Técnicas de aplicación de los envases comestibles

La aplicación de los envases comestibles sobre alimentos puede realizarse de dos maneras: una *directa*, aplicando directamente una solución de la envuelta, mediante diversas técnicas, de manera que el recubrimiento se deposite en la superficie del alimento (Gontard *et al.*, 1994), y otra *indirecta*, mediante la formación de una película independiente con la que posteriormente se envolverá el alimento. La manera más sencilla de aplicar una envuelta es directamente a partir de una solución.

Para la aplicación *directa* se han desarrollado diversos métodos como la inmersión, el pulverizado o la aplicación en forma de espuma, entre otros métodos (Donhowe & Fennema, 1994; Cutter & Sumner, 2002; Tharanathan, 2003). La etapa de aplicación va seguida normalmente de una etapa de secado o enfriamiento para fijar la envuelta, acelerar el proceso o eliminar el exceso de agua (Gontard *et al.*, 1994). Para la aplicación en forma de espuma, debe añadirse un agente espumante a la composición del envase o suministrar aire comprimido al tanque con la solución. El método de inmersión se recomienda para productos que requieren la aplicación de varias capas de recubrimiento o cuando el producto presenta una superficie irregular. Tras sumergir el alimento, el exceso de envuelta se elimina normalmente por goteo y la solución restante se solidifica sobre el producto. Cuando se requiere una

envuelta más uniforme o de un espesor muy fino, el procedimiento recomendado es la pulverización (Donhowe & Fennema, 1994; Grant & Burns, 1994; Cutter & Sumner, 2002). Debido a la alta presión aplicada en este método (0,41-0,55 MPa), se requiere un menor gasto de solución formadora de película para obtener recubrimientos uniformes (Tharanathan, 2003).

Con relación a la aplicación *indirecta*, se requiere la elaboración previa de películas independientes con el grosor y textura deseadas. Además, éstas deben ser firmes y poseer la flexibilidad suficiente para poder envolver adecuadamente el alimento (Donhowe & Fennema, 1994; Cutter & Sumner, 2002). Debe señalarse que las películas formadas independientemente pueden presentar características diferentes respecto a las envueltas creadas directamente sobre la superficie de los alimentos (Pavlath & Orts, 2009).

A nivel industrial, las películas preformadas pueden fabricarse según las técnicas empleadas comúnmente para ciertos materiales y para las películas no comestibles, tales como la extrusión, el moldeado o el laminado (Guilbert & Biquet, 1995).

Cuando un polímero se aplica sobre una superficie o matriz, en nuestro caso a un alimento, existen dos fuerzas que operan, una se genera entre las moléculas del polímero formadoras de la película (cohesión) y la otra, entre la película y el sustrato (adhesión). El grado de cohesión afecta a propiedades de la película o recubrimiento, tales como: la densidad, compactación, porosidad, permeabilidad, flexibilidad y fragilidad de la película. De esta forma, una cohesión estructural elevada se traduce en una reducción de la flexibilidad, de la porosidad y de la permeabilidad a los gases y a los solutos (Guilbert &

Biquet, 1995). La cohesión depende de la estructura química del biopolímero, del proceso de elaboración, parámetros empleados (temperatura, presión, tipo de solvente y dilución, técnica de aplicación, procedimiento de eliminación del solvente, etc.), presencia de plastificantes, agentes ligantes y del espesor final de la película. La adhesión del recubrimiento sobre la superficie del alimento depende principalmente de la afinidad entre ambos, la cual viene determinada por su naturaleza y no por el método de aplicación. El uso de sustancias, como los tensoactivos en su formulación, puede permitir la adhesión del recubrimiento a la superficie de un producto por el que presentaba una baja o nula afinidad (Debeaufort *et al.*, 1998).

II. El salmón congelado: alteraciones durante su almacenamiento

1.7. Generalidades del salmón del Atlántico

La demanda de pescado ha aumentado de manera continua desde principios de la década de los noventa debido al incremento en el consumo per cápita a nivel mundial. Este incremento se debe a sus efectos beneficiosos sobre la salud (FAO, 2010).

La producción global de captura de pescado y acuicultura alcanzó cerca de 142 millones de toneladas de pescado en el 2008, dando un consumo per cápita anual de 17,1 kg de peso vivo de pescado (FAO, 2010). Según esta organización, la actual demanda de pescado será duplicada en unos 20 años debido a la necesidad de proporcionar dietas más saludables (con mayor contenido de grasas insaturadas y menos saturadas).

El salmón es uno de productos pesqueros comercializados más importantes en términos de valor y en el año 2008 representaba el 12,1% del valor total de los productos pesqueros comercializados internacionalmente, sólo por detrás del camarón que supuso un 15,4% (FAO, 2010).

En España el consumo de pescado en el hogar en 2010 se situó en 706 millones de Kg, con un consumo per cápita de 15,36 Kg/persona de los cuales 0,73 Kg/persona corresponderían al salmón (MARM, 2011). La mayor parte del salmón consumido en nuestros mercados procede de las importaciones de

Noruega y en menor medida de Escocia, siendo prácticamente la totalidad del salmón consumido en España salmón atlántico.

Desde el punto de vista nutricional, las especies marinas poseen un elevado contenido de nutrientes importantes para la dieta humana como proteínas de elevado valor nutricional y buena digestibilidad, vitaminas liposolubles (A y D), minerales (I, F, Ca, Cu, Zn, Fe, Se, etc.) y ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (Simopoulos, 1997). El 90% de los ácidos grasos poliinsaturados que componen los lípidos en el pescado está constituido por ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Ackman & Ratnayake, 1992). El nivel de ácidos grasos en el pescado depende de la especie, de la distribución de grasa en el pescado y la temporada del año (Flick *et al.*, 1992; Harris & Tall, 1999). El término omega-3, desde el punto de vista químico, significa que el primer enlace doble en el carbono de la cadena principal ocurre en el tercer enlace carbono-carbono contando desde el extremo opuesto al grupo ácido. La nomenclatura omega (“ ω ”) es utilizada por los nutricionistas para referirse a los ácidos grasos poliinsaturados que tienen entre 18 y 22 átomos de carbono.

La composición química de los lípidos del pescado difiere de otras grasas y aceites naturales en lo siguiente: 1) poseen una mayor variedad de compuestos grasos, 2) poseen mayores cantidades de ácidos grasos con cadenas que exceden los 18 carbonos, 3) contienen una mayor porción de ácidos grasos altamente insaturados, 4) sus ácidos grasos poliinsaturados poseen el doble enlace principalmente en la posición ω_3 antes que en la ω_6 (Harris & Tall, 1999).

Sin embargo, desde un punto de vista tecnológico, la oxidación de estos ácidos grasos poliinsaturados supone una pérdida de calidad en el pescado. Los compuestos de oxidación lipídica, resultantes del enranciamiento enzimático y no enzimático, promueven la aparición de aromas desagradables y la pérdida de nutrientes esenciales (Harris & Tall, 1999; Kolakowska, 2003).

Los pescados pueden clasificarse en función de su contenido graso:

- *Pescados magros o blancos*: con un contenido en grasa inferior al 2%, aportan entre 50-80 kcal/100gr (bacalao, rape, lenguado).

- *Pescados semigrasos*: el contenido graso se sitúa entre 2-7%, y el valor energético es de 80-160 kcal/100gr (trucha, gallineta).

- *Pescados grasos o azules*: superan el 5% de grasa pudiendo llegar hasta un 28%, y el valor calórico está entre 160-200 kcal/100gr (caballa, sardina, chicharro). A este grupo también pertenecería el salmón del Atlántico.

El salmón común o del Atlántico (*Salmo salar*) (Figura 1.12) pertenece a la familia *Salmonidae*, del orden Salmoniformes. Esta familia comprende varios géneros: *Salmo* (salmón del Atlántico, trucha), *Oncorhynchus* (salmones del Pacífico: rosa, sockeye, coho, chum, cherry y chinook), *Hucho* (salmón del Danubio), *Salvelinus* (trucha alpina) y *Brachyumystax*. A pesar de pertenecer a la misma familia, los salmones del Pacífico presentan mucho menor contenido lipídico que los del Atlántico. Esta familia se encuentra entre los pescados más apreciados, debido al delicado sabor de su carne rosada, y se les captura tanto en los ríos (donde constituye el objeto de una apasionante modalidad de pesca deportiva) como en el mar. También se crían

artificialmente en jaulas. Los salmones son anádromos, ya que el desove, eclosión de los huevos y su primera alimentación se realizan en agua dulce; pero aproximadamente al año de edad son capaces de vivir en agua salada, regresando más adelante al agua dulce para el desove (Pike *et al.*, 1990).



Figura 1.12. Salmón del atlántico (*Salmo salar*).

Uno de los aspectos más destacables de la carne de salmón es su perfil lipídico, el cual se caracteriza por su elevado contenido en ácidos grasos de alto grado de insaturación, particularmente el ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (ω 3 20:5) (EPA) y el ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (ω 3 22:6) (DHA), ambos omega-3. Además, es el único de los pescados grasos disponibles para nuestro consumo que aporta más DHA que EPA (Valenzuela, 2005).

El salmón se caracteriza por tener un sabor característico, el cual se cree que está asociado a sus componentes lipídicos, mientras que el aroma a salmón está asociado a compuestos del tipo alquil-furanoides (Durnford & Shahidi, 1998). El tradicional color rosado de su carne, frecuentemente considerado un parámetro de calidad y de aceptación por parte del consumidor, se debe, además de a las hemoproteínas, a su alto contenido en pigmentos carotenoides (*Figura 1.13*), siendo la astaxantina el mayoritario y encontrándose también

cantaxantina, β -caroteno, luteína, tunaxantina y zeaxantina en pequeñas cantidades (Andersen *et al.*, 1990; Sheehan *et al.*, 1998).

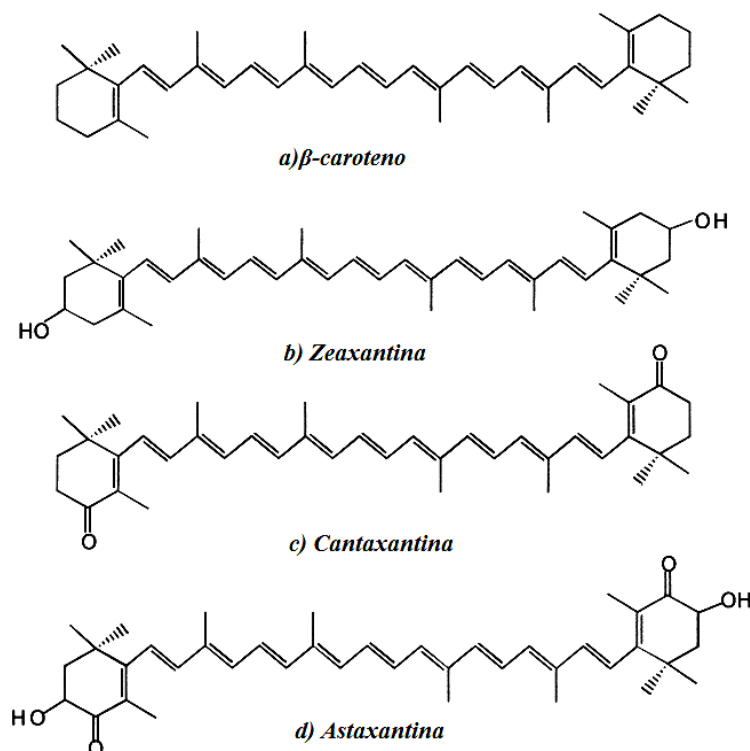


Figura 1.13. Representación de la estructura química de algunos carotenoides presentes en la carne de salmón.

En la naturaleza, los carotenoides son sintetizados por algas y bacterias, llegando a los peces a través de la cadena alimentaria (Torrissen *et al.*, 1989). Los peces de vida silvestre disponen de múltiples fuentes de carotenoides: crustáceos, algas y peces de inferior tamaño, entre otros, los cuales actúan como organismos acumuladores. Sin embargo, para los salmónidos criados en cautividad, es necesario suplementar su dieta con carotenoides (Schiedt & Liaaen-Jensen, 1995). Normalmente se utiliza una combinación de astaxantina y cantaxantina en las dietas, puesto que así se obtiene una mejor pigmentación

que cuando se usan por separado. A pesar de que la cantaxantina proporciona una buena pigmentación, el uso de astaxantina aporta una coloración de mayor intensidad a similares concentraciones (Storebakken & No, 1992). Además, la astaxantina se deposita en el músculo con mayor eficacia, debido probablemente a una mejor absorción en el tracto digestivo (Torrissen *et al.*, 1989). Estudios preliminares propusieron que los carotenoides estaban unidos a la actomiosina en el músculo del salmón, sin embargo posteriormente se identificó a la α -actinina como la principal proteína de unión con la astaxantina (Ojagh *et al.*, 2010). Así pues, el grado de desnaturalización proteica en el músculo de salmón es importante no solo por su efecto en las propiedades texturales, sino también por su relación con el desarrollo de importantes cambios de color (Ojagh *et al.*, 2010).

1.8. Conservación del pescado en congelación y alteraciones durante su almacenamiento

El pescado fresco es un alimento con un elevado contenido de agua biológicamente activa, un pH próximo a la neutralidad y un gran número de sistemas enzimáticos, todos estos factores hacen que se deteriore muy rápidamente. Las mayores causas de alteración son el crecimiento microbiano, la actividad enzimática y las reacciones químicas que se originan por interacciones entre nutrientes o con otros componentes (Navarro, 1991).

El método más utilizado para conservar los productos pesqueros, desde su captura hasta la llegada al consumidor, es la aplicación del frío. En función de la temperatura empleada se puede clasificar al pescado en refrigerado, congelado y ultracongelado (Fennema, 1993). El objetivo principal de la

congelación del pescado es impedir el crecimiento de microorganismos, retardar los fenómenos de degradación interna del pescado y conseguir que después de descongelado no se aprecien modificaciones respecto a las características que tenía en estado fresco. Sin embargo, numerosas experiencias demuestran que la oxidación e hidrólisis lipídicas se siguen produciendo durante el almacenamiento en estado congelado.

La congelación y el almacenamiento del pescado en congelación es uno de los métodos más utilizados para mantener las propiedades sensoriales y nutritivas del pescado (Erickson, 1997). Esto se debe a que es un excelente método de conservación, ya que inhibe la actividad de microorganismos patógenos y alterantes (efecto bacteriostático), a la vez que ralentiza las reacciones bioquímicas y enzimáticas que se producen en el pescado fresco (Flick, *et al.*, 1992; Fennema, 1993). Estos efectos se deben al descenso de la temperatura y a la reducción de la actividad de agua debido a la congelación de la misma y a la consecuente concentración de las sustancias en el agua restante. Así pues, a temperaturas inferiores a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ el crecimiento microbiano se inhibe (aunque los microorganismos siguen vivos) y las reacciones bioquímicas se ralentizan, pero como se ha comentado anteriormente, siguen produciéndose a lo largo del almacenamiento.

Aunque la congelación es un buen medio de conservar el pescado, ha de tenerse en cuenta que no mejora la calidad del producto, la cual dependerá de la calidad que presenta la materia prima antes de la congelación y de otros factores que intervienen durante la congelación, el almacenamiento y la distribución (FAO, 1977).

Las principales alteraciones que dan lugar a la pérdida de calidad en el pescado durante su almacenamiento en congelación y posterior descongelación son: *la alteración lipídica* (por hidrólisis y oxidación); *cambios en la textura* (debidos a la desnaturalización proteica y que desembocan en el endurecimiento de la carne, en un descenso de la capacidad de retención de agua y en mayores pérdidas por goteo); *cambios en el color* (decoloración por degradación de pigmentos, por desnaturalización proteica o por deshidratación) y *deseccación superficial* (quemadura por congelación). Así mismo, parámetros como la velocidad de congelación, la temperatura y duración del almacenamiento, y el procedimiento de descongelación, son factores que afectan a la calidad final del producto (Einen *et al.*, 2002).

Los efectos de la alteración lipídica son importantes en las especies grasas, observándose que éstas tienen un tiempo de vida útil inferior a las magras, llegándose a demostrar en la práctica que la formación de productos de oxidación es el factor limitante del tiempo de vida útil de las especies de pescado de elevado contenido graso almacenadas en congelación (Fennema, 1993). Por tanto, debido al elevado contenido graso del salmón, y más concretamente por su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados, la alteración predominante durante el almacenamiento en congelación sería la rancidez debida a la oxidación lipídica.

1.8.1 Alteración de la textura

El músculo de pescado congelado que ha sido almacenado pierde algunas propiedades funcionales, tales como capacidad de emulsificación, capacidad de enlazamiento con los lípidos, capacidad de retención de agua y capacidad de formar gel. La principal causa de estos cambios está establecida

en la desnaturalización de la proteína, especialmente la miofibrilar (Suzuki, 1981). Así mismo, Hermman (1977) indica que las diversas proteínas muestran distintas susceptibilidades a la desnaturalización por congelación, resultando siempre más afectadas las globulinas que las albúminas y en el seno del músculo, la actomiosina. La actina y la miosina son las proteínas fibrilares fundamentales de la fibra muscular, constituyendo en la musculatura del pescado un 75% aproximadamente de la proteína total.

En el músculo vivo, el ATP (trifosfato de adenosina) es el que controla la formación de actomiosina. Tras la muerte, las reacciones bioquímicas disminuyen las cantidades de ATP, que se transforma en ácido, y de esta manera, cae el pH del músculo. Cuando pasa esto, las proteínas permanecen unidas, la carne pierde su capacidad de retener el agua, y la porción comestible se transforma en un producto seco y de textura fibrosa.

Al mismo tiempo, durante la descongelación y la cocción, ocurren pérdidas de jugos naturales, vitaminas y minerales, lo que resulta en una pérdida del valor nutritivo y de la calidad sensorial del producto. Éste se vuelve seco y rígido. Además, las pérdidas por goteo producen suspensiones de proteínas que fomentan el crecimiento bacteriano, lo cual atenta también contra la vida útil del producto.

La determinación de la pérdida de agua en el pescado congelado está relacionada con la proporción de la proteína degradada durante el almacenamiento en congelación. Incrementos en este parámetro se relacionan generalmente con cambios en las proteínas miofibrilares; por ello, cuando la capacidad de retener agua de la fracción miofibrilar se reduce puede deberse a la desnaturalización proteica (Ben-Gigirey *et al.*, 1999).

La unión de los carotenoides, principalmente la astaxantina, a la α -actinina hace que el grado de desnaturalización proteica en el músculo del salmón no sólo modifique las propiedades texturales, sino también provoque fuertes cambios en el color de la carne (Ojagh *et al.*, 2010).

1.8.2 Alteración del color

El color es uno de los parámetros de calidad que se ven afectados por el almacenamiento. De acuerdo con Bjerkeng & Johnsen (1995), No & Storebakken (1991) y Pozo *et al.* (1988), la pérdida de color de la carne durante el almacenamiento en congelación es uno de los principales problemas. Diversos factores, como la luz, la temperatura de almacenamiento y el oxígeno, tienen un efecto negativo en la estabilidad de los carotenoides, dando lugar a la pérdida de color en la carne de los salmónidos durante el almacenamiento en congelación y el procesado (No & Storebakken, 1991; Bjerkeng & Johnsen, 1995). La luz inicia la degradación de los carotenoides, la cual es incrementada por la presencia de oxígeno.

El color del salmón puede evaluarse de diferentes maneras: químicamente, instrumentalmente y visualmente. Independientemente del método elegido, la determinación del color de la carne de salmón es un reto. El cuerpo del salmón no está coloreado de manera homogénea. Los niveles de pigmentos varían a lo largo del cuerpo del animal, siendo superiores en la región caudal y en la región ventral. También la estructura del músculo (grasa, tejido conectivo) varía tanto en el animal como en el propio filete, influenciando también esta variación la medida o percepción de color (Srede & Wold, 2008).

Como se ha comentado anteriormente, la pigmentación de la carne de los salmones resulta de la absorción y depósito de carotenoides oxigenados en el músculo a nivel del complejo de actino-miosina, específicamente a la α -actinina (Bjerkeng *et al.*, 1992; Christiansen *et al.*, 1995). De estos carotenoides la astaxantina es el mayoritario, encontrándose también cantaxantina, β -caroteno, luteina, tunaxantina y zeaxantina en pequeñas cantidades (Sheehan *et al.*, 1998).

La propiedad pigmentante de los carotenoides está determinada por la presencia de una cadena de dobles enlaces conjugados que constituye el cromóforo en todos los carotenoides (Nickel & Bromage, 1997), pero estos dobles enlaces los hacen inestables y susceptibles a la oxidación y reorganización molecular, dando lugar a innumerables derivados e isómeros con distintos valores pigmentantes.

La intensidad de la pigmentación se relaciona con la cantidad de pigmento retenido en el músculo, la cual varía de acuerdo a factores intrínsecos, como el peso del pez, tasa de crecimiento, maduración y factores genéticos (Torrissen & Naevdal, 1984; Blanc & Choubert, 1993), y extrínsecos, como la fuente y concentración de pigmentos en la dieta (Johnson *et al.*, 1980) o su contenido en lípidos (Storebakken *et al.*, 1987; Torrissen, 1995). Además, existen diversos modelos matemáticos que describen la relación entre la medida instrumental del color y la concentración de carotenoides. Concretamente, las variaciones en los parámetros de color a^* y b^* pueden estar relacionadas con la degradación de carotenoides en los salmónidos (Andersen *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1999). Bjerkeng (2000) ha señalado que la medida instrumental de la coordenada a^* presenta la mejor

correlación con la concentración de carotenoides en la carne de salmón. A pesar de que en un principio parece observarse una relación lineal entre el valor de a^* y la concentración de carotenoides, a medida que aumenta el contenido en carotenoides la linealidad con los valores de a^* se difumina, por lo que a partir de concentraciones de aproximadamente 5 mg astaxantina por kg, la relación deja de ser lineal (Skrede & Storebakken, 1986; No & Storebakke, 1991; Christiansen *et al.*, 1995; Bjerkeng, 2000). Christiansen *et al.* (1995) encontraron una elevada correlación entre los parámetros a^* , b^* y croma y el logaritmo de la concentración de carotenoides en el salmón atlántico. Finalmente, los parámetros de color CIELab (1976) también están relacionados con el contenido graso del músculo, de manera que a igual concentración de astaxantina en el músculo, el contenido de grasa muscular produce mayores valores de las coordenadas a^* y b^* (Bjerkeng, 2000).

Las posibles funciones de los carotenoides, especialmente de la astaxantina, en la protección de los lípidos del pescado congelado son (Andersen *et al.*, 1990):

- Actuar como neutralizador de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2 \Rightarrow ^3\text{O}_2 + \text{calor}$)
- Actuar como antioxidante a bajas presiones de oxígeno
- Inhibir la formación de hidroperóxidos (R-OOH)

Estas funciones pueden ser importantes a la hora de mantener la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento de alimentos con contenidos significativos de carotenoides, como es el caso del salmón del Atlántico. Además, se ha demostrado que la astaxantina es incluso más eficiente que el

β -caroteno a la hora de prevenir la formación de hidroperóxidos en un sistema de lípidos insaturados (Andersen *et al.*, 1990).

Los procesos de congelación y descongelación pueden promover la oxidación de los carotenoides en filetes de salmón atlántico (Andersen & Steinsholt, 1992; Refsgaard *et al.*, 1998b; Sheehan *et al.*, 1998). Por otro lado, el proceso de congelación también modifica a la textura del músculo, pudiendo afectar a las propiedades de reflexión de la luz, alterando la impresión visual del color de los filetes (Einen *et al.*, 2002). Por lo tanto, la pérdida de pigmentación puede estar relacionada, además de con la degradación y disminución de la concentración de carotenoides, con la desnaturalización proteica, la cual provoca que la apariencia del tejido cambie de translúcida a opaca, dando lugar a la ilusión de la pérdida de pigmentación (Ozbay *et al.*, 2006).

1.8.3 Alteración lipídica: rancidez o enranciamiento

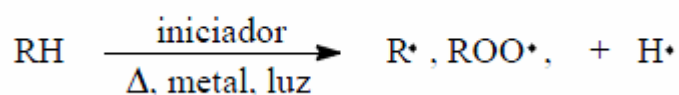
Existen tres tipos de rancidez: *rancidez hidrolítica*, *rancidez cetónica* y *rancidez oxidativa*. La rancidez hidrolítica se debe a la hidrólisis de triglicéridos mediada por enzimas y necesita la presencia de agua (Hamilton, 1999). La rancidez cetónica es causada por microorganismos en presencia limitada de oxígeno y agua en el alimento. Finalmente, la rancidez oxidativa, conocida también como autooxidación (Charalambous, 1993), se produce por el ataque del oxígeno a las grasas insaturadas con el desarrollo de productos oxidados que originan sabores indeseables en los alimentos. Estos procesos de rancidez afectan negativamente a la calidad y al tiempo de vida útil del alimento (Frankel, 1993).

Dado que habitualmente el pescado se conserva en congelación, la rancidez hidrolítica y la cetónica no ocurren en cantidades significativas. El enfriamiento del pescado limita la cantidad de agua disponible para que tenga lugar la rancidez hidrolítica y además impide la proliferación de microorganismos que causan la rancidez cetónica. Sin embargo, a pesar del descenso de la temperatura durante la congelación (-18 °C), la autooxidación sólo se reduce pero no se detiene, al ser una reacción con baja energía de activación. Por lo tanto, se desarrolla rancidez oxidativa durante el almacenamiento del pescado congelado, siendo la causante del deterioro en la textura, color, olor y sabor en este producto (Kanner, 1994).

La rancidez oxidativa es una reacción de radicales libres que involucra fases de iniciación, propagación (reacción en cadena) y terminación (De Man, 1999).

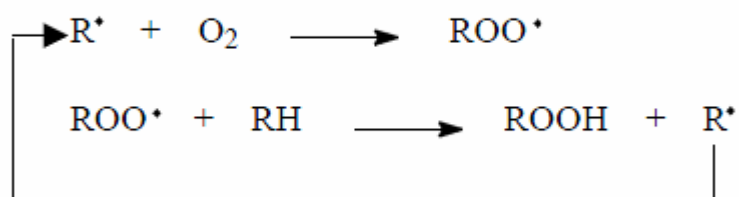
1. **INICIACIÓN:** La reacción de iniciación consiste en la sustracción de un hidrógeno de un grupo metileno adyacente a un doble enlace de un ácido graso insaturado (hidrógeno alílico) dando lugar a la formación de un radical alquilo libre. La iniciación puede ocurrir por mediación de factores como alta temperatura (Aidos *et al.*, 2002), humedad (Partanen *et al.*, 2005), presencia de iones metálicos oxidantes (Keceli & Gordon 2002, Sutton *et al.*, 2006) e incidencia directa de luz (Scrimgeour, 2005). En los ácidos grasos altamente insaturados, esta reacción se ve favorecida debido a la alta reactividad de los grupos metilenos adyacentes a los dobles enlaces. Los radicales libres lipídicos tienden a estabilizarse mediante un reordenamiento interno dando lugar a los dienos conjugados.

Iniciación:



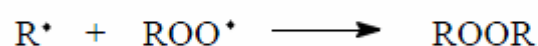
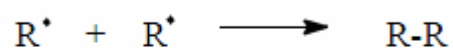
2. PROPAGACIÓN: En esta segunda etapa el radical alquilo libre formado (R^\bullet) se combina con el oxígeno para formar un radical peroxi (ROO^\bullet). Este radical, a su vez, puede sustraer un átomo de hidrógeno de otro carbono alílico de otro ácido graso insaturado para formar un hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical libre.

Propagación:



3. TERMINACIÓN: La terminación ocurre cuando dos radicales libres (R^\bullet) reaccionan entre sí generando productos no reactivos y más estables, como por ejemplo las cetonas. Otra vía de terminación de la autooxidación es aquella en que cualquier clase de radical libre alquílico (R^\bullet) reaccione con un radical libre peroxi (ROO^\bullet) dando lugar a una especie relativamente estable, no-iniciadora y no-propagadora. De forma similar dos radicales libres alquílicos ROO^\bullet pueden unirse también (De Man, 1999), como se muestra en las siguientes reacciones:

Terminación:



Los productos primarios de la autooxidación son los hidroperóxidos. Éstos se caracterizan por ser compuestos inestables que se descomponen en los productos secundarios de la oxidación: compuestos carbonílicos, hidrocarburos, furanos sustituidos, alcoholes, aldehídos (malondialdehído, nonanal, octanal, pentanal y hexanal), entre otros (Lewis-McCrea & Lall 2007). Estos compuestos son los responsables de la rancidez organoléptica en los alimentos (Pike, 2003) y representan una pérdida significativa de calidad, debido al descenso del contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Aidos *et al.*, 2003b).

Los métodos de determinación de la oxidación lípídica se dividen en aquéllos que miden los productos primarios y aquéllos que miden los productos secundarios (Melton 1983; Gray *et al.*, 1996). Entre los productos primarios de la oxidación que se miden se encuentran los hidroperóxidos y los dienos conjugados. Los peróxidos se descomponen fácilmente en productos secundarios, por lo que es mejor evaluar también los productos secundarios como los aldehídos, con métodos como el de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB).

Existen varios factores que modulan la autooxidación y el grado de rancidez oxidativa, tanto intrínsecos, propios del tejido, o extrínsecos, provenientes del ambiente y condiciones que rodean al alimento. Uno de los más importantes es la temperatura de almacenamiento. La velocidad de las reacciones de oxidación aumenta con incremento de temperatura. Por el contrario, al bajar la temperatura al alimento se reducen las reacciones de oxidación de lípidos mediante la inmovilización de agentes catalíticos y el retardo de los cambios de post-sacrificio (Hultin, 1994). También la naturaleza del ácido graso y su grado de insaturación afectan a la oxidación de lípidos en el pescado. Cuanto mayor sea el grado de insaturación del ácido graso, mayor será la probabilidad de que se produzca la autooxidación (Harris & Tall, 1999). Finalmente, la presencia de metales de transición (como el hierro o el cobre), ya sean de la composición del pescado, provenientes del agua o equipos de proceso, pueden acelerar las reacciones de oxidación, al funcionar como activadores primarios de uno de los sustratos de la oxidación de lípidos en el pescado, el oxígeno molecular.

III. Aplicaciones de las envueltas comestibles en pescados y otros productos de origen marino congelados

Los factores más importantes que determinan la vida útil de los productos de origen marino incluyen la autólisis, causada por enzimas autolíticas, la actividad metabólica de los microorganismos y la oxidación. El deterioro autolítico depende de parámetros como el pH, la disponibilidad de oxígeno y las condiciones fisiológicas del pescado antes de su captura. El contenido en grasa de los animales marinos puede variar desde un 1% (ej.: bacalao, abadejo) hasta un 30% (ej.: arenque, caballa). Los productos con un alto contenido graso presentan una mayor tendencia a enranciarse, debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, lo que provoca la aparición de la rancidez en las características organolépticas del producto. Por tanto, disminuyendo el contacto entre el producto y el oxígeno se puede reducir el grado de deterioro autolítico, a la vez que se inhibe el crecimiento de microorganismos aerobios, como bacterias relacionadas con los procesos de putrefacción (Huss *et al.*, 1995) y se controlan los procesos de enranciamiento.

Las reacciones de deterioro que tienen lugar durante el almacenamiento de los alimentos congelados son principalmente de naturaleza química, incluyendo la degradación de vitaminas y pigmentos, la oxidación lipídica y la desestabilización de proteínas (Petersen *et al.*, 1999). En consecuencia, los requerimientos de los materiales de envasado para productos congelados incluyen propiedades de barrera a la luz y al oxígeno para proteger frente a la oxidación. Por otro lado, la pérdida de humedad puede provocar la aparición de quemaduras de congelación (por sublimación), empeora la apariencia visual

del producto y puede llevar a pérdidas de peso del producto inaceptables (Petersen *et al.*, 1999). Por este motivo, se requiere una elevada barrera al vapor de agua por parte de los envases para reducir la pérdida de humedad y con ello la aparición de quemaduras por congelación (Robertson, 1993; Christophersen *et al.*, 1992; Bak *et al.*, 1999).

Por lo tanto los requerimientos críticos para los envases de pescado congelado estarían relacionados con tres propiedades: barrera de humedad, barrera para el oxígeno y protección mecánica (Haugaard *et al.*, 2001).

Dentro de los problemas involucrados en la pérdida de calidad del pescado se encuentran la pérdida de humedad, la oxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas y, consecuentemente, la reducción de la capacidad de retención de agua, y el deterioro de textura, aroma, sabor y color. De acuerdo con Gennadios *et al.* (1997), la aplicación de recubrimientos comestibles al pescado y productos pesqueros podría ser de gran ayuda en la mejora de la calidad de los mismos por las siguientes razones:

- A. Las envueltas comestibles con buenas propiedades barrera podrían ayudar a solucionar el problema de la pérdida de humedad que se produce durante el almacenamiento del pescado, fresco o congelado. Esta pérdida provoca cambios en la textura, flavor y color, a la vez que reduce el peso del producto para la venta.
- B. Los envases comestibles pueden retener los jugos, previniendo los exudados y mejorando la presentación de los productos, eliminando a su vez la necesidad de utilizar sustancias absorbentes en, por ejemplo, las bandejas con filetes.

- C. Envueltas con baja permeabilidad al oxígeno podrían reducir la oxidación lipídica causante del enranciamiento y la alteración del color debida a la oxidación de los pigmentos.
- D. La aplicación de envueltas calentadas podrían reducir la carga microbiana e inactivar parcialmente las enzimas proteolíticas presentes en la superficie del alimento.
- E. Podrían limitar las pérdidas de compuestos volátiles o evitar la captación de aromas indeseables.
- F. Podrían utilizarse envueltas comestibles activas, que transportasen sustancias beneficiosas como antioxidantes o antimicrobianos, que mejorasen la calidad y vida útil de los productos.
- G. Finalmente, también podrían mejorar el valor nutricional de los alimentos al reducir la cantidad de aceite que absorbe el producto durante la fritura.

Por otro lado, hay que tener en cuenta las posibles desventajas de los envases proteicos para ese tipo de productos. Por una parte, las proteínas de la envuelta pueden ser susceptibles a las enzimas proteolíticas presentes en los alimentos. Además en términos de aceptación por parte del consumidor y requisitos de etiquetado, deben tenerse en cuenta posibles reacciones adversas frente a algunas proteínas con potencial alergénico como las proteínas de leche, huevo, cacahuete y soja, entre otras (Gennadios *et al.*, 1997).

Los recubrimientos y películas comestibles elaborados a partir de polisacáridos (quitosano, goma xantán), lípidos (monoglicéridos acetilados) y proteínas (gelatina, proteínas de lactosuero, soja, albúmina, gluten) se han

aplicado con éxito para prolongar la vida útil y mantener la calidad de diversos productos de la pesca y acuicultura refrigerados y congelados (*Tabla 1.1*).

Tabla 1.1. Aplicaciones recientes de envueltas comestibles a diversos productos de la pesca y la acuicultura refrigerados y congelados.

Conservación	Producto	Base polimérica	Otros	Referencia
Refrigeración	Camarón	Quitosano		Simpson <i>et al.</i> , 1997
	Tilapia	Gelatina	Ác. benzoico	Ou <i>et al.</i> , 2001
	Arenque/Bacalao	Quitosano		Jeon <i>et al.</i> , 2002
	Sardinas ahumadas	Gelatina Quitosano	Orégano / romero	Gómez-Estaca <i>et al.</i> , 2007
	Salmón atlántico	Quitosano		Souza <i>et al.</i> , 2010
	Trucha arcoiris	Quitosano	Aceite de canela	Ojagh <i>et al.</i> , 2010
Congelación	Salmón plateado	Monoglicéridos acetilados Caseinatos		Hirasa, 1991
	Salmón real	Caseína-monoglicéridos acetilados Proteínas de lactosuero		Stuchell & Krotcha, 1995
	Salmón rosado	Quitosano Ovoalbúmina Conc. proteico de soja Harina de pescado		Sathivel, 2005
	Salmón rosado	Proteínas de lactosuero Proteínas de soja Proteínas de fletán del Pacífico		Ambardekar, 2007
	Salmón rosado	Quitosano		Sathivel <i>et al.</i> , 2007
	Salmón rosado	Hidrolizado proteico de la piel de abadejo		Sathivel <i>et al.</i> , 2008
	Carpa plateada	Quitosano		Fan <i>et al.</i> , 2009
	Trucha arcoiris	Gluten Goma xantán Harinas de trigo y maíz		Kilincceker <i>et al.</i> , 2009
Refrig. y Cong.	Bacalao largo	Quitosano	Vitamina E	Duan <i>et al.</i> , 2010

Lípidos:

Glicéridos y glicéridos acetilados

Se ha estudiado el recubrimiento de filetes de salmón plateado mediante inmersión en disoluciones de monoglicéridos acetilados (Myvacet, marca comercial de un preparado a partir de grasa vegetal hidrogenada), obteniéndose menores pérdidas de humedad e inferiores valores de peróxidos en comparación con los filetes control no recubiertos, durante el almacenamiento en congelación a -10 °C (Hirasa, 1991). Tras 10 semanas en congelación, el contenido en humedad relativa de las muestras envueltas sólo disminuyó hasta un 97%, mientras que en las muestras control descendió hasta un 83,4%. Sin embargo, el tratamiento con los monoglicéridos acetilados no es tan efectivo como el envasado a vacío en bolsas plásticas a la hora de reducir la pérdida de humedad y retardar la oxidación lipídica. También se estudió la eficacia de recubrimientos compuestos elaborados con Myvacet, caseinato cálcico e hidroxipropilmetilcelulosa en el salmón congelado (Hirasa, 1991). Las muestras recubiertas presentaron contenidos de humedad ligeramente superiores a las no recubiertas, pero valores similares de hidroperóxidos. Las envueltas con caseinato sódico fueron más flexibles, pero a su vez más permeables al oxígeno y al vapor de agua que las envueltas elaboradas con Myvacet exclusivamente.

Stuchell & Krotcha (1995) estudiaron los efectos de envueltas preparadas con monoglicéridos acetilados exclusivamente o con aislado de proteína de lactosuero, sobre la pérdida de humedad y la oxidación lipídica, en filetes de salmón real almacenadas a -23 °C. Tanto aplicados solos como con

aislado de lactosuero, redujeron la tasa de pérdida de humedad a un 42-65%, durante las 3 primeras semanas de almacenamiento en congelación. Además, el inicio de la oxidación lipídica fue retrasado en el tiempo y los valores de peróxido encontrados fueron menores.

Polisacáridos:

Almidón y derivados del almidón

En los años 60, se comercializaron envueltas comestibles elaboradas con almidones hidroxipropilados bajo la marca comercial Ediflex (Anon., 1967). Estos envases se idearon para su uso en carne congelada, aves y pescado. Se caracterizaban por ser flexibles, transparentes, impermeables al oxígeno y solubles en agua. Presumiblemente, estas películas protegerían los productos durante el almacenamiento en congelación y se disolverían durante el descongelado y cocinado. Sin embargo no se han encontrado estudios científicos que demuestren la eficacia de los almidones hidroxipropilados como protectores de los alimentos congelados (Gennadios *et al.*, 1997).

Alginatos

Durante los años 50 se comercializó en Noruega un proceso en el que pescados grasos congelados como la caballa o el arenque eran protegidos de la rancidez oxidativa mediante la aplicación de recubrimientos de alginatos gelificados con cationes calcio (Glicksman, 1969).

Earle & Snyder (1966) también desarrollaron un método para proteger productos de origen marino de la deshidratación y la oxidación lipídica durante el almacenamiento en congelación, utilizando dispersiones acuosas de

alginato sódico y almidón o dextrinas, e incorporando también aceite vegetal a la mezcla para mejorar los resultados. Productos como las gambas o la caballa tratados con este método mantuvieron su textura, color y flavor originales durante 3 meses almacenados en congelación.

También se han aplicado envueltas elaboradas con alginatos comerciales (Flavor-Tex) sobre el salmón plateado y el pargo colorado congelados a -18 °C (Ijichi, 1978), obteniéndose una menor oxidación lipídica y menores pérdidas por goteo en comparación con los controles no envueltos. En términos de pérdida de humedad, no se encontraron diferencias significativas entre las piezas envueltas y las glaseadas con agua.

Carragenatos

Se ha estudiado el empleo de carragenatos para prolongar la vida útil de pescados grasos durante su almacenamiento en congelación (Stoloff *et al.*, 1948). Filetes de caballa se recubrieron por inmersión en soluciones acuosas de carragenato, que evitaron cambios sensoriales importantes durante 5 meses a -18 °C, mientras que los controles sin envuelta fueron inaceptables para el consumo tras sólo 3 meses. También se realizaron pruebas adicionando ajo o ácido ascórbico a las envueltas de carragenato, retrasando el deterioro hasta el séptimo u octavo mes de almacenamiento en congelación.

Dextrano

Envueltas de dextrano aplicadas en forma de disoluciones acuosas o dispersiones se han utilizado para recubrir gambas sin pelar (Toulmin, 1956a),

peladas (Toulmin, 1956b) y pescado (Novak, 1957) para preservar su flavor, color y frescura durante el almacenamiento en refrigeración o en congelación.

Quitosano

La utilización del polisacárido quitosano (obtenido de la desacetilación de la quitina, elemento estructural del exoesqueleto de los crustáceos), mejora el rendimiento de los filetes de pescado (salmón rosado), a la vez que también reduce la pérdida de humedad y retrasa la oxidación lipídica (Sathivel, 2005). Además, se han obtenido mejores rendimientos, al compararlos con el glaseado con agua que se realiza normalmente en este tipo de productos (Sathivel *et al.*, 2007).

También se ha estudiado el empleo conjunto de quitosano y vitamina E o quitosano y aceite de pescado para el recubrimiento de filetes de bacalao durante 3 semanas y tres meses en congelación (-20 °C). Las envueltas quitosano-aceite reducen significativamente los valores de oxidación (SRATB) y las pérdidas por goteo, a la vez que mejoran el perfil lipídico del pescado. Sin embargo, disminuye el pH y contenido de humedad de las muestras recubiertas. La adición de vitamina E parece no mejorar el efecto antioxidante de la envuelta de quitosano únicamente (Duan *et al.*, 2010).

Finalmente, la aplicación de recubrimientos de quitosano mantiene la calidad y prolonga la vida útil durante el almacenamiento en frío (-3 °C/30 días) de la carpa plateada (Fan *et al.*, 2009) y de salmón del Atlántico refrigerado (0 °C/18 días) (Souza *et al.*, 2010).

Proteínas:

Se ha comentado anteriormente la aplicación de recubrimientos que combinan monoglicéridos con caseinatos (Hirasa, 1991) o con aislado proteicos de lactosuero (Stuchell & Krotcha, 1995) en piezas de salmón real congelado. Tras la aplicación de las envueltas de aislado de lactosuero se pulverizó un antioxidante (ácido ascórbico y cítrico) sobre las piezas, como resultado, se retrasó la oxidación lipídica (valores de peróxidos), pero la pérdida de humedad no se vio afectada por la aplicación de las envueltas sobre el salmón real congelado (Stuchell & Krotcha, 1995).

Como se señaló anteriormente, los recubrimientos elaborados a partir de monoglicéridos acetilados reducen la pérdida de humedad y retrasan la oxidación lipídica del pescado congelado; además se ha observado que si se combinan con caseinatos son más flexibles aunque más permeables al oxígeno (Hirasa, 1991; Stuchell & Krotcha 1995).

El empleo de envueltas elaboradas a partir de proteínas de soja y ovoalbúmina en filetes de salmón rosado almacenados a -20 °C durante 3 meses retrasan la oxidación lipídica en comparación con los filetes control no envueltos (Sathivel, 2005). También recubrimientos elaborados con proteína de soja e hidrolizados proteicos de fletán del Pacífico reducen la oxidación lipídica en filetes de salmón rosado congelado a -30 °C durante tres meses (Ambardekar, 2007).

Cuando se aplican envueltas elaboradas a partir de hidrolizados proteicos de abadejo a piezas de salmón rosado almacenadas a -35 °C durante 4 meses, los filetes presentan mayores rendimientos y un valor de oxidación

(SRATB) significativamente inferior si los comparamos con los controles no envueltos (Sathivel *et al.*, 2008). En ese trabajo, se elaboraron tres tipos de hidrolizados en función del tiempo de hidrólisis: 10, 30 o 45 minutos, obteniéndose los mejores resultados con la envuelta de 45 minutos.

Capítulo 2 Justificación y objetivos

Como se ha comentado a lo largo de la introducción, los recubrimientos comestibles ofrecen una interesante alternativa a los sistemas de envasado tradicionales, aportando mejoras tanto a nivel medioambiental, tecnológico o nutritivo en la conservación de alimentos congelados.

Por otro lado, existe un gran interés por la utilización de proteínas, tanto de origen vegetal como animal, en la elaboración de envases comestibles, debido, por un lado, de su capacidad para formar redes poliméricas cohesivas con una elevada variedad de interacciones moleculares, de sus propiedades antioxidantes y de su elevada disponibilidad, y por otro lado, de la búsqueda de nuevas aplicaciones para la revalorización de los productos proteicos, algunos de ellos derivados incluso de la propia industria alimentaria.

Diversos recubrimientos comestibles elaborados a partir de polisacáridos, compuestos lipídicos o proteínas, han sido aplicados con éxito a la hora de prolongar la vida útil y mantener la calidad de diversos productos de la pesca y acuicultura refrigerados y congelados. Sin embargo, no se tiene constancia de la realización de ningún estudio de estas características en el salmón del Atlántico. Los trabajos realizados hasta la fecha se han efectuado en especies de salmones del Pacífico, con un contenido lipídico inferior al 2%, por lo que la protección por parte de los recubrimientos proteicos de un pescado graso, como el salmón del Atlántico, podría ser diferente. Así pues, la ausencia de estudios sobre recubrimientos en un producto de gran consumo y valor como el salmón del Atlántico origina la necesidad de investigar la eficacia de diversas formulaciones en este alimento.

A pesar de la existencia de ciertos trabajos sobre la aplicación de recubrimientos proteicos en pescado congelado, diversos factores involucrados en la elaboración tales como el momento de la aplicación del recubrimiento (sobre el pescado fresco o ya congelado), el efecto de la adición de distintos plastificantes en diferentes proporciones, o la aplicación de diferentes tratamientos tecnológicos (térmicos, físicos o enzimáticos), prácticamente no han sido estudiados. En este sentido, la adición de plastificantes es una de las posibles maneras de mejorar las propiedades mecánicas de los recubrimientos. Por tanto, resulta de gran interés determinar el efecto del tipo y concentración del plastificante en la formulación ya que al modificarse las fuerzas moleculares en la matriz estructural también se puede afectar significativamente su funcionalidad de barrera a la transferencia de masa. Por otro lado, se ha descrito la efectividad de diversos tratamientos tecnológicos (empleo de ultrasonidos, adición de transglutaminasa), los cuales favorecen las modificaciones estructurales y/o el entrecruzamiento de las matrices poliméricas, dando lugar a biopolímeros con propiedades funcionales mejoradas. Por tanto, resulta interesante establecer posibles tratamientos a aplicar durante el proceso de elaboración de las envueltas que supongan una mejora de las características del recubrimiento, como posibilidad de sustituir al tratamiento tecnológico convencional que es el calentamiento y estudiar las posibles mejoras que estos otros métodos puedan aportar.

Así pues, parece de gran interés desarrollar recubrimientos proteicos comestibles que constituyan una alternativa de mayor sostenibilidad medioambiental frente al envasado con materiales sintéticos y a su vez revaloricen los productos proteicos empleados; con el objetivo de prolongar la vida útil y mantener la calidad de un alimento de gran consumo, buenas

propiedades nutritivas y creciente valor comercial, como es el salmón del Atlántico congelado.

En respuesta a todo lo mencionado anteriormente, los dos objetivos principales del presente estudio fueron:

Evaluar los efectos de diversos recubrimientos comestibles con base proteica en diferentes parámetros de calidad de filetes de salmón del Atlántico congelado.

Evaluar los efectos de la aplicación de diversos tratamientos tecnológicos [enzimáticos (transglutaminasa) y físicos (ultrasonificación o tratamiento térmico)] durante la elaboración de los recubrimientos en los parámetros de calidad de filetes de salmón del Atlántico congelado.

Para alcanzar los objetivos principales se abordaron los siguientes objetivos parciales para la elaboración de los recubrimientos:

- *Conocer el efecto de recubrimientos obtenidos a partir de diferentes proteínas: proteínas de lactosuero, ovoalbúmina y proteínas de soja.*
- *Comprobar la influencia del tipo de plastificante (glicerol o sorbitol) y su concentración (diferentes relaciones proteína/plastificante).*
- *Determinar el efecto del momento de aplicación del recubrimiento (antes o después de la congelación del pescado).*
- *Conocer las diferencias entre la aplicación del calentamiento y de la ultrasonificación en la elaboración de los recubrimientos, con o sin adición de transglutaminasa en ambos casos.*
- *Estudiar el efecto del tiempo de aplicación de la ultrasonificación en la elaboración de los recubrimientos.*

Capítulo 3 Material y métodos

× Materiales

3.1. Aparatos de laboratorio

La destilación del agua, necesaria para realizar las extracciones y para las disoluciones acuosas, se realizó en un aparato “Millipore” modelo Rios 5.

Las pesadas de precisión se realizaron en una balanza analítica de “A & D Instruments” modelo HR-120. Para las pesadas ordinarias se empleó una balanza electrónica “Heraeus” modelo ADP 360.

La carne obtenida de los salmones se trituró en una picadora “Moulinex”.

La homogenización de las muestras y su mezcla con disolventes para diversas determinaciones se efectuaron en un aparato Polytron mod. 15/30 PT, dotado de un vástago modelo PTA 20 TS (Kinematica Ag Littan-Luzern).

El pH de las muestras de carne fue medido con un medidor de pH “Crison” mod. GLP-21 y un electrodo de penetración “Hanna instruments”.

El envasado a vacío de las piezas de salmón para la determinación de pérdidas por goteo y cocinado se realizó en una envasadora “Stephan Alval” mod. 190.

El cocinado de las muestras para una parte del análisis sensorial se realizó con un microondas doméstico Moulinex FM2530Q (850 W).

El hielo empleado para el baño hielo-agua necesario para el enfriamiento de las muestras en diversas determinaciones lo proporcionó la máquina de hielo “Servamatic”.

La lectura de las absorbancias en las determinaciones de hidroperóxidos y del índice SRATB se obtuvieron en un espectrofotómetro “Zuzi” mod. UV- 4210.

En la determinación del extracto seco se empleó una estufa “Indelab”.

Para la determinación de cenizas se empleó un horno mufla “Heraeus” electronic.

Para determinar los parámetros físicos de color se empleó un espectrocolorímetro marca “X-Rite”, modelo SP60.

La centrifugación, necesaria para la extracción de la grasa de las diversas muestras y para la determinación de hidroperóxidos, se realizó en una centrífuga refrigerada “Hettich”, modelo Universal 16R equipada con un rotor angular modelo TT1616.

Las muestras se conservaron en frigoríficos “Lynx” y arcones de congelación “Superser” y “Lynx”, a una temperatura de -20 °C, y “Liebherr” a -10 °C.

Los tratamientos con ultrasonidos de las disoluciones de ciertos recubrimientos se realizaron en un baño de ultrasonidos digital de la marca Bandelin, modelo Sonorex Digital DK512 P (frecuencia de 35 kHz) con una potencia de ultrasonidos de 820 W.

Se ha utilizado también material general de laboratorio: desecadores, baños termostatzados, agitadores, pinzas, tijeras, etc.

3.2. Reactivos, disolventes y gases

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo fueron de calidad analítica, suministrados por Panreac, Fluka y Sigma.

El nitrógeno utilizado para evaporar el disolvente orgánico fue suministrado por *Air Liquide*.

3.3. Material biológico

3.3.1 Salmón del Atlántico

Los salmones del Atlántico (especie *Salmo salar*) utilizados en los experimentos procedían de una granja de cría en cautividad de Noruega y fueron adquiridos en el mercado local.

3.3.2 Productos proteicos

Para la elaboración de los recubrimientos comestibles, se utilizaron productos comerciales en polvo de tres tipos de proteínas (proteínas de lactosuero, de soja y ovoalbúmina):

1. Concentrado de proteínas del lactosuero (CPS): El producto empleado fue “Protarmor 800”, de Armor Protéines (Francia), un concentrado de proteínas del lactosuero con un contenido proteico del 80% y una composición proteica donde la β -lactoglobulina es la mayoritaria (*Tabla 3.1* y *Tabla 3.2*).

Tabla 3.1. Composición química de “Protarmor 800”

Composición	
<i>Humedad (%)</i>	4,0
<i>Proteína (%)</i>	80,0
<i>Grasa (%)</i>	3,5
<i>Cenizas (%)</i>	3,5
<i>Lactosa (%)</i>	9,0
<i>pH (disolución 10% p/v)</i>	6,5

**Tabla 3.2. Composición proteica
de “Protarmor 800”**

Proteínas	%
<i>β-lactoglobulina</i>	63
<i>α-lactoalbúmina</i>	11
<i>Inmunoglobulina G</i>	4
<i>BSA</i>	3
<i>Glucomacropéptido</i>	3
<i>Lactoferrina</i>	1
<i>Otras</i>	15

2. Aislado de proteínas del lactosuero (APS): El producto empleado fue “Isolate whey 90”, de Armor Protéines (Francia), que tenía un contenido proteico mínimo del 90% (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Composición química de “Protarmor Isolate whey 90”

Composición	
<i>Humedad (%)</i>	4,5-5,5
<i>Proteína (%)</i>	91,0
<i>Grasa (%)</i>	0,5
<i>Cenizas (%)</i>	<3
<i>Lactosa (%)</i>	2,0
<i>pH (dis.10% p/v)</i>	6-6,5

3. Concentrado de proteínas de soja (SOJA): El producto empleado fue “Procon 2100 IP” de The Solae Company (EEUU), un concentrado con un 68% de proteína de soja (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Composición química de “Procon 2100 IP”

Composición	%
<i>Humedad (máx.)</i>	7,5
<i>Proteína (mín.)</i>	68,0
<i>Grasa (máx.)</i>	1,5
<i>Cenizas (máx.)</i>	7,5

4. Proteínas de huevo (OVO): El producto empleado fue un preparado comercial de ovoalbúmina purificada con el 80% de proteína de Eurovo (Italia) (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Composición química de “Eurovo ovoalbúmina purificada”

Composición	%
<i>Humedad (máx.)</i>	8,0
<i>Proteína (mín.)</i>	80,0
<i>Grasa (máx.)</i>	1,2
<i>Carbohidratos</i>	<0,1

3.3.3 Transglutaminasa

Finalmente, para la modificación enzimática de ciertas envueltas se utilizó la enzima transglutaminasa de origen microbiano del producto comercial ACTIVATM WM (Ajinomoto Co.), conteniendo 1% de enzima y 99% de maltodextrina (estabilizante), la cual se obtuvo de Impex Química S.A. (Barcelona). Según el fabricante la actividad enzimática de ACTIVA WM es de 100 U/g (U: cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto).

× **Metodología**

3.4. Preparación de los filetes de salmón:

Los salmones (*Salmo salar*) se adquirieron ya eviscerados y descabezados, siendo conservados en hielo hasta su posterior utilización. Una vez en el laboratorio, a los especímenes se les retiró manualmente la piel, y con ayuda de un bisturí, se cortó cada ejemplar en dos lomos siguiendo el eje céfalo-caudal, retirándoseles también la espina central y la aleta caudal. Posteriormente se filetearon en piezas de unos 180-200 g quedando así preparados para su posterior utilización.

3.5. Preparación de las envueltas:

3.5.1 Preparación de las envueltas con distinta base proteica

En base a la bibliografía consultada y a pruebas preliminares se procedió a la selección de ciertas variables (concentración de proteína en la disolución, tipo de plastificante y proporción del mismo, tratamiento térmico de desnaturalización empleado, pH y realización o no de filtración) para la preparación de las formulaciones de los recubrimientos.

Las envueltas que se aplicaron sobre el pescado congelado se prepararon a partir de disoluciones acuosas de los distintos tipos de proteínas, con dos proporciones de dos plastificantes (glicerol y sorbitol) o sin su adición, ajustando el pH en función del tipo de proteína y con diferentes tratamientos térmicos según el caso (*Tabla 3.6*). En ningún caso fue necesario

realizar la filtración de las soluciones. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Tabla 3.6. Parámetros en la elaboración de las envueltas

TIPO PROTEÍNA	%PROT	pH	PLASTIFICANTE	(PROT/PLAST)	TRATAMIENTO
CPS	8%	SIN AJUSTE	SIN	-	TÉRMICO (80 °C/30min)
			SORBITOL	1:1	
			SORBITOL	2:1	
			GLICEROL	1:1	
			GLICEROL	2:1	
OVO	7,2%	10,5	SIN	-	TÉRMICO (45 °C/20min)
			SORBITOL	1:1	
			SORBITOL	2:1	
			GLICEROL	1:1	
			GLICEROL	2:1	
SOJA	3,1%	10	SIN	-	TÉRMICO (70 °C/20min)
			SORBITOL	1:1	
			SORBITOL	2:1	
			GLICEROL	1:1	
			GLICEROL	2:1	

De manera general el protocolo seguido en la elaboración de estas envueltas se representa en la *Figura 3.1*.

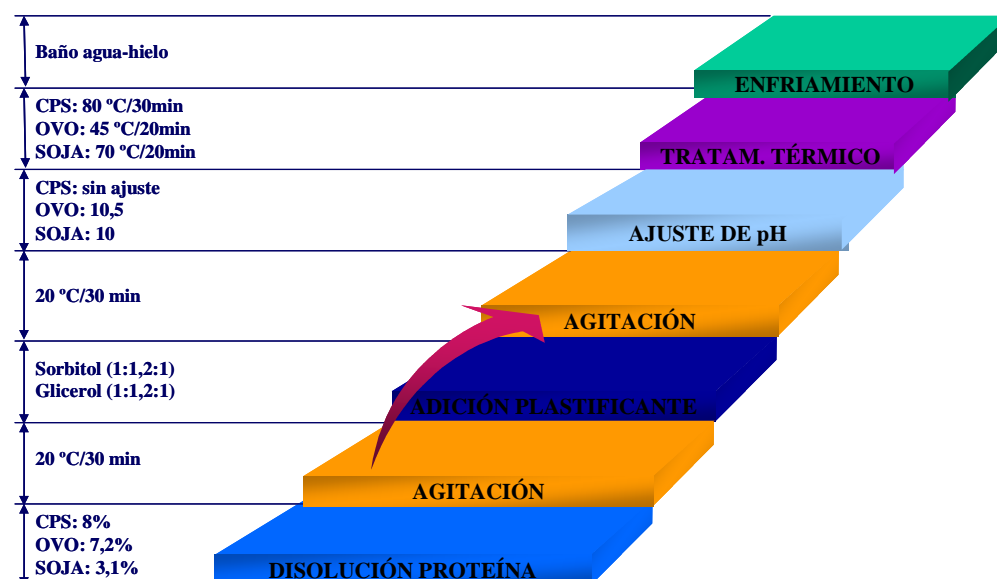


Figura 3.1. Representación del protocolo de elaboración de las envueltas para el estudio del empleo de recubrimientos de distinta base proteica.

1. Envueltas con proteína de lactosuero (CPS):

Se prepararon soluciones acuosas con una concentración del 8% de proteína (p/p). Una vez disuelta la proteína mediante agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 °C), se adicionó el plastificante correspondiente en la proporción prevista, procediéndose a continuación a su agitación durante otros 30 minutos. En el caso de las soluciones sin plastificante, éstas se agitaron durante un tiempo total de una hora. El pH de las soluciones era de 6,1-6,2. Posteriormente, todas las disoluciones, se sometieron a un tratamiento térmico de 80 °C durante 30 minutos, seguido de un enfriamiento en un baño agua-hielo, para detener el efecto del tratamiento térmico.

2. Envueltas con proteína de huevo (ovoalbúmina):

La concentración de estas soluciones fue del 7,2% de proteína (p/p). Una vez disuelta la proteína mediante agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 °C), se procedió a la adición y posterior agitación (otros 30 min.) para la correcta disolución del plastificante. En el caso de las soluciones sin plastificante, éstas se agitaron durante un tiempo total de una hora. Posteriormente se ajustó su pH a 10,5 mediante NaOH 1M y se sometieron a un tratamiento térmico de 45 °C durante 20 minutos, seguido de un enfriamiento (baño de agua-hielo).

3. Envueltas con proteína de soja:

Se prepararon soluciones acuosas con una concentración del 3,1% de proteína (p/p). Una vez disuelta la proteína [tras 30 minutos de agitación a temperatura ambiente (20 °C)], se adicionó el plastificante y se agitó de nuevo otros 30 minutos hasta su correcta disolución. En el caso de las soluciones sin plastificante, éstas se agitaron durante un tiempo total de una hora. A continuación, se procedió al ajuste del pH a 10 mediante NaOH 1M, sometiéndose a continuación a un tratamiento térmico de 70 °C durante 20 minutos y posterior enfriamiento en un baño de agua-hielo.

3.5.2 Preparación de envueltas de proteínas de lactosuero sometidas a tratamientos físicos y enzimáticos

Se realizaron dos grupos de experimentos aplicando diversos tratamientos (calentamiento, ultrasonicación y adición de transglutaminasa) a las soluciones proteicas para desarrollar el segundo objetivo principal de este trabajo.

En el primer grupo de experimentos, para la preparación de las envueltas de proteínas de lactosuero (a partir de concentrado y aislado) sometidas a diversos tratamientos (calentamiento, ultrasonicación y adición de transglutaminasa), se seleccionaron las condiciones descritas en la *Tabla 3.7*. El tratamiento térmico se realizó en un baño de agua. El tratamiento con ultrasonidos se efectuó en un baño de ultrasonidos al 50% de su potencia máxima, el cual generó una onda ultrasónica con una potencia de 20,8 W, determinada por calorimetría de acuerdo con el método descrito por Kimura *et al.* (1996). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Tabla 3.7. Tratamientos y condiciones aplicadas a las soluciones de CPS y APS

TIPO DE TRATAMIENTO	PARÁMETROS
SIN TRATAR	-
TÉRMICO	80 °C/30min
FÍSICO (ultrasonicación)	50% potencia/30 min
TÉRMICO+ENZIMÁTICO	80 °C/30min+10 unidades TG/g proteína
FÍSICO+ENZIMÁTICO	50% potencia/30 min+10 unidades TG/g proteína

El procedimiento seguido se representa en el siguiente diagrama (Figura 3.2).



Figura 3.2. Representación del método de preparación de las envueltas para el estudio del efecto de diversos tratamientos en los recubrimientos de proteínas de lactosuero.

Las envueltas se prepararon a partir de disoluciones acuosas de concentrado (CPS) o aislado (APS) de proteínas de lactosuero a temperatura ambiente (20 °C). En todos los casos, la concentración de estas soluciones fue del 8% de proteína (p/p) y el plastificante utilizado el glicerol en una proporción de 2:1. El pH de las disoluciones se ajustó a 7 mediante NaOH 1M. Una vez preparadas, 150 g de cada disolución se pasaron a matraces Erlenmeyer de 250 ml y se les aplicó un tratamiento térmico (80 °C/30 minutos)

o un tratamiento físico (ultrasonicación: 50%/30 minutos). En cualquiera de los casos, tras el tratamiento, las disoluciones se enfriaron en un baño de agua-hielo. Posteriormente, se aplicó el tratamiento enzimático mediante la adición de transglutaminasa microbiana o no, según el caso. Tanto las disoluciones con o sin transglutaminasa se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente (20 °C), refrigerándose a continuación para su posterior utilización.

En el segundo grupo de experimentos, se elaboraron envueltas proteicas de lactosuero sometidas a tratamientos de ultrasonicación de diferente duración a una misma potencia (50% de la potencia máxima del equipo), según describe la *Tabla 3.8*.

Tabla 3.8. Diversos tratamientos de ultrasonicación testados (distintos tiempos a la misma potencia (50%).

TIEMPO ULTRASONICACIÓN	POTENCIA
0 min. (SIN TRATAR)	-
1 minuto	50%
15 minutos	50%
60 minutos	50%

El procedimiento seguido para la preparación de las muestras para el estudio de la aplicación de distintos tiempos de ultrasonicación a las envueltas proteicas de lactosuero aplicadas al salmón congelado, se representa en la *Figura 3.3*.

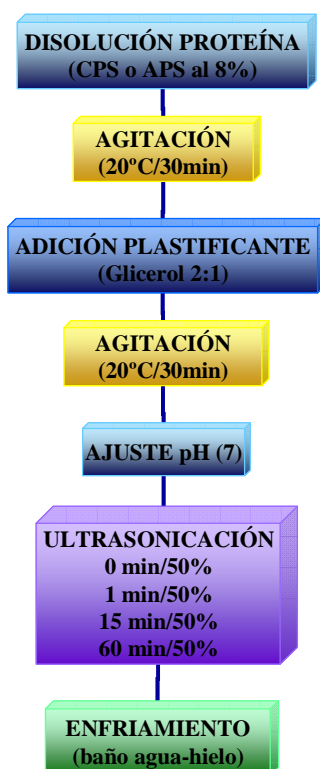


Figura 3.3. Representación del método de preparación de las envueltas para el estudio del efecto de la ultrasonificación en recubrimientos de proteínas de lactosuero.

Las envueltas se prepararon a partir de disoluciones acuosas de concentrado (CPS) o aislado (APS) de proteínas de lactosuero a temperatura ambiente (20 °C). En todos los casos, la concentración de estas soluciones fue del 8% de proteína (p/p) y el plastificante utilizado el glicerol en una proporción de 2:1. El pH de las disoluciones se ajustó a 7 mediante NaOH 1M. Una vez preparadas las disoluciones, se tomaron alícuotas (150 g) en matraces Erlenmeyer de 250 ml y, se les aplicó un tratamiento de ultrasonificación a distintos tiempos (0, 1, 15, 60 minutos) a la misma potencia (50%).

Posteriormente, las disoluciones se enfriaron en un baño con agua-hielo para su posterior utilización.

3.6. Aplicación de las envueltas, almacenamiento, descongelación, procesado y determinaciones

El procedimiento seguido para la aplicación de las envueltas, su almacenamiento en congelación, descongelación y procesado, se representa en la *Figura 3.4*. Así mismo también se muestran los distintos momentos a lo largo del proceso en los que se realizaron las determinaciones.



Figura 3.4. Representación del procedimiento de aplicación de las envueltas, almacenamiento, descongelación, procesado y momentos de la realización de determinaciones analíticas (indicados con números).

Una vez preparados los filetes de salmón, la aplicación de las envueltas se llevó a cabo en todos los casos por el método de inmersión, realizándose ésta antes o después de la congelación, según el caso:

a) *Aplicación de los recubrimientos antes de la congelación:* las piezas de salmón en fresco se sumergieron durante 60 segundos en la disolución, tras lo cual se dejaron escurrir brevemente (15 segundos) y se introdujeron en bolsas plásticas de congelación (zip-lock), procediéndose a continuación a su congelación a -20 °C, en el caso de los estudios de las envueltas con distinta base proteica, o a -10 °C, en los estudios del efecto de distintos tratamientos (térmico, ultrasonicación y enzimático).

b) *Aplicación de los recubrimientos tras la congelación:* las piezas de salmón fresco se introdujeron en bolsas plásticas de congelación y se dejaron en un congelador a -20 °C durante 48 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, los filetes, ya perfectamente congelados, se sumergieron durante 30 segundos en la disolución, tras lo cual se dejaron escurrir brevemente (15 segundos) y se introdujeron en bolsas plásticas de congelación, procediéndose a continuación a su almacenamiento a -20 °C. El menor tiempo de inmersión aquí aplicado responde al intento de evitar una descongelación superficial de los filetes, la cual se producía si se aplicaba durante más tiempo.

Como muestras de referencia o control en todos los estudios, se utilizaron piezas de salmón a las que no se les aplicó ningún tipo de envuelta, denominándose *sin envuelta*.

En el caso de la aplicación de las envueltas tras el congelado en el estudio de las envueltas con distinta base proteica, también se incluyeron

muestras *glaseadas* para su comparación. El glaseado se aplicó también mediante la inmersión de los filetes de salmón congelados en agua destilada refrigerada a 5 °C siguiendo el mismo protocolo empleado en la aplicación de las envueltas proteicas tras la congelación.

Una vez aplicadas las envueltas, las piezas de salmón introducidas en las bolsas de polietileno de congelación se almacenaron en congeladores durante 4 meses, mantenidos a una temperatura de -20 °C, en el caso del estudio de las distintas bases proteicas (CPS, OVO, SOJA) y de -10 °C en el caso del estudio de los distintos tratamientos (calentamiento, adición de transglutaminasa o ultrasonicación) en proteínas de lactosuero (CPS y APS). La conservación a una mayor temperatura en este último caso tendría como objetivo estudiar el comportamiento de las envueltas sobre el salmón en condiciones que promoviesen una mayor oxidación lipídica.

Una vez completado el periodo de almacenamiento, las muestras se sacaron del congelador, dejándose en una cámara frigorífica a 5 °C durante 22 horas para su total descongelación.

Una porción de cada filete descongelado (de unos 30 g) se sometió a un proceso de cocinado (90 °C/5 minutos) y otra porción (de otros 30 g) se reservó para el almacenamiento en refrigeración (5 °C/24 horas).

Las determinaciones realizadas a lo largo del proceso y representadas en la *Figura 3.4* fueron las siguientes:



En el salmón fresco:

- × Determinación del peso inicial de los filetes en fresco
- × Determinación del color y pH inicial
- × Determinación del contenido de extracto seco, cenizas y lípidos del salmón inicial
- × Determinación de los índices de oxidación lipídica del salmón inicial



En el salmón congelado al inicio del almacenamiento en congelación:

- × Determinación del peso inicial de los filetes congelados



En el salmón congelado al término del almacenamiento en congelación:

- × Determinación del peso final de los filetes congelados
- × Determinación del color de los filetes congelados tras el almacenamiento



En el salmón descongelado:

- × Determinación del peso de los filetes descongelados
- × Determinación del color y pH de los filetes descongelados tras el almacenamiento
- × Determinación del contenido de extracto seco, cenizas y lípidos tras el almacenamiento

- × Determinación de los índices de oxidación lipídica tras el almacenamiento



En el salmón descongelado cocinado:

- × Determinación del peso tras el cocinado
- × Determinación del contenido de extracto seco
- × Determinación del color de los filetes cocinados



En el salmón descongelado almacenado en refrigeración:

- × Determinación del peso tras el almacenamiento en refrigeración

3.7. Determinaciones fisicoquímicas

3.7.1 Rendimiento

- **Objetivo:** Determinar los rendimientos (ganancias de peso) de las piezas congeladas tras la aplicación de la envuelta y posterior congelación.
- **Método:** Las piezas de salmón se pesaron en fresco y tras 24 horas de congelación ya con la envuelta. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. El rendimiento se expresa como el porcentaje que supone el peso de la pieza una vez envuelta respecto al peso inicial de la pieza (Sathivel, 2005).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso filete envuelto congelado inicial}}{\text{Peso en fresco sin envuelta}} \times 100$$

3.7.2 Rendimiento tras descongelar

- **Objetivo:** Determinar los rendimientos de las piezas una vez descongeladas.
- **Método:** Las piezas de salmón se pesaron en fresco y tras su descongelación, al cabo de cuatro meses de almacenamiento en congelación. Las piezas congeladas se sacaron del congelador y se mantuvieron en refrigeración (5 °C) durante 22 horas. Transcurrido este tiempo, se sacaron de las bolsas de polietileno y se dejaron en una rejilla durante 2 minutos para eliminar el agua superficial. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. El rendimiento al descongelar se expresa como el porcentaje que supone el peso de la pieza descongelada respecto al peso inicial de la pieza (Sathivel, 2005).

$$\text{Rendimiento tras descongelar (\%)} = \frac{\text{Peso filete envuelto descongelado}}{\text{Peso en fresco sin envuelta}} \times 100$$

3.7.3 Pérdidas por goteo al descongelar

- **Objetivo:** Determinar las pérdidas por goteo de las piezas al descongelarse.
- **Método:** Las piezas de salmón se pesaron congeladas tras el almacenamiento durante cuatro meses y tras su descongelación, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. El cálculo se realiza mediante la expresión descrita por Sathivel (2005), que expresa estas pérdidas como el porcentaje que supone la diferencia de peso entre la pieza congelada tras el almacenamiento y tras descongelarla, respecto al peso congelado.

$$\text{Pérdidas por goteo al descongelar (\%)} = \frac{(\text{Peso filete envuelto cong.} - \text{Peso filete envuelto descong.})}{\text{Peso filete envuelto congelado}} \times 100$$

3.7.4 Pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración

- **Objetivo:** Determinar las pérdidas de líquido por goteo tras el almacenamiento en refrigeración.
- **Método:** Para realizar esta prueba, se aplicó la técnica recomendada por Honikel & Hamm (1994). Se tomaron muestras de los filetes descongelados de unos 30 g aproximadamente, de forma cúbica, estos trozos se atravesaron con un hilo y se introdujeron en una bolsa de polietileno, posteriormente cerrada herméticamente dejando parte del hilo fuera de ésta. Seguidamente, utilizando el hilo como sujeción, se suspenden las bolsas en el interior de una cámara frigorífica a 2°C, donde se dejaron durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se pesaron, secándolas previamente con un papel de filtro pero sin ejercer presión sobre la muestra, para eliminar el agua superficial adherida.

Las pérdidas por goteo se obtienen por diferencia de pesos antes y después del periodo de refrigeración. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresan como el porcentaje de peso perdido respecto al peso inicial de la muestra.

$$\text{Pérdidas por goteo tras almacenamiento (\%)} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso tras refrigeración})}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

3.7.5 Pérdidas por cocinado

- **Objetivo:** Determinar las pérdidas de líquido por goteo tras el cocinado.
- **Método:** Para esta determinación se siguió el procedimiento descrito por Sathivel (2005). Se pesaron muestras de aproximadamente 30 g de filete de salmón descongelado (de forma cúbica) en una balanza de precisión. Una vez pesadas las muestra, se introdujeron en una bolsa de polietileno, posteriormente cerrada a vacío y se sumergieron en un baño con agua a 90 °C durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se enfriaron en un baño de agua-hielo y posteriormente se dejaron atemperar a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se pesaron, secándolas previamente con un papel de filtro, pero sin ejercer presión sobre la muestra. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

El resultado de esta técnica se expresa como el porcentaje que supone el peso perdido en el cocinado respecto del peso inicial de la muestra.

$$\text{Pérdidas por cocinado (\%)} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso tras cocinado})}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

3.7.6 pH

- **Objetivo:** Determinar el pH interno del pescado en fresco y tras la descongelación posterior al almacenamiento en congelación.
- **Método:** El pH se midió introduciendo el electrodo de penetración en las muestras de salmón, efectuándose la determinación en tres puntos distintos de cada una de ellas.

3.7.7 Extracto seco

- **Objetivo:** Determinar el contenido en extracto seco en el salmón fresco y en los filetes una vez descongelados tras el periodo de almacenamiento en congelación y tras su posterior cocinado.
- **Método:** Se realizó por desecación en estufa a 110 °C hasta peso constante (AOAC, 1995). La experiencia se realizó por triplicado, siendo el resultado final la media aritmética de los tres valores. Se tomó aproximadamente 1 g de muestra (carne previamente picada) en cada cápsula de porcelana tarada, previamente secada en estufa y enfriada en un desecador hasta temperatura ambiente. Las cápsulas se introdujeron en la estufa a 110 °C hasta peso constante. A continuación se enfriaron en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesaron. El valor del extracto seco se expresó en % (g/100 g de carne).

3.7.8 Cenizas

- **Objetivo:** Determinar el contenido de la fracción mineral (cenizas) en las muestras del pescado en fresco y tras la descongelación posterior al almacenamiento en congelación.
- **Método:** Se realizó por pesada tras la incineración de la muestra a 550 °C en un horno mufla (AOAC, 1995). Se tomaron las cápsulas y muestras utilizadas para la determinación del extracto seco, por lo que la experiencia se realizó por triplicado, siendo el resultado final la media aritmética de los tres valores. El contenido de cenizas se expresó en % (g/100 g de carne).

3.7.9 Contenido lipídico

- **Objetivo:** Cuantificar el contenido lipídico de la carne de las distintas muestras del pescado en fresco y tras la descongelación posterior al almacenamiento en congelación.
- **Método:** Se determinó por el método de Hanson & Olley (1963) usando butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. Los lípidos se cuantificaron gravimétricamente. Para ello, en un tubo de vidrio de centrífuga se homogeneizó una cantidad conocida de muestra (aproximadamente 20 g) con una mezcla de disolventes compuesta por 20 ml de cloroformo y 20 ml de metanol y se añadió una punta de espátula del antioxidante. Tras la homogeneización, se le añadió a la mezcla otros 20 ml de cloroformo y se volvió a homogeneizar durante unos 30 segundos. Por último, se adicionó 20 ml de agua destilada y se homogeneizó de nuevo durante otros 30 segundos. La mezcla final se centrifugó a 15 °C (3600 rpm durante 10 minutos), obteniéndose una clara separación trifásica con la capa de metanol-agua arriba, el tejido en el centro y la fase clorofórmica (donde están disueltos los lípidos) en el fondo.

La capa superior se retiró por succión con una pipeta Pasteur, el tejido fue apartado cuidadosamente y de la capa inferior se recogieron 20 ml de cloroformo que se filtraron a través de lana de vidrio lavada impregnada con cloroformo/metanol (2/1) (v/v) y con sulfato sódico anhidro. El extracto lipídico se obtuvo evaporando los disolventes mediante corriente de nitrógeno en un baño a una temperatura de 40 °C, manteniéndose posteriormente a vacío y en oscuridad en un desecador hasta pesada constante de la muestra. Para la determinación del contenido en grasa se

tuvo en cuenta que el volumen de disolventes recuperados (20 ml) sólo rinde la mitad de la grasa presente en la muestra. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. El resultado se expresó en % (g/100 g de carne).

3.7.10 Extracto seco magro

- **Objetivo:** Determinar el contenido en extracto seco magro, para evitar interferencias del contenido graso en el extracto seco.
- **Método:** Una vez se hubieron determinado tanto el contenido de extracto seco como el contenido lipídico, el contenido de extracto seco magro se calculó mediante la diferencia entre ambos valores.

3.7.11 Parámetros de color

- **Objetivo:** Determinar el color superficial del pescado en cuatro momentos distintos: en fresco, congelado, tras descongelar y tras su cocinado.
- **Método:** La medida instrumental del color se realizó por triplicado sobre las piezas de salmón. La Comisión Internacional de la Iluminación (Commission International de l'Eclairage- CIE) ha definido uno de los sistemas más importante y más usados en la actualidad para la descripción del color, basado en el uso de observadores y fuentes de iluminación estándar (Giese, 1995), el denominado espacio CIE $L^*a^*b^*$ (CIE, 1976). La ventaja de utilizar este espacio de color estriba en su similitud con la trivarianza visual humana (los conos del ojo humano son sensibles al rojo, verde o azul). El sistema obtiene los valores triestímulo CIE en relación con el espectro visible, definiendo tres colores primarios: rojo (X), verde (Y) y azul (Z). A partir de ellos se calculan matemáticamente las

coordenadas de color L^* (luminosidad), a^* (rojo-verde), b^* (amarillo-azul). El parámetro L^* varía de 0 (negro) a 100 (blanco), el valor de a^* puede ser positivo ($a^* > 0$, rojo) o negativo ($a^* < 0$, verde) y el valor de b^* puede ser positivo ($b^* > 0$, amarillo) o negativo ($b^* < 0$, azul).

Con objeto de calcular los valores CIE $L^*a^*b^*$, la reflectancia espectral se determinó cada 10 nm dentro del rango de 400-700 nm utilizando un espectrocolorímetro a través de una ventana de medida de 10 mm cubierta por cristal. El equipo se calibró frente a patrones blanco y negro antes de realizar las medidas. El iluminante patrón empleado fue el D65 y el observador de 10°. Los parámetros CIE L^* (coordenada de luminosidad), a^* (coordenada rojo-verde) y b^* (coordenada amarillo-azul) se calcularon directamente, empleando el programa de medición espectral Spectral-QC. Los valores de los parámetros de color se calcularon tomando para cada caso el valor medio de tres medidas.

También se calculó el parámetro conocido como índice de blancura (whiteness), mediante la siguiente fórmula (Bolin & Huxsoll, 1991):

$$\text{Blancura} = 100 - [(100 - L)^2 + a^2 + b^2]^{1/2}$$

La escala del índice de blancura se ha relacionado con una escala visual descriptiva para una mejor interpretación de los datos (Cisneros-Zevallos *et al.*, 1995): $32,6 \pm 2,4$ (no blanco, 0 % de superficie blanca); $38,4 \pm 1,3$ (ligeramente blanco, 25% de superficie blanca); $43,0 \pm 1,8$ (blanco-moderado, 50% de superficie blanca); $47,2 \pm 1,7$ (blanco-severo, 75% de superficie blanca) y $50,9 \pm 3,1$ (blanco-extremo, 100% de superficie blanca).

3.7.12 Grado de oxidación de los lípidos

3.7.12.1 Productos primarios de la oxidación de los lípidos

- Medida de los dienos conjugados
- **Objetivo:** Determinar el contenido de dienos conjugados, productos primarios de la oxidación lipídica formados por la reordenación de los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados, tanto en el pescado en fresco como tras la descongelación posterior al almacenamiento en congelación. Los dienos presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 233 nm.
- **Método:** Se siguieron los protocolos de extracción y determinación descritos por Pegg (2005). Se pesaron exactamente 0,1-0,3 g de los extractos de grasa obtenidos previamente y se disolvieron con iso-octano en un matraz aforado de 25 ml. Los dienos conjugados se determinaron espectrofotométricamente mediante la medida por triplicado de la absorción de las soluciones anteriores a 233 nm, utilizando iso-octano como blanco.

Los resultados fueron calculados utilizando las siguientes ecuaciones:

$$C_{CD} = A_{233} / (\epsilon \times l)$$

$$\text{Valor CD} = [C_{CD} \times (2,5 \times 10^4)] / W$$

siendo, C_{CD} la concentración en mmol/ml, A_{233} la absorbancia de la solución lipídica a 233 nm, ϵ el coeficiente de extinción del ácido linoleico, l el ancho de la cubeta en cm (1 cm), $2,5 \times 10^4$ es un factor de cálculo que

comprende el volumen de iso-octano utilizado (25 ml) para disolver el extracto lipídico así como el factor de conversión (1000 μm /mmol), de manera que el contenido de CDs puede ser expresado en μm , y W es el peso de la muestra de grasa en g.

Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como miliMoles de hidroperóxidos/kg de lípidos.

- Medida de los hidroperóxidos mediante el método del xilenol orange

- **Objetivo:** Cuantificar la cantidad de hidroperóxidos presentes en el pescado en fresco y tras la descongelación posterior al almacenamiento en congelación.
- **Fundamento:** Es un método espectrofotométrico basado en la habilidad de los peróxidos de oxidar iones hierro (Fe^{+2}). Los iones férricos (Fe^{+3}) resultantes de la oxidación, forman un complejo con el xilenol orange produciendo cromóforos que pueden ser medidos espectrofotométricamente.
- **Método:** Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Eymard & Genot (2003), el cual supone una adaptación del protocolo de Hermes-Lima *et al.* (1995) a pescados grasos. El protocolo se siguió incorporando algunas modificaciones a la hora de preparar el extracto de la muestra.

Para la preparación del extracto se tomaron 9 g de pescado picado, a los que se les añadieron 15 ml de metanol frío (4 °C). Las muestras se homogeneizaron durante 30 minutos en baño de ultrasonidos y se centrifugaron durante 10 minutos, a 5000 rpm y a 4 °C. Tras la centrifugación se recogieron los sobrenadantes, de los que posteriormente

se tomaron alícuotas de 150 μl a las que se añadieron 1350 μl de reactivo de FOX2, usándose 150 μl de metanol para el blanco. La mezcla se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente durante 50 minutos, tiempo tras el cual se procedió a la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 560 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se convirtieron en equivalentes de cumene (μM) utilizando una recta patrón previamente elaborada.

El reactivo de FOX2 contenía xilenol orange (100 μM), sulfato de amonio y hierro (II) hexahidrato (0,25 mM), y ácido sulfúrico (25 mM), y fue preparado justo antes de su utilización.

La recta patrón se elaboró con soluciones de distintas concentraciones de hidroperóxido de cumene (CuOOH) en metanol. Siendo el rango de concentraciones de 0 a 15 μM .

Las determinaciones se realizaron por duplicado y los niveles de hidroperóxidos se expresaron como miliequivalentes de cumene/kg de lípidos y miliequivalentes de cumene/kg de carne.

3.7.12.2 Productos secundarios de la oxidación de los lípidos

- Determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB)
- **Objetivo:** Determinar el contenido en compuestos secundarios de la oxidación lipídica reactivos al ácido tiobarbitúrico en el pescado en fresco y tras la descongelación posterior al almacenamiento en congelación.

- **Fundamento:** Los aldehídos son compuestos secundarios de la oxidación lipídica que reaccionan fácilmente con las proteínas. Este método se basa en la cuantificación espectrofotométrica del complejo rosa formado tras la reacción de los compuestos secundarios de la oxidación lipídica, como malonaldehído, con el ácido tiobarbitúrico.
- **Método:** Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Eymar (2003), con algunas modificaciones. Se pesaron 2 g de pescado picado a los que se les añadieron 100 µl de butilhidroxitolueno (BHT) en etanol (1 g/l) y 16 ml de ácido tricloroacético (50 g/l). Las muestras se homogeneizaron durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos y después se filtraron (Whatman nº 54). A continuación se tomaron 2 ml del filtrado (o 2 ml de ácido tricloroacético para el blanco), a los que se les añadió 2 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico 0,002 M. Los tubos se cerraron fuertemente y se calentaron en un baño a 70 °C durante 30 minutos, tiempo tras el cual se enfriaron rápidamente en hielo. Se midió su absorbancia con un espectrofotómetro a 508, 532 y 600 nm. La absorbancia medida al máximo 532 se corrigió de la siguiente manera:

$$A_{532nm} = A_{532nm} - [(A_{508nm} - A_{600nm}) \times (600 - 532) / (600 / 508)] - A_{600nm}$$

Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como mg de malondialdehído (MDA)/kg de grasa y mg de MDA/kg de carne, utilizando el coeficiente de extinción molar del MDA-SRATB complejo a 532 nm ($1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.8. Análisis sensorial

3.8.1. Análisis sensorial de muestras de salmón recubiertas con CPS+glicerol sometidas a tratamiento térmico.

El análisis sensorial se llevó a cabo por el panel sensorial perteneciente a la Asociación Nacional de Fabricantes de Conservas de Pescados y Mariscos (ANFACO-CECOPESCA). El panel estaba formado por siete-nueve jueces expertos en evaluación sensorial de productos de la pesca y acuicultura. Estas determinaciones se corresponden con los *Capítulo 4, 5 y 6* de esta tesis doctoral, en la que se evaluaron envueltas con distinta base proteica (proteínas de lactosuero, ovoalbúmina y proteína de soja).

La formulación del recubrimiento de CPS sometido a tratamiento térmico seleccionada para la prueba sensorial fue CPS+glicerol 1:1 aplicada antes de la congelación, considerada la envuelta que suponía la mejor protección frente a la oxidación lipídica del salmón atlántico congelado basándose en los estudios realizados en el presente trabajo. Como muestras de referencia o control se utilizaron muestras sin envuelta y muestras glaseadas, debido a que el glaseado es el procedimiento empleado más habitualmente para la mejor conservación de este producto. Las muestras destinadas a la evaluación sensorial (sin envuelta, glaseadas y CPS+glicerol 1:1) se prepararon en el laboratorio como se ha descrito en apartados anteriores y se conservaron durante cuatro meses en congelación (-20 °C). Su transporte hasta la sede del panel sensorial se realizó en neveras para evitar la descongelación. Una vez allí, las muestras se almacenaron en una cámara de refrigeración a

una temperatura próxima a 0 °C, o en una cámara de congelación a -20 °C, según el caso, hasta el momento del análisis.

Las pruebas sensoriales se realizaron sobre filetes de salmón congelados, descongelados y cocinados (cocidos, fritos y a la plancha). El cocinado de las muestras se llevó a cabo siguiendo la metodología recomendada por el Codex Alimentarius (1999) (CAC/GL 31-1999). Para el cocinado de las muestras se utilizó agua hirviendo para la cocción, y aceite de girasol para la fritura y la plancha, sin añadir sal o ningún otro ingrediente a las muestras. Los procesos de cocinado se realizaron de manera que se alcanzase una temperatura final interna de las muestras de 68 °C durante aproximadamente 5 minutos.

Las pruebas de evaluación sensorial utilizadas fueron elegidas por el propio panel sensorial, seleccionando dos *pruebas de discriminación* (una prueba triangular y otra de comparación por parejas), una *prueba de aceptación mediante la utilización de una escala específica y empleando una muestra de referencia*, y una *prueba de aceptación utilizando una escala hedónica*. Para la realización de estas pruebas se siguieron las normas descritas por AENOR (2010): UNE-ISO 4121-2006: Análisis sensorial. Metodología. Evaluación de los productos alimentarios por métodos que utilizan escalas; UNE-ISO 87006:1992. Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular; UNE-ISO 87005:1992. Análisis sensorial. Metodología. Prueba de comparación por parejas.

➤ *Prueba triangular:*

Condiciones generales de la prueba: la prueba triangular permite determinar si existen diferencias significativas entre las muestras presentadas para un atributo en particular. El procedimiento seguido se basó en la norma UNE 87-006-92 (AENOR, 2010). Las muestras se sometieron a un proceso de fritura y se presentaron al panel las muestras con el recubrimiento mencionado y muestras sin envuelta.

Los atributos sometidos a evaluación fueron los siguientes:

- *Aspecto general:* donde se evaluaron la consistencia y el color de los filetes.
- *Examen directo:* donde fueron evaluados el olor, la textura y el sabor de los filetes.

Desarrollo de la prueba: el panel estaba formado por siete catadores entrenados en evaluación sensorial de productos de la pesca y acuicultura; a cada catador se le presentó de modo simultáneo un juego de muestras (formado por tres muestras previamente codificadas con un número de tres cifras elegido al azar y de acuerdo con una de las combinaciones siguientes: ABB, AAB, ABA, BAA, BBA, BAB) (*Figura 3.5*). Cada catador procedió entonces a la evaluación de las muestras identificando, mediante la comparación de las muestras, aquella muestra desemparejada para el atributo dado.

De acuerdo a los objetivos buscados, se empleó la técnica de “juicio forzado”, donde la opción “no existen diferencias” no se permitió.

Una vez que cada catador realizó la prueba, la dirección del equipo evaluador procesó los resultados obtenidos para la aplicación del consiguiente tratamiento de datos.

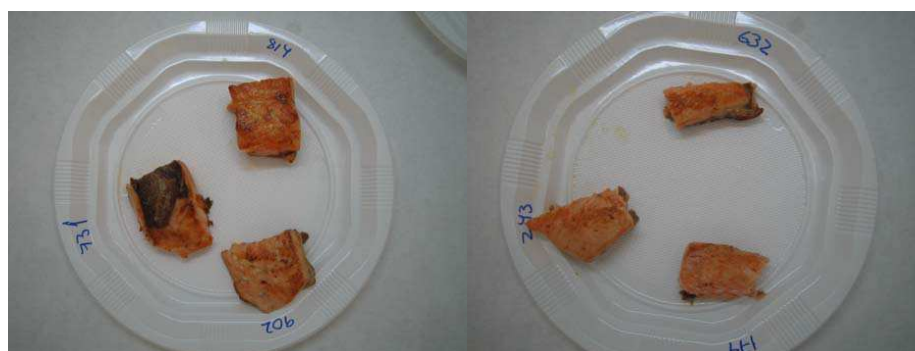


Figura 3.5. Ejemplos de juegos de muestras presentados a los catadores en la prueba triangular.

➤ *Prueba de Comparación por parejas:*

Condiciones generales de la prueba: este tipo de prueba permite determinar si existen diferencias significativas entre las muestras presentadas para un atributo en particular. El procedimiento seguido se basó en la norma UNE 87-005-92 (AENOR, 2010).

Se consideró que la situación se ajustaba al Modelo Bilateral (Norma UNE 87-005-92) (AENOR, 2010), es decir, que las diferencias entre las muestras pueden manifestarse en cualquiera de las dos direcciones, sin que podamos presuponer si una de las muestras presenta un atributo de forma más pronunciada que la otra. Las muestras con envuelta y las glaseadas utilizadas en la prueba se sometieron a un proceso de cocción.

Los atributos sometidos a análisis fueron: aspecto general, color, olor, sabor y textura. Las preguntas formuladas para cada uno de los atributos fueron:

- ¿Cuál de estas dos muestras presenta un aspecto general más agradable/característico?
- ¿Cuál de estas dos muestras presenta un color más agradable/característico?
- ¿Cuál de estas dos muestras presenta un olor más agradable/característico?
- ¿Cuál de estas dos muestras presenta un sabor más agradable/característico?
- ¿Cuál de estas dos muestras presenta una textura más agradable/característica)?

Desarrollo de la prueba: en un panel formado por siete catadores entrenados en evaluación sensorial de productos de la pesca y acuicultura, a cada catador se le presentaron las muestras de manera simultánea con el fin de que seleccionase, mediante la comparación entre ellas, la muestra que presentase el atributo más pronunciado, permitiendo la opción “no existen diferencias”.

Una vez realizada la prueba, la dirección del equipo evaluador procesó los resultados obtenidos para la posterior aplicación del tratamiento de datos.

- *Prueba de aceptación mediante la utilización de una escala específica y empleando una muestra de referencia:*

Condiciones generales de la prueba: de acuerdo con los objetivos buscados, se decidió realizar un análisis organoléptico mediante la utilización de una escala específica y una muestra de referencia (muestra sin envuelta). La escala empleada fue de 0 a 3, donde 0 el valor de menor intensidad/aceptabilidad y 3 representa el valor de mayor intensidad/aceptabilidad, a través de la cual fueron puntuados cada uno de los atributos que a continuación se indican:

- *Aspecto general:* donde se evaluaron el aspecto general de la muestra, el color y la consistencia (este último sólo en muestras descongeladas y cocinadas —cocidas y fritas—, no en congeladas).
- *Examen directo:* donde fueron evaluados el olor de la muestra (en muestras congeladas y descongeladas) y la textura y sabor de los filetes (en muestras cocinadas).

Desarrollo de la prueba: En un panel formado por ocho catadores entrenados en evaluación sensorial de productos de la pesca y acuicultura, a cada catador se le presentó de modo simultáneo un juego de muestras formado por una pieza de la muestra recubierta y una pieza de la muestra referencia (*Figura 3.6*), con el objetivo de que el catador puntuase en una ficha de cata, cada uno de los atributos, bajo su propio criterio.

Una vez realizada la prueba, la dirección del equipo evaluador procesó los resultados obtenidos para la posterior aplicación del tratamiento de datos.

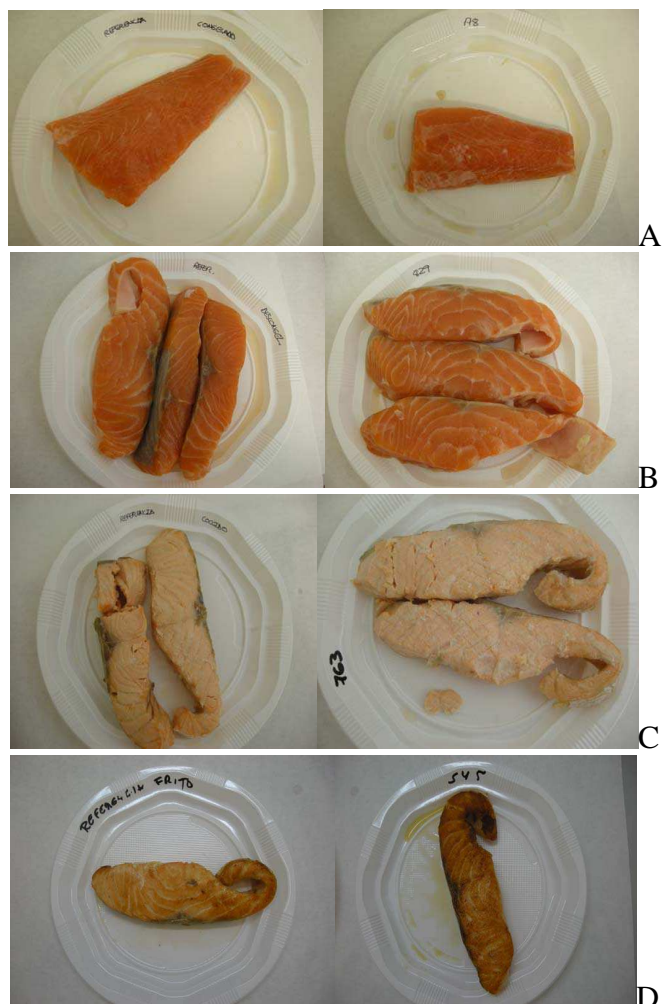


Figura 3.6. Ejemplos de juegos de muestras presentados a los catadores en la prueba de aceptación empleando una muestra de referencia (A: congelado, B: descongelado, C: cocido, D: frito).

➤ *Prueba de Aceptación mediante la utilización de una escala hedónica:*

Condiciones generales de la prueba: Se decidió realizar un análisis organoléptico del producto en tres formas de presentación distintas: descongelado, cocido y a la plancha. Para ello se evaluaron distintos atributos en cada una de estas presentaciones a través de una escala hedónica de

intensidad de 5 puntos, puntuando cada uno de los atributos de 1 a 5, de acuerdo con la escala indicada a continuación:

1	2	3	4	5
Muy desagradable	Desagradable	Ni agradable, ni desagradable	Agradable	Muy agradable

- *Aspecto general producto descongelado*: en este caso, los atributos evaluados fueron los siguientes:
 - Examen visual: aspecto general, color de los filetes y grado de liberación de agua.
 - Examen directo: olor y textura del producto.
- *Producto cocido*: en este caso, los atributos evaluados fueron los siguientes:
 - Examen visual: aspecto general y color de los filetes.
 - Examen directo: olor, sabor y textura del producto.
- *Producto a la plancha*: en este caso, los atributos evaluados fueron los siguientes:
 - Examen visual: aspecto general y color de los filetes.
 - Examen directo: olor, sabor y textura del producto.

Desarrollo de la prueba: en un panel formado por nueve catadores entrenados en evaluación sensorial de productos de la pesca y acuicultura, a cada catador se le presentó de modo simultáneo un juego de cada una de las

presentaciones (*Figura 3.7*) de la muestra con el fin que la persona consultada puntuase en una ficha de cata bajo su propio criterio cada atributo.

Una vez que cada catador realizó la prueba, la dirección del equipo evaluador procesó los resultados obtenidos para la aplicación del consiguiente tratamiento de datos.



Figura 3.7. Ejemplos de juegos de muestras presentados a los catadores en la prueba de aceptación (A: descongelada, B: cocida y C: a la plancha).

3.8.2. Análisis sensorial de muestras de salmón recubiertas con CPS o APS+glicerol sometidas a tratamiento de ultrasonicación

La evaluación sensorial de las muestras de salmón atlántico con recubrimientos sometidos a distintos tratamientos de ultrasonicación se llevó a cabo utilizando una *prueba afectiva cuantitativa*, tal y como describen Meilgaard *et al.* (1999), incluida dentro de las pruebas de aceptación por consumidores.

Los tratamientos por ultrasonidos se seleccionaron considerando los recubrimientos elaborados a partir de disoluciones de concentrado de proteínas (CPS) y de aislado de proteínas de suero (APS) (+glicerol en proporción proteína:plastificante 2:1) que proporcionaron la mejor protección al producto, principalmente en lo que se refiere a la oxidación lipídica y otros parámetros de calidad (APS sonificado 15 minutos y CPS sonificado 60 minutos). También se evaluaron muestras sin envuelta y muestras glaseadas, que actuaron como controles.

El panel de consumidores estuvo integrado por un total de 23 jueces no entrenados, consumidores habituales de este producto, con edades comprendidas entre los 20 y los 50 años, de los que 16 eran hombres y 7 mujeres, reclutados entre el personal y los estudiantes de la Facultad de Ciencias de Lugo. Las sesiones de evaluación sensorial se realizaron en grupos de 2-3 personas con un tiempo medio de unos 15 minutos por catador.

Las muestras de salmón, de aproximadamente 30 g de peso, se cocinaron en un horno microondas doméstico a potencia máxima (850 W) durante 30 segundos, siendo inmediatamente presentadas por separado a cada uno de los jueces y en orden aleatorio previamente determinado. Las muestras se codificaron utilizando códigos de tres dígitos elegidos al azar con ayuda de una tabla de números aleatorios (Meilgaard *et al.*, 1999). Durante la realización de la prueba, los catadores dispusieron de agua y pan sin sal para eliminar el sabor dejado por la muestra anterior. Antes de realizar la prueba se les explicó detalladamente las experiencias que iban a realizar. Durante las mismas, se entregaron las hojas de respuesta a cada juez, en las que se explicaban las instrucciones para realizar los análisis y expresar sus resultados.

La prueba consistió en una prueba de aceptación, en la que se utilizó una escala hedónica bipolar de nueve puntos (1= no me gusta nada; 9= me gusta muchísimo) y en la que a cada juez se le pidió que evaluase el color y el olor del producto sin probarlo, y después el sabor y la textura, además de solicitarle que diera una puntuación global de la muestra. Con esta prueba se pretendía obtener datos que pudieran relacionarse con los obtenidos en la evaluación analítica de parámetros como los rendimientos, el color o los índices de oxidación, de manera que se pudiera establecer si las diferencias observadas analíticamente también se reflejaban a nivel de consumidor.

3.9. Análisis estadístico

Los resultados experimentales obtenidos se analizaron mediante un *análisis de varianza de una vía* (one-way ANOVA), con tres replicas y con un nivel de significancia del 5%. Este análisis permite comprobar si existen diferencias entre promedios de tres o más tratamientos y para ello calcula el valor de F. El valor de F sólo indica si existen diferencias entre los grupos, pero no nos dice entre cuales. Cuando el análisis de la varianza determinó la existencia de diferencias significativas entre los grupos, se utilizó el test post hoc DMS o LSD (diferencias menos significativas) a nivel de $p < 0,05$ para determinar qué lotes eran significativamente diferentes. La comparación de medias entre las muestras recubiertas antes y después de la congelación, entre el uso de glicerol y sorbitol y la comparación de medias entre las muestras con CPS y APS, se realizó mediante un t-test para muestras independientes, con unos niveles de significancia del 5, 1 y 0,1%. Los resultados de estos t-test asumen que las varianzas de las dos muestras a comparar son iguales, por lo

que se comprobó que esa premisa fuese cierta en base a los resultados de la Prueba F de comparación de las desviaciones estándar.

Para el análisis de las respuestas de los catadores que evaluaron las características sensoriales de las muestras de salmón recubiertas con CPS tratado térmicamente se emplearon tablas de resultados significativos (Meilgaard *et al.*, 1999). Los valores obtenidos de la evaluación de la calidad sensorial de las muestras de salmón con recubrimientos sometidos a distintos tratamientos de ultrasonicación se compararon para determinar las significancia estadística empleando el test de Wilcoxon (Wilcoxon's matched pairs test).

Los distintos análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (2006).

Capítulo 4 Aplicación de recubrimientos elaborados con concentrados proteicos de lactosuero (CPS) en salmón del Atlántico congelado: efecto del plastificante y del momento de aplicación

4.1. Características del salmón empleado como materia prima

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los distintos parámetros químicos y físico-químicos de la carne de salmón, utilizada como materia prima en este estudio, se muestran en la *Tabla 4.1*. Se incluye la *composición química*, los valores de *pH* y *color* CIELab y los *índices de oxidación lipídica*.

Tabla 4.1. Caracterización fisicoquímica de la carne de salmón utilizado como materia prima (media \pm desviación estándar).

Composición	
Extracto seco (g/100 g carne)	32,97 \pm 3,16
Lípidos (g/100 g carne)	19,26 \pm 2,61
Cenizas (g/100 g carne)	0,96 \pm 0,14
pH	
	6,11 \pm 0,08
Color	
L*	32,79 \pm 1,32
a*	23,72 \pm 0,37
b*	25,01 \pm 0,33
Blancura	24,47 \pm 1,18
Índices de oxidación lipídica	
Dienos conjugados (mMol hidroperóxidos/kg lípidos)	41,20 \pm 2,80
Peróxidos (meq cumene/kg carne)	0,88 \pm 0,09
Peróxidos (meq cumene/kg lípidos)	4,59 \pm 0,34
Valor SRATB (mg MDA/kg carne)	0,31 \pm 0,08
Valor SRATB (mg MDA/kg lípidos)	1,66 \pm 0,47

SRATB: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

MDA: malondialdehído

La *composición química* descrita en este trabajo para el salmón del Atlántico concuerda en rasgos generales con la presentada por Shearer *et al.* (1994), los cuales estudiaron la composición del salmón atlántico a lo largo de su ciclo vital. La composición obtenida en el presente estudio coincidiría con la descrita para individuos de entre 250 g y 4 kg, adaptados a la vida en agua salada y que no han alcanzado aún la madurez sexual. Su contenido en extracto seco oscilaría entre un 27 y un 34%, el contenido lipídico entre un 5 y un 18%, y el contenido en cenizas entre un 1,2 y un 2,5%. Las diferencias en las composiciones se deberían a los distintos momentos del ciclo vital en los que se encontraban los animales y a los diferentes momentos del año en que fueron capturados.

El contenido medio en *extracto seco* observado en el salmón de partida fue de un 32,97% (correspondiente a un 67,03% en humedad). Por su parte, el *contenido graso* promedio se situó en un 19,26%, valor que es similar al registrado por Refsgaard *et al.* (1998a) para una población de 145 salmones del Atlántico.

Sin embargo, estos contenidos en humedad y grasa difieren de los observados por otros autores que han estudiado el efecto de diversos tipos de recubrimientos comestibles sobre el salmón rosado congelado (Sathivel, 2005; Ambardekar, 2007; Sathivel *et al.*, 2007, 2008). Estos trabajos se utilizarán para contrastar los resultados obtenidos en el presente estudio. Por ello, es preciso señalar ciertas diferencias en la composición del salmón de partida que deben tenerse en cuenta a la hora de analizar y discutir los resultados obtenidos.

Los menores contenidos en agua observados en el presente estudio (67,03%) en comparación con los obtenidos en esos trabajos (75,8-79,5%), pueden explicarse por el mayor *contenido graso* de los salmones utilizados (19,26%) en comparación con los descritos por esos autores: entre 0,3 y 2,2% (Sathivel, 2005; Ambardekar, 2007; Sathivel *et al.*, 2007, 2008). Esto concuerda con la relación inversa existente entre el contenido en agua y el contenido en grasa en el músculo de los pescados (Aubourg *et al.*, 2005). Por otro lado, los salmónidos presentan variaciones biológicas significativas en los niveles lipídicos de su carne en función de la especie (Hamilton *et al.*, 2005), del grado de maduración sexual (Refsgaard *et al.*, 1998a), de la estación del año (Roth *et al.*, 2005), de la alimentación (contenido lipídico en la dieta) y del tamaño del animal (Shearer *et al.*, 1994; Hemre & Sandnes, 1999). Así pues, todos estos parámetros podrían explicar las diferencias en los contenidos grasos descritos por los anteriores autores, especialmente la especie, pues el salmón rosado pertenece a los salmones del Pacífico y su contenido graso es muy inferior al del salmón del Atlántico, pudiendo llegar a considerarse un pescado magro (contenido en grasa inferior al 2%) o semigraso (contenido graso se sitúa entre 2-7%).

Los valores de pH encontrados están dentro del margen observado en la carne de otros pescados como salmón rosado (6,63) o trucha arcoíris (5,85) (Sathivel *et al.*, 2008; Kilinceker *et al.*, 2009).

El valor de *pH* encontrado en el salmón inicial (6,11) se explica por la producción de ácido láctico a partir de glucógeno a través del metabolismo anaeróbico *postmortem* (Love, 1988). El pH típico del músculo es próximo a la neutralidad (≈ 7). Tras la muerte, el sistema circulatorio deja de bombear

sangre a los tejidos, lo que provoca una disminución del nivel de oxígeno en los mismos. Estas condiciones de anaerobiosis activan la síntesis de ATP (adenosín trifosfato) por la vía de glucólisis anaerobia en la cual se produce ácido láctico y ATP a partir del glucógeno almacenado en el músculo. El descenso del pH debido a la acumulación de ácido láctico es uno de los cambios *postmortem* más significativos que se producen en el músculo. Este descenso depende de diversos factores como: la estación del año (Morkore & Rorvik, 2001), la edad del animal (Lavéty *et al.*, 1988) y el grado de madurez del mismo (Aksnes *et al.*, 1986). También el estado metabólico en el momento de la muerte, el estado nutricional del pez o el estrés *perimortem*, puede acelerar el comienzo del *rigor mortis*, provocando un rápido descenso del pH muscular (Erikson *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 2002; Ruff *et al.*, 2002). Por tanto, un *pH* inicial como el observado podría reflejar el buen estado nutricional del pez (Abbas, 2008), hipótesis respaldada por los datos de su composición.

La medida instrumental del *color* del salmón fresco coincidió sólo en L* con los rangos descritos para los parámetros CIELab en el salmón atlántico por Christiansen *et al.* (1995): L*(32-51), a* (1-17) y b* (4-16). Sin embargo, las coordenadas a* y b* en el presente estudio se encontraron por encima de los rangos descritos (23,72 y 25,01 respectivamente). Estas diferencias podrían explicarse por un mayor contenido en pigmentos, o por la relación existente entre los parámetros CIELab y el contenido graso del músculo (Einen & Skrede, 1998). A igualdad de niveles de astaxantina, el mayor contenido graso da lugar a valores superiores de a* y b* (Skrede & Wold, 2008). Además, estudios recientes han confirmado un incremento en la absorción y deposición de astaxantina en los tejidos en la trucha arcoíris y el salmón atlántico al aumentar el contenido lipídico de la dieta (Bjerkeng, 2000).

En relación a los *índices de oxidación lipídica*, el valor medio obtenido para las SRATB (0,31 mg MDA/kg carne) es similar a los descritos para el salmón rosado por Sathivel (2005) y Sathivel *et al.* (2007, 2008), los cuales encontraron contenidos entre 0,25 y 0,4 mg MDA/kg carne. El valor de peróxidos inicial en este estudio (0,88 meq cumene/kg carne) se encontró por debajo del valor de 1,34 meq /kg carne descrito en el trabajo de Stuchell & Krotcha (1995) con salmón real. Estas diferencias podrían deberse tanto a diferencias individuales entre los salmones empleados, como a la utilización de distintas especies y de diferentes métodos para calcular el valor de peróxidos.

4.2. Rendimientos, pérdidas por goteo y por cocinado.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *rendimiento*, *rendimiento tras descongelar*, las *pérdidas por goteo al descongelar*, las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, las *pérdidas por cocinado* y los valores de *pH* de los filetes de salmón tras el almacenamiento se muestran en la *Tabla 4.2*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Todos los parámetros, a excepción del *pH*, vienen expresados en porcentaje (%).

La aplicación de envueltas proteicas de CPS aumenta significativamente el *rendimiento* de los filetes ($p < 0,05$), con incrementos medios del 2,75-4,25% para las muestras recubiertas antes de la congelación

Tabla 4.2. Rendimiento, rendimiento al descongelar, pérdidas por goteo al descongelar y tras almacenamiento en refrigeración, pérdidas por cocinado y pH tras la descongelación (media \pm desviación estándar) de muestras recubiertas con CPS tras 4 meses de almacenamiento en congelación a -20 °C.

Muestras	Rendimiento (%)	Rendimiento (%) tras descongelar (%)	Pérdidas por goteo al descongelar (%)	Pérdidas por goteo tras refrigeración (%)	Pérdidas por cocinado (%)	pH
Recubiertas antes de congelar						
Sin envuelta	99,34 \pm 0,13a	95,29 \pm 0,27a	4,08 \pm 0,20a	11,01 \pm 1,60a	14,23 \pm 1,92a	6,22 \pm 0,02b
CPS	102,09 \pm 0,43b	95,82 \pm 0,14ab	6,14 \pm 0,41b	10,53 \pm 0,97a	14,65 \pm 1,27a	6,21 \pm 0,01ab
CPS+sorbitol 1:1	102,22 \pm 0,57b	96,77 \pm 0,64ab	5,33 \pm 1,07ab	9,89 \pm 1,80a	14,73 \pm 1,87a	6,19 \pm 0,01a
CPS+sorbitol 2:1	102,16 \pm 0,95b	96,44 \pm 1,05ab	5,60 \pm 0,36ab	8,95 \pm 0,46a	12,95 \pm 0,81a	6,19 \pm 0,01a
CPS+glicerol 1:1	102,14 \pm 0,17b	96,54 \pm 1,25ab	5,49 \pm 1,32ab	8,19 \pm 1,70a	15,41 \pm 3,43a	6,19 \pm 0,01a
CPS+glicerol 2:1	103,59 \pm 0,37c	97,00 \pm 1,02b	6,35 \pm 1,27b	9,22 \pm 2,47a	13,50 \pm 0,32a	6,19 \pm 0,02a
Recubiertas tras congelar						
Sin envuelta	99,14 \pm 0,30a	95,96 \pm 0,87a	3,21 \pm 1,07a	9,09 \pm 2,23ab	14,46 \pm 1,54a	6,26 \pm 0,04a
Glaseado	100,84 \pm 0,16b	96,09 \pm 0,67a	4,72 \pm 0,52ab	16,98 \pm 0,98c	13,72 \pm 0,69a	6,19 \pm 0,09a
CPS	101,68 \pm 1,16bc	97,70 \pm 0,79ab	3,91 \pm 1,08ab	9,36 \pm 1,10ab	12,26 \pm 1,94a	6,26 \pm 0,02a
CPS+sorbitol 1:1	102,44 \pm 0,48c	97,69 \pm 2,12ab	4,65 \pm 1,79ab	10,73 \pm 1,00b	14,80 \pm 3,76a	6,20 \pm 0,01a
CPS+sorbitol 2:1	102,16 \pm 0,57bc	96,99 \pm 0,73ab	5,07 \pm 0,66b	10,43 \pm 1,01b	14,79 \pm 3,51a	6,19 \pm 0,01a
CPS+glicerol 1:1	102,28 \pm 1,20c	98,50 \pm 0,70b	3,69 \pm 0,82ab	10,03 \pm 1,52ab	15,47 \pm 2,98a	6,23 \pm 0,02a
CPS+glicerol 2:1	102,26 \pm 0,92c	98,84 \pm 0,79b	3,34 \pm 0,23ab	7,73 \pm 1,11a	14,47 \pm 2,14a	6,25 \pm 0,04a
A	ns	**	***	ns	ns	**
B	ns	ns	ns	ns	ns	ns

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar (RAC) versus después de congelar (RDC); * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a, b, c, d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

(RAC) y del 1,70-3,30% para las recubiertas después de la congelación (RDC). Presentándose el mayor incremento, del 4,25%, en las muestras RAC con CPS+glicerol 2:1; y en las RDC con CPS+sorbitol 1:1, CPS+glicerol 1:1 y 2:1 (3,30, 3,14 y 3,12% respectivamente). El aumento del rendimiento de los filetes congelados se puede explicar debido a la fijación satisfactoria de las envueltas sobre los filetes de pescado, lo que provoca un aumento de peso y por tanto del rendimiento.

En comparación con los resultados obtenidos en el presente trabajo, Ambardekar (2007) observó unos rendimientos inferiores (incremento del 0,8%) para envueltas elaboradas con concentrados de proteínas de lactosuero aplicados sobre filetes de salmón rosado congelados durante tres meses, siendo dichos valores similares a los que encontró al utilizar envueltas de concentrados de proteína de soja (1%) y de preparados de proteínas de fletán del Pacífico obtenidos por el método de cocinado (0,4%), por hidrólisis enzimática (0,5%) o por modificación del pH (1,6%).

El aumento del rendimiento debido a la utilización de diversos recubrimientos comestibles en filetes de pescado congelados ya fue descrito por diversos autores, con diferentes resultados. Así, Sathivel (2005) describió aumentos del rendimiento, en filetes de salmón rosado congelados durante tres meses, aplicando envueltas de quitosano (aumentos del 3,1-3,8%), concentrado proteico de soja (3,4%), ovoalbúmina (2,3%), preparados proteicos a partir de salmón rosado (2,1%) y de fletán del Pacífico (2%). Sathivel *et al.* (2007) obtuvieron rendimientos del 22,7% al aplicar un glaseado con quitosano sobre filetes de salmón rosado almacenados en congelación durante ocho meses. Sathivel *et al.* (2008) estudiaron el efecto de

recubrimientos elaborados con proteínas de pescado (abadejo de Alaska) sometidas a un proceso de hidrólisis a distintos tiempos: 10, 30 y 45 minutos, obteniendo aumentos del rendimiento en filetes de salmón rosado del 12, 13 y 13,5% respectivamente.

También es preciso destacar que, en nuestro caso, el *rendimiento* es mayor cuando se aplican envueltas con CPS que cuando se realiza sólo glaseado.

Los *rendimientos tras descongelar* de las muestras con envueltas de CPS son mayores que los de las muestras sin envuelta o glaseadas, aunque este incremento sólo es significativo ($p < 0,05$) para las muestras CPS+glicerol 2:1 (1,71%), en los filetes RAC respecto a los que no tienen envuelta, y en CPS+glicerol 1:1 (2,54-2,41%) y 2:1 (2,88-2,75%) en los filetes RDC en relación a las muestras sin envuelta y glaseadas. Una posible explicación sería que las envueltas proteicas testadas evitan la pérdida de humedad durante el almacenamiento en congelación. A pesar de que las envueltas proteicas debido a su naturaleza hidrofílica, se suponen pobres barreras al vapor de agua (Pavlath & Orts, 2009), el proceso de desnaturalización por calor al cual se sometieron las soluciones de CPS podría reducir su permeabilidad al vapor del agua, mejorando sus propiedades barrera frente a la pérdida de humedad, como ya observaron McHugh & Krochta (1994a) en películas independientes. Además, Kester & Fennema (1986) plantearon que ciertas envueltas comestibles elaboradas con hidrocoloides pueden perder agua por sublimación durante el almacenamiento en congelación, de manera que la pérdida de humedad por parte del alimento se retrase hasta que el agua contenida en la envuelta se haya evaporado. Otra posible explicación es que durante la

descongelación no se pierde toda la envuelta, lo que produciría mayores rendimientos tras descongelar. Esta hipótesis se vería sustentada por los datos de rendimiento, puesto que las envueltas con mayores rendimientos, y por tanto que habrían fijado una mayor cantidad de envuelta, son las que presentan mayores rendimientos al descongelar.

Las *pérdidas por goteo al descongelar* en las muestras sin envuelta (4,08% RAC; 3,21% RDC) son significativamente menores que en el resto ($p < 0,05$). Esto nos indica que parte de la envuelta se pierde durante el proceso de descongelación. Sathivel (2005) observó un efecto similar en este parámetro utilizando diferentes tipos de recubrimientos: quitosano, aislado de soja, ovoalbúmina e hidrolizados proteicos de pescados.

En relación a las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, no se observó una tendencia clara. Las muestras RAC presentan pérdidas similares ($p \geq 0,05$) en un rango de 8,19-11,01%. En las muestras RDC, sin embargo, las CPS+glicerol 2:1 muestran las menores pérdidas (7,73%), y las muestras glaseadas presentan las mayores (16,98%) con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto.

No se observaron diferencias significativas en las *pérdidas por cocinado*, las cuales oscilaron entre un 12,95 y un 15,41%. Esto nos indica que la utilización de envueltas no afecta al rendimiento de los filetes durante su cocinado. Dicha observación es compartida por Sathivel (2005), para envueltas de quitosano, concentrado proteico de soja, ovoalbúmina e hidrolizados proteicos de pescados, obteniendo valores similares (11,2-15,8%) y por Ambardekar (2007), para recubrimientos elaborados con proteína de

lactosuero (CPS), soja e hidrolizados proteicos de fletán obtenidos por diferentes métodos. Sin embargo, este autor obtuvo pérdidas por cocinado de entre 7,4 y 12,2%. Concretamente la envuelta de CPS con glicerol (2,5:1; proteína:plastificante aproximadamente) obtuvo una *pérdida por cocinado* media del 7,4%.

Tras el almacenamiento en congelación, se observó un aumento significativo del pH en comparación con el inicial en fresco (6,11), tanto en las muestras sin envuelta (6,22-6,26) como en las muestras con envuelta proteica con o sin plastificante (6,19-6,26). El pH inicialmente ácido de los filetes se debe a la producción de ácido láctico (*Tabla 4.1*). Sin embargo, el incremento del pH durante el almacenamiento en congelación es consecuencia de la producción de compuestos de naturaleza básica, generados por la degradación enzimática del músculo del pez (Simeonidou *et al.*, 1997). Existen varios sistemas proteolíticos en el tejido muscular implicados en la degradación *postmortem* del músculo. Estos incluyen proteosomas, proteinasas alcalinas termo-estables, metaloproteínas, calpaínas y las catepsinas lisosomales (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006). Estos sistemas pueden mantenerse operativos incluso a temperaturas de congelación, aunque su actividad se ve ralentizada.

Por otro lado, la congelación de los filetes de pescado modifica el equilibrio ácido base a consecuencia de la migración del agua al espacio extracelular durante la congelación (Sigurgisladottir *et al.*, 2000). A medida que el agua se congela, la concentración de solutos en el agua no congelada se eleva, aumentando la presión osmótica. Este aumento de concentración genera la salida del agua desde el interior celular al espacio extracelular modificando el equilibrio ácido-base existente (Jiang & Lee, 2004). Otros autores, como

Sathivel *et al.* (2008) y Kilinceker *et al.* (2009), también observaron este aumento de pH durante cuatro meses de almacenamiento en congelación de filetes de salmón rosado (de 6,63 a 6,8) y trucha arcoiris (de 5,85 a 6,28), respectivamente.

Al comparar todas las muestras en las que el CPS se aplicó antes de la congelación respecto a las aplicadas después de la congelación del pescado, no se observan efectos significativos ($p \geq 0,05$) en el rendimiento. Por tanto, parece que la adhesión es la misma cuando se aplica en pescado congelado, aunque esté solamente 30 segundos en contacto, que cuando se realiza en pescado sin congelar, estando en este caso sumergido el pescado 1 minuto.

El momento de aplicación del recubrimiento sí afecta significativamente a los *rendimientos tras descongelar* ($p < 0,01$) y a las *pérdidas por goteo al descongelar* ($p < 0,001$). Cuando la aplicación de la envuelta se produce antes de la congelación de los filetes el *rendimiento tras descongelar* es significativamente menor y las *pérdidas por goteo al descongelar* son significativamente mayores. Estos resultados pueden deberse a la mejor adhesión de las envueltas proteicas de CPS sobre la superficie congelada de los filetes que sobre la superficie fresca.

El momento de aplicación también afecta al pH de los filetes tras el almacenamiento ($p < 0,01$), de manera que los filetes RAC presentan valores de pH significativamente más ácidos que los filetes RDC.

En relación al empleo de los dos tipos de plastificantes, no existen diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre la utilización de glicerol o sorbitol en ninguno de los parámetros estudiados.

4.3. Extracto seco, lípidos y cenizas

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *extracto seco*, *extracto seco magro*, *contenido en lípidos* y *contenido en cenizas* de los filetes de salmón tras el almacenamiento en congelación y *el extracto seco tras cocinado*, se muestran en la *Tabla 4.3*. En ésta, también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Los valores del *extracto seco*, *extracto seco magro*, *extracto seco tras cocinado*, *lípidos* y *cenizas* vienen expresados en g/100 g de carne.

El *contenido lipídico* medio de los filetes osciló entre un 15,98 y 27,15%. Esta elevada variabilidad concuerda con los datos obtenidos por Refsgaard *et al.* (1998a) que obtuvieron contenidos grasos variables de entre un 9 y 21% para los filetes de distintas regiones de salmones del Atlántico. También Morkore *et al.* (2001) observaron contenidos variables en filetes obtenidos de diferentes regiones corporales en salmones criados en granja (14,5-21,8%).

Además de las diferencias interindividuales en el contenido graso comentadas anteriormente debidas a la especie, grado de maduración sexual, alimentación y tamaño, dentro de un mismo salmón el contenido lipídico se distribuye de manera no uniforme a lo largo de los ejes cefalo-caudal y dorso-ventral de su cuerpo. En general, los filetes obtenidos de las secciones

Tabla 4.3. Extracto seco, extracto seco magro, contenidos en lípidos y cenizas de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en congelación y extracto seco tras cocinado, (g/100g pescado; media \pm desviación estándar).

Muestras	Descongeladas			Cocinadas	
	Extracto seco	Contenido lipídico	Extracto seco magro	Cenizas	Extracto seco tras cocinado
Recubiertas antes de congelar					
Sin envuelta	41,46 \pm 2,00cd	20,76 \pm 3,87ab	20,70 \pm 2,58b	1,09 \pm 0,06a	42,73 \pm 1,55cd
CPS	40,61 \pm 0,53cd	22,63 \pm 0,85abc	17,98 \pm 1,11ab	1,02 \pm 0,07a	42,81 \pm 1,07cd
CPS+sorbitol 1:1	38,09 \pm 2,12b	20,62 \pm 5,35ab	17,47 \pm 3,42ab	1,02 \pm 0,07a	40,02 \pm 1,92ab
CPS+sorbitol 2:1	35,70 \pm 0,65a	17,62 \pm 1,43a	17,61 \pm 1,15ab	1,07 \pm 0,02a	37,80 \pm 0,93a
CPS+glicerol 1:1	41,85 \pm 0,79d	27,15 \pm 2,55c	14,70 \pm 1,82a	1,07 \pm 0,10a	44,74 \pm 0,86d
CPS+glicerol 2:1	39,43 \pm 0,59bc	22,98 \pm 1,15bc	16,45 \pm 0,74a	1,12 \pm 0,04a	41,73 \pm 1,50bc
Recubiertas tras congelar					
Sin envuelta	40,62 \pm 0,96a	18,90 \pm 0,87a	21,72 \pm 1,28b	1,10 \pm 0,05a	40,58 \pm 1,26a
Glaseado	37,98 \pm 0,50a	19,92 \pm 0,34a	18,06 \pm 0,58a	1,16 \pm 0,04a	38,84 \pm 1,47a
CPS	39,37 \pm 3,30a	19,75 \pm 5,09a	19,62 \pm 2,21ab	1,08 \pm 0,09a	40,95 \pm 3,76a
CPS+sorbitol 1:1	39,38 \pm 2,20a	17,66 \pm 1,31a	19,72 \pm 1,63ab	1,09 \pm 0,07a	38,84 \pm 0,79a
CPS+sorbitol 2:1	37,00 \pm 2,45a	15,98 \pm 3,20a	21,02 \pm 2,74b	1,10 \pm 0,01a	38,32 \pm 2,87a
CPS+glicerol 1:1	36,43 \pm 4,29a	17,00 \pm 4,17a	19,43 \pm 1,12ab	1,06 \pm 0,10a	38,38 \pm 4,06a
CPS+glicerol 2:1	38,67 \pm 2,24a	20,71 \pm 1,05a	17,96 \pm 1,22a	1,07 \pm 0,04a	41,44 \pm 3,94a
A	ns	**	**	ns	ns
B	ns	*	ns	ns	*

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

anteriores presentan un mayor contenido lipídico que aquellos obtenidos de las regiones posteriores. A su vez, las secciones ventrales y dorsales son mucho más ricas en grasa que la sección central (Kinsella *et al.*, 1977; Bell *et al.*, 1998; Katikou *et al.*, 2001). Siendo la sección ventral la de mayor contenido graso, especialmente la próxima a la región anterior (Polvi & Ackman, 1992).

En el presente trabajo, los filetes se obtuvieron de diversas secciones para reducir las diferencias debidas a la distribución no uniforme de la materia grasa en el salmón atlántico. Sin embargo, como han descrito otros autores, la región de la que procede cada filete influye en su contenido graso, pudiendo dar lugar a cierta variabilidad en los resultados.

Así pues, las diferencias observadas en la composición de los filetes, especialmente en relación al *contenido en lípidos*, entre las distintas envueltas ($p < 0,05$) y los distintos momentos de aplicación ($p < 0,01$) pueden explicarse como resultado de la variabilidad inter- e intraindividual de los salmones y no como consecuencia del almacenamiento en congelación, ni de la aplicación de recubrimientos de CPS, ni del momento de aplicación.

El contenido medio en *extracto seco* de los filetes control sin envuelta antes de su congelación fue de un 32,97%, lo que supone un contenido en humedad del 67,03% (*Tabla 4.1*). Tras cuatro meses en congelación, los filetes sin envuelta descongelados presentaron un contenido en *extracto seco* del 40,62-41,46% (humedad del 58,54-59,38%), lo que supone una pérdida de humedad de un 7,65-8,49%. Sathivel (2005) documentó pérdidas de humedad de un 4,1% en salmón rosado tras 3 meses de almacenamiento en congelación sin envuelta. Las mayores pérdidas descritas en el presente trabajo podrían

deberse al uso de una especie diferente o a un mayor tiempo de conservación en congelación. Así mismo, también se ha señalado que el material de envasado empleado, como el tipo de bolsas zip-lock, puede afectar a las pérdidas de agua durante el almacenamiento en congelación (Duan *et al.*, 2010). Las bolsas utilizadas en el estudio de Sathivel (2005) podrían tener mejores propiedades barrera al vapor de agua, lo que evitaría la evaporación de moléculas de agua de la superficie del filete.

Debido a las diferencias en el contenido graso existentes entre los filetes utilizados para cada tipo de recubrimiento y a que estas diferencias provocan variaciones en los valores de *extracto seco* (o humedad), se calculó el contenido en *extracto seco magro* de las muestras. El contenido medio en *extracto seco magro* de las muestras osciló entre 14,70 y 21,72%, lo que significaría valores de humedad de la materia magra de un rango entre 78,28 y 85,3%.

En las muestras RAC, los filetes recubiertos con CPS presentaron menores contenidos en *extracto seco magro* (mayores contenidos en humedad) que aquellos sin envuelta, aunque sólo fueron significativos ($p < 0,05$) en las muestras con CPS+glicerol 1:1 y 2:1. Otros autores como Stuchell & Krochta (1995) también encontraron mayores valores de humedad en filetes de salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) recubiertos con soluciones de aislado de proteínas de lactosuero y ácidos grasos monoacetilados (Myvacet 9-08) tras tres meses en congelación, en comparación con los filetes sin envuelta. También Sathivel (2005) describió mayores contenidos en humedad en filetes de salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*) recubiertos con envueltas proteicas de soja y de ovoalbúmina tras tres meses de congelación. Todos

estos autores aplicaron tiempos de almacenamiento en congelación más cortos que el empleado en este trabajo, lo que pudo afectar a los resultados.

En las muestras RDC, los filetes glaseados y envueltos con CPS+glicerol 2:1 presentan contenidos en *extracto seco magro* menores, por tanto mayores contenidos en humedad, en comparación con el resto de muestras.

Los valores de *extracto seco magro* de las muestras RDC fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) que los obtenidos para los filetes RAC. Así pues, el momento de la aplicación de la envuelta influye significativamente en el contenido en extracto seco magro, lo cual podría atribuirse a una mejor protección frente a la pérdida de humedad durante el almacenamiento en congelación, cuando la envuelta es aplicada antes de la congelación. Sin embargo, teniendo en cuenta el rendimiento obtenido tras descongelar (*Tabla 4.2*), los mayores valores de extracto seco de las muestras RDC también podrían explicarse por los restos de envuelta que no se ha perdido tras descongelar, la cual probablemente se adhiriera mejor a la superficie congelada del filete que a una superficie en fresco.

Finalmente, todos los filetes presentaron contenidos en cenizas sin diferencias significativas ($p \geq 0,05$), con valores medios que variaron en un rango del 1,02-1,16%, lo que significa que las envueltas no modifican el contenido mineral de los filetes de salmón durante su almacenamiento en congelación ni tras su descongelación.

En relación a los contenidos en *extracto seco* de las muestras *tras el cocinado*, sólo los filetes RAC presentan diferencias significativas, aunque no se ha podido establecer un efecto claro del uso de los distintos tipos de

envueltas. Cabe destacar también que se observan menores valores significativos ($p < 0,05$) de *extracto seco tras el cocinado*, al emplear sorbitol como plastificante en comparación con el glicerol.

4.4. Parámetros de color.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes las coordenadas de color CIELab y blancura (whiteness) de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en *congelación*, una vez *descongelados* y tras su *cocinado*, de las muestras RAC se muestran en la *Tabla 4.4*. En ésta, también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos.

Tabla 4.4. Parámetros de color de los filetes recubiertos con CPS antes de su congelación, tras 4 meses de almacenamiento. Valores de las muestras congeladas, descongeladas y cocinadas (media \pm desviación estándar).

Muestras	L*	a*	b*	Blancura
Congeladas				
Sin envuelta	52,82 \pm 0,70c	16,44 \pm 0,32d	13,22 \pm 0,53a	48,31 \pm 0,45bc
CPS	51,42 \pm 1,86bc	15,80 \pm 0,37dc	13,21 \pm 0,93a	47,22 \pm 1,62b
CPS+sorbitol 1:1	50,24 \pm 1,04ab	15,48 \pm 0,56bd	12,91 \pm 0,57a	46,31 \pm 0,91ab
CPS+sorbitol 2:1	53,56 \pm 2,22c	13,46 \pm 0,72a	12,39 \pm 0,50a	50,08 \pm 2,28c
CPS+glicerol 1:1	47,94 \pm 1,16a	15,16 \pm 0,07bc	12,89 \pm 0,22a	44,27 \pm 1,09a
CPS+glicerol 2:1	48,20 \pm 0,65a	14,70 \pm 0,91b	13,11 \pm 1,53a	44,57 \pm 0,97a
Descongeladas				
Sin envuelta	41,08 \pm 2,49a	21,87 \pm 1,26c	23,89 \pm 1,71c	32,76 \pm 3,06a
CPS	48,74 \pm 1,22b	18,46 \pm 1,66b	18,92 \pm 2,66b	42,30 \pm 2,45b
CPS+sorbitol 1:1	42,45 \pm 1,29a	18,84 \pm 0,57b	17,30 \pm 1,07ab	37,02 \pm 1,64a
CPS+sorbitol 2:1	42,16 \pm 3,65a	18,24 \pm 2,33b	18,44 \pm 2,13b	36,60 \pm 4,58a
CPS+glicerol 1:1	47,61 \pm 2,20b	17,06 \pm 1,01ab	17,65 \pm 1,40ab	42,14 \pm 2,69b
CPS+glicerol 2:1	48,77 \pm 0,73b	15,70 \pm 0,95a	14,80 \pm 1,07a	44,41 \pm 1,12b
Cocinadas				
Sin envuelta	71,75 \pm 0,40a	15,13 \pm 0,61ab	16,25 \pm 0,10ab	64,07 \pm 0,15ab
CPS	73,46 \pm 1,20b	14,38 \pm 2,16ab	15,66 \pm 1,06ab	65,97 \pm 2,14ab
CPS+sorbitol 1:1	72,08 \pm 1,02ab	15,56 \pm 0,74ab	16,57 \pm 0,56ab	63,99 \pm 1,18ab
CPS+sorbitol 2:1	72,50 \pm 1,04ab	16,99 \pm 2,21b	16,87 \pm 1,04b	63,51 \pm 2,15a
CPS+glicerol 1:1	72,79 \pm 0,95ab	14,20 \pm 0,68ab	15,39 \pm 0,36a	65,66 \pm 1,16ab
CPS+glicerol 2:1	73,46 \pm 0,45b	13,79 \pm 2,27a	15,33 \pm 0,79a	66,36 \pm 1,62b

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes las coordenadas de color CIELab y blancura de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en *congelación*, una vez *descongelados* y tras su *cocinado*, de las muestras RDC se muestran en la *Tabla 4.5*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado.

Diversos parámetros de calidad, entre los que se encuentra la coloración de la carne, determinan la aceptabilidad y el precio del salmón (Skrede & Storebakken, 1986). El consumidor en el momento de la compra relaciona este parámetro con un indicador de la frescura y de mayor calidad del producto. Así pues, la venta y aceptabilidad de este tipo de producto por parte de los consumidores va a depender en gran medida del color que presente, siendo un color rosado uniforme una característica positiva para la venta de este tipo de pescado.

Los filetes *congelados* tras el almacenamiento presentaron un aumento de la coordenada de luminosidad (L^*) en comparación con el fresco (*Tabla 4.1*), fenómeno ya descrito por Christophersen *et al.* (1992) en filetes de salmón congelados durante $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lo largo de seis meses. Según estos autores, el aumento de este parámetro se debe a la deshidratación de la superficie del producto y a cambios en las propiedades reflectivas de los cristales de hielo. También se observa un descenso de los valores de a^* y b^* . Es preciso tener en cuenta que el color propio de las envueltas aún adheridas a los filetes congelados, puede influir en estos resultados.

Tabla 4.5. Parámetros de color de los filetes recubiertos con CPS después de su congelación, tras 4 meses de almacenamiento. Valores de las muestras congeladas, descongeladas y cocinadas (media \pm desviación estándar).

Muestras	L*	a*	b*	Blancura
Congeladas				
Sin envuelta	55,20 \pm 4,50a	17,60 \pm 0,85a	13,77 \pm 0,50ad	49,92 \pm 4,42a
Glaseado	58,37 \pm 2,03ab	13,96 \pm 0,68b	12,15 \pm 1,06a	54,38 \pm 1,98ab
CPS	60,06 \pm 1,43ab	17,38 \pm 0,27a	16,11 \pm 0,88bc	53,56 \pm 1,54ab
CPS+sorbitol 1:1	60,21 \pm 1,46ab	17,83 \pm 1,62a	16,32 \pm 1,54b	53,42 \pm 2,01ab
CPS+sorbitol 2:1	61,02 \pm 0,99b	14,24 \pm 1,95b	12,85 \pm 0,96ad	56,52 \pm 1,26b
CPS+glicerol 1:1	60,88 \pm 3,73b	13,57 \pm 1,78b	13,87 \pm 1,11ad	56,29 \pm 3,60b
CPS+glicerol 2:1	57,50 \pm 4,52ab	13,84 \pm 0,49b	14,37 \pm 0,56cd	53,00 \pm 3,87ab
A	***	ns	**	***
B	ns	ns	ns	ns
Descongeladas				
Sin envuelta	36,60 \pm 0,87a	24,03 \pm 1,35a	25,49 \pm 2,33a	27,53 \pm 0,76a
Glaseado	40,68 \pm 0,74bc	16,38 \pm 0,55b	20,63 \pm 0,90b	34,83 \pm 0,83bc
CPS	41,39 \pm 1,59bd	22,20 \pm 0,98ac	23,06 \pm 1,20c	33,21 \pm 2,10bcd
CPS+sorbitol 1:1	43,02 \pm 0,81b	21,16 \pm 0,51c	20,31 \pm 0,52b	35,91 \pm 0,70b
CPS+sorbitol 2:1	39,37 \pm 1,85acd	20,78 \pm 0,84cd	19,96 \pm 1,47b	32,85 \pm 1,59cd
CPS+glicerol 1:1	36,77 \pm 2,23a	19,09 \pm 2,20de	18,53 \pm 1,60b	31,38 \pm 2,87d
CPS+glicerol 2:1	38,23 \pm 2,48ac	17,52 \pm 0,77be	18,54 \pm 0,82b	33,15 \pm 1,92bcd
A	***	**	**	***
B	ns	***	*	ns
Cocinadas				
Sin envuelta	71,70 \pm 1,86a	16,06 \pm 2,61ac	17,35 \pm 1,80ab	63,08 \pm 2,90ab
Glaseado	72,87 \pm 0,47ab	14,16 \pm 0,29ad	16,32 \pm 0,17ac	65,31 \pm 0,54ac
CPS	70,70 \pm 0,78a	18,97 \pm 1,98bc	19,12 \pm 1,20b	60,19 \pm 2,00b
CPS+sorbitol 1:1	70,81 \pm 1,06a	18,60 \pm 2,19c	18,39 \pm 1,31b	60,79 \pm 2,42b
CPS+sorbitol 2:1	71,52 \pm 0,51a	18,79 \pm 0,84c	18,05 \pm 0,61ab	61,39 \pm 0,87b
CPS+glicerol 1:1	72,21 \pm 2,11ab	16,69 \pm 1,54ac	17,45 \pm 0,57ab	63,17 \pm 2,32ab
CPS+glicerol 2:1	74,41 \pm 1,23b	13,05 \pm 0,16d	15,34 \pm 0,39c	67,43 \pm 1,10c
A	ns	*	**	*
B	**	**	**	**

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)
a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

Tras el periodo de almacenamiento en congelación, los filetes *descongelados* de salmón, tanto RAC como RDC, presentaron mayores valores de luminosidad (L*) y blancura, y menores valores de las coordenadas a* (índice de rojez) y b* en comparación con los valores del pescado *fresco* (Tabla 4.1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sathivel (2005)

en salmón rosado tras cuatro meses de congelación. También Ambardekar (2007) describió aumentos de L^* y blancura y un marcado descenso de la coordenada a^* en filetes descongelados de salmón rosado recubiertos con CPS y glicerol (2,5:1; proteína:plastificante aproximadamente), tras tres meses de congelación, encontrando, sin embargo, valores similares o ligeramente superiores de la coordenada b^* . Como ya se comentó en la introducción, se ha constatado que la concentración de carotenoides en la carne de salmón puede relacionarse con la medida instrumental de la coordenada a^* en la misma, aunque de manera no lineal a partir de cierta concentración de pigmentos (Skrede & Storebakken, 1986; No & Storebakken, 1991; Christiansen *et al.*, 1995). De ahí que el descenso observado en los parámetros de color a^* y b^* pueda estar relacionado con la degradación de carotenoides como consecuencia de su papel como antioxidante en los salmónidos (Andersen *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1999). Los procesos de congelación y descongelación pueden promover la oxidación de los carotenoides en filetes de salmón atlántico (Andersen & Steinsholt, 1992; Refsgaard *et al.*, 1998b; Sheehan *et al.*, 1998). Por otro lado, el proceso de congelación y descongelación también modifica la textura del músculo, pudiendo afectar a las propiedades de reflexión de la luz, lo que altera la impresión visual del color de los filetes (Einen *et al.*, 2002). Ozbay *et al.* (2006) sugieren que la pérdida de pigmentación no es resultado de la disminución en la concentración de carotenoides, sino que está relacionada con la desnaturalización proteica, la cual provoca que la apariencia del tejido cambie de translúcida a opaca, dando lugar a la ilusión de la pérdida de pigmentación. Finalmente, cabe señalar que durante la descongelación se produce una pérdida de líquido exudado de

coloración anaranjada; esto se debe a la presencia de carotenoides en el mismo, como resultado de la desnaturalización proteica.

En los filetes *congelados* recubiertos antes de la congelación (RAC) (*Tabla 4.4*), las muestras envueltas con CPS mostraron valores inferiores, aunque no significativamente, de a^* que las sin envuelta. Además, las muestras con CPS+glicerol presentaron menores valores de L^* y blancura. También en las muestras RAC, *tras la descongelación*, los filetes sin envuelta presentaron valores mayores de las coordenadas a^* y b^* , esta vez significativos, en comparación con los filetes envueltos. En concreto, las muestras de CPS+glicerol 2:1 presentaron los valores más bajos para ambas coordenadas. Respecto a la luminosidad y blancura, las muestras recubiertas con CPS y CPS+glicerol obtuvieron valores más elevados con diferencias significativas en comparación con las muestras sin envuelta y las muestras envueltas con CPS+sorbitol. Estas tendencias no coinciden con las descritas por Ambardekar (2007) al aplicar envueltas de CPS con glicerol (2,5:1; proteína:plastificante aproximadamente) en filetes de salmón rosado congelados durante tres meses. Este autor no encontró diferencias significativas en las coordenadas a^* y b^* entre las muestras con CPS y las muestras sin envuelta, encontrando que éstas últimas presentaban valores significativamente superiores de L^* y blancura. Estas diferencias en los resultados podrían deberse a la menor cantidad de envuelta fijada en el caso del estudio de Ambardekar (2007), según los datos de rendimiento obtenidos (0,8%) en comparación con el presente trabajo (*Tabla 4.2*), lo que supondría que una menor cantidad de envuelta presente en los filetes tras su descongelación y, por tanto, una menor influencia en el color de los mismos.

En los filetes *congelados* recubiertos después de la congelación (RDC) (Tabla 4.5), los valores de L^* y blancura fueron mayores en las muestras recubiertas (tanto las glaseadas como las que tenían CPS) que en las sin envuelta. En dichas muestras RDC, *tras la descongelación*, los filetes sin envuelta mostraron valores significativamente mayores de las coordenadas a^* y b^* en comparación con el resto de filetes envueltos, al igual que ocurría en las muestras RAC. Por otro lado, las muestras glaseadas presentaron valores significativamente menores de esas coordenadas en comparación con el resto de las muestras recubiertas o no. Las muestras con CPS+glicerol también presentaron aquí los menores valores de a^* y b^* de entre los distintos recubrimientos proteicos utilizados, aunque las diferencias en este caso no son tan significativas estadísticamente como en las muestras RAC. En relación a la luminosidad y blancura, las muestras CPS+sorbitol 1:1 presentaron los valores significativamente más elevados en comparación con el resto de muestras con o sin envuelta.

Los filetes *cocinados*, para ambos momentos de aplicación de las envueltas, presentaron valores de luminosidad y blancura mucho más elevados, y coordenadas a^* y b^* mucho menores que las muestras sin cocinar. El incremento de la luminosidad del músculo de pescado tras el cocinado puede deberse a la migración del colágeno, el cual se sitúa entre los miotomos (segmentos musculares) (Sikorski *et al.*, 1984). Este incremento también fue observado por Sathivel (2005) y Ambardekar (2007) tras el cocinado de filetes de salmón rosado con diferentes envueltas. Los valores más bajos de a^* y b^* respecto al *descongelado* podrían deberse a la destrucción de los carotenoides, principalmente astaxantina y cantaxantina por calor debido a su naturaleza termolábil (Borsarelli & Mercadante, 2010), lo que da lugar a una

decoloración generalizada y a la pérdida del color característico del salmón. Por otro lado, los carotenoides en el salmón se encuentran unidos a la α -actinina del complejo actomiosina y a otras proteínas (Ojagh *et al.*, 2010), por lo que la desnaturalización proteica debida al calor también podría modificar el color de la carne (Ojagh *et al.*, 2011). El aumento de L^* y el descenso de a^* y b^* en el salmón cocinado ha sido descrito también por otros autores (Skrede & Storebakken, 1986; Ojagh *et al.*, 2010, 2011).

La presencia de recubrimientos no tiene una influencia clara en el color del salmón cocinado, aunque sí se observa que la envuelta CPS+glicerol 2:1, tanto en muestras RAC como en RDC, da lugar a valores de luminosidad y blancura significativamente mayores y valores de a^* y b^* menores en comparación con el resto.

El momento de aplicación de la envuelta afecta al color de los filetes. Los filetes *congelados* correspondientes a las muestras RDC presentaron mayores valores de L^* ($p < 0,001$), blancura ($p < 0,001$) y b^* ($p < 0,01$) que las RAC, por lo que la variación de color en los filetes *congelados* es mayor cuando aplicamos las envueltas tras la congelación. Tras la *descongelación* de los filetes, los RDC presentaron mayores valores de a^* ($p < 0,01$) y b^* ($p < 0,01$) y menores de L^* ($p < 0,001$) y blancura ($p < 0,001$) en relación con los RAC. Esta tendencia se mantiene también tras el *cocinado*, aunque aquí las diferencias en los valores de L^* y blancura se difuminaron debido al efecto del calor. Por tanto, al aplicar las envueltas tras la congelación se obtienen menores diferencias de coloración respecto a los filetes sin envuelta iniciales.

Las diferencias observadas entre los dos momentos de aplicación podrían relacionarse con los resultados obtenidos de rendimiento tras la descongelación. Como se constató en la *Tabla 4.2*, las muestras RDC presentaron menores *pérdidas al descongelar*, lo cual podría relacionarse con una menor cantidad de líquido exudado y por consiguiente una menor desnaturalización proteica. Estos datos apoyarían la hipótesis de que las variaciones de color tras la descongelación están relacionadas con la desnaturalización proteica (ya sea por menor pérdida de pigmentos en el exudado o por una menor modificación de las propiedades reflectivas del músculo), puesto que son las muestras RDC las que presentan una menor variación de color (mayores valores de las coordenadas a^* y b^*). También es posible que la estructura de la envuelta sea diferente (quizás más homogénea) cuando se aplica a una superficie congelada; en este caso, los carotenoides estarían más protegidos contra la oxidación que cuando la envuelta se coloca en muestras no congeladas.

En relación al efecto del plastificante, no se han encontrado diferencias en las muestras *congeladas*. Sin embargo, las muestras *descongeladas* y las *cocinadas* con glicerol presentaron unos niveles significativamente menores de a^* y b^* en comparación con las de sorbitol. Además mostraron además unos valores significativamente mayores ($p < 0,01$) de L^* y blancura en los filetes cocinados al compararlas con las de sorbitol, teniendo así la utilización de este último un menor impacto sobre el color de los filetes.

4.5. Índices de oxidación.

Los contenidos medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los indicadores de oxidación obtenidos por el valor de *dienos conjugados*, el índice o valor de *peróxidos* y el valor de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (*SRATB*) se muestran en la *Tabla 4.6*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Los valores de los *dienos conjugados* vienen expresados en milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos, los *peróxidos* en miliequivalentes de cumene por kg de carne o de lípidos y los compuestos secundarios (*SRATB*) en mg de malondialdehído por kg de carne o de lípidos.

Los contenidos medios de *dienos conjugados* en los filetes RAC oscilaron entre 33,67 y 50,30 milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos. Las muestras recubiertas con CPS+sorbitol 1:1 presentaron los valores más elevados ($p < 0,05$), seguidas de las muestras CPS+sorbitol 2:1, aunque en este caso las diferencias no fueron significativas con el resto de envueltas aplicadas ($p \geq 0,05$). En los filetes RDC, los valores medios se encontraron entre 33,71 y 51,41 milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos. En este caso, fueron las muestras glaseadas las que presentaron los contenidos más elevados.

Tabla 4.6. Indicadores de la oxidación lipídica (media \pm desviación estándar) de los filetes de pescado RAC y RDC tras 4 meses de almacenamiento en congelación.

Muestras	Valor de peróxidos				
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Densos conjugados					
Recubiertas antes de congelar					
Sin envuelta	33,78 \pm 3,27a	2,44 \pm 0,04a	12,21 \pm 1,11b	2,37 \pm 0,22c	11,51 \pm 0,81c
CPS	33,67 \pm 0,85a	2,50 \pm 0,18a	11,14 \pm 0,53b	2,01 \pm 0,24bc	8,94 \pm 0,88b
CPS+sorbitol 1:1	50,30 \pm 6,43b	2,07 \pm 0,23a	10,20 \pm 1,54ab	1,82 \pm 0,32ab	8,85 \pm 0,24b
CPS+sorbitol 2:1	42,18 \pm 5,13ab	2,16 \pm 0,28a	12,78 \pm 2,12b	1,49 \pm 0,26a	8,77 \pm 1,28b
CPS+glicerol 1:1	34,79 \pm 9,42a	2,30 \pm 0,34a	8,19 \pm 1,87a	1,61 \pm 0,30ab	6,06 \pm 1,27a
CPS+glicerol 2:1	34,30 \pm 1,90a	2,38 \pm 0,35a	10,39 \pm 1,08ab	1,89 \pm 0,11ab	8,15 \pm 0,53b
Recubiertas tras congelar					
Sin envuelta	37,09 \pm 6,38a	2,69 \pm 0,12d	13,53 \pm 0,59d	2,51 \pm 0,32e	12,67 \pm 0,75c
Glaseado	51,41 \pm 10,68b	2,86 \pm 0,31d	13,27 \pm 1,60d	2,09 \pm 0,15d	10,48 \pm 0,91b
CPS	40,65 \pm 9,03ab	1,96 \pm 0,11bc	10,92 \pm 0,79bc	1,53 \pm 0,34c	7,80 \pm 0,45a
CPS+sorbitol 1:1	33,71 \pm 1,56a	2,09 \pm 0,33c	11,82 \pm 1,64cd	1,42 \pm 0,14bc	8,02 \pm 0,66a
CPS+sorbitol 2:1	38,39 \pm 8,32a	1,43 \pm 0,20a	9,23 \pm 1,00ab	1,11 \pm 0,13ab	7,30 \pm 0,93a
CPS+glicerol 1:1	39,37 \pm 1,55a	1,64 \pm 0,16ab	12,18 \pm 1,13cd	0,91 \pm 0,06a	6,89 \pm 0,53a
CPS+glicerol 2:1	39,61 \pm 1,16a	1,77 \pm 0,33ab	8,30 \pm 1,60a	1,46 \pm 0,16bc	6,85 \pm 0,78a
A	ns	***	ns	***	ns
B	ns	ns	ns	ns	**

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

SRATB: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

(1): mMol hidroperóxidos/kg lípidos

(2): meq de cumene/kg carne; (3): meq de cumene/kg lípidos

(4): meq de malondialdehído/kg carne; (5): meq de malondialdehído/kg lípidos

Los valores medios de *peróxidos* en las muestras RAC (*Tabla 4.6*) fluctuaron entre 2,07 y 2,50 meq de cumene por kg de carne, no encontrándose diferencias significativas entre las distintas muestras ($p \geq 0,05$). Sin embargo, al expresar los valores respecto al contenido en grasa, las cantidades oscilaron entre 8,19 y 12,78 meq de cumene por kg de lípidos, siendo las muestras envueltas con CPS+glicerol 1:1 las que presentaron los menores valores. Por el contrario, los filetes RDC (*Tabla 4.6*) presentaron contenidos entre 1,43 y 2,86 meq de cumene por kg de carne y entre 8,30 y 13,27 meq de cumene por kg de lípidos. En ambos casos los filetes sin envuelta y los glaseados presentaron los mayores valores de peróxidos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se asemejan a los obtenidos por Stuchell & Krochta (1995), los cuales, utilizando envueltas de aislado proteico de lactosuero (APS), con antioxidante (ácido ascórbico) o mezclado con monoglicéridos acetilados, obtuvieron reducciones significativas en los niveles de peróxidos en el salmón envuelto, tras 77 días de congelación, en comparación con las muestras control (sin envuelta).

En relación a los *productos de oxidación secundarios*, los resultados indican que los filetes recubiertos con CPS en cualquiera de las formulaciones testadas presentan una menor oxidación que las muestras sin recubrimiento o glaseadas. Los valores medios de *SRATB* en las muestras RAC (*Tabla 4.6*) oscilaron entre 1,49 y 2,01 mg de malondialdehído por kg de carne, siendo el valor significativamente mayor en los filetes sin envuelta (2,37 mg) en comparación con los filetes envueltos, cualesquiera que fuera su formulación. La misma tendencia se observa al expresar los datos de oxidación en relación con el contenido graso, obteniéndose valores de entre 6,06 y 8,94 mg de malondialdehído por kg de lípidos. De nuevo, los contenidos de *SRATB* son

superiores significativamente en las muestras sin envuelta (11,51 mg) en comparación con los recubiertos con CPS con o sin plastificante.

En las muestras RDC, los valores de *SRATB* (Tabla 4.6) se encontraron en un rango entre 0,91 y 2,09 mg de malondialdehído por kg de carne. Tanto las muestras sin envuelta (2,09 mg) como las muestras glaseadas (2,51 mg) presentaron cantidades significativamente superiores en comparación con los filetes envueltos con CPS, independientemente del tipo de plastificante o proporción utilizada. Como en el caso anterior, la tendencia se repite al expresar los resultados en función del contenido graso, obteniendo valores entre 6,85 y 10,48 mg de malondialdehído por kg de lípidos. De nuevo, los valores son significativamente mayores en las muestras sin envuelta y glaseadas (12,67 y 10,48 mg respectivamente).

Los valores de *SRATB* encontrados en el presente estudio para las distintas envueltas de CPS son ligeramente superiores a los descritos por Ambardekar (2007) en filetes de salmón rosado recubiertos con CPS+glicerol (4,7% proteína/1,8% plastificante) almacenados en congelación durante tres meses (0,74 mg malondialdehído/kg carne). Esta diferencia podría deberse al mes menos que han estado en congelación y al diferente contenido lipídico de los pescados. Por otro lado, si referimos la oxidación de los filetes recubiertos en función de la oxidación de los filetes sin envuelta, obtendríamos que en el trabajo de Ambardekar (2007) los filetes con CPS+glicerol presentarían un 24,81% menos de oxidación respecto a los sin envuelta, mientras que en el presente estudio esta reducción podría llegar hasta un 37,13% en las muestras RAC y 63,74% en las RDC.

Otros estudios obtuvieron también resultados similares de SRATB en salmón rosado tras tres meses en congelación, habiendo utilizado envueltas proteicas a partir de soja, ovoalbúmina o hidrolizados proteicos de proteínas de pescado (fletán del Pacífico) (Sathivel, 2005). En ese estudio las reducciones serían de un 57,57% para las envueltas de soja e hidrolizados de fletán, y de un 45,45% para las envueltas de ovoalbúmina en relación a las no envueltas. De nuevo, habría que tener en cuenta que la duración del estudio de Sathivel (2005) es de tres meses, un mes menos que el presente estudio. Kilinceker *et al.* (2009) también han descrito menores niveles de oxidación lipídica en filetes de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) recubiertos con diversas proteínas, gomas y harinas, y almacenados en congelación durante siete meses, observando los menores valores de SRATB al utilizar envueltas elaboradas con una mezcla de caseínas.

Es preciso señalar que en este trabajo los valores de los *índices de oxidación (peróxidos y SRATB)* del pescado glaseado son superiores a los obtenidos para los distintos tipos de envueltas de CPS. Sathivel *et al.* (2008) observaron que los filetes envueltos con proteína de abadejo de Alaska, hidrolizada durante diez minutos, presentaban menores valores de SRATB que las muestras glaseadas, con agua o con glicerol, tras cuatro meses de almacenamiento en congelación. Un efecto similar también se ha descrito al utilizar envueltas de quitosano en filetes de salmón rosado almacenados en congelación durante ocho meses (Sathivel *et al.*, 2007).

Los valores de los distintos *índices de oxidación* indican que la aplicación de envueltas de CPS es efectiva a la hora de reducir la oxidación lipídica en el salmón del Atlántico congelado, proporcionando una mejor

protección frente a la misma que el glaseado, lo cual es muy importante en este pescado por su alto contenido graso. Por otra parte, el empleo de glicerol como plastificante parece retrasar más la oxidación en comparación con el sorbitol. Sin embargo, no es posible establecer una diferencia clara entre las diferentes proporciones de plastificantes utilizadas. Finalmente, se observa que la aplicación de la envuelta tras la congelación minimiza la oxidación lipídica.

La reducción de la oxidación lipídica observada podría explicarse de dos maneras. En primer lugar, la envuelta de CPS constituiría una barrera física que funcionaría como barrera al oxígeno, tal como actúan los films basados en proteínas de suero lácteo (McHugh & Krochta, 1994b; Maté & Krochta, 1996; Osés *et al.*, 2009); esto retrasaría la oxidación lipídica. En segundo lugar, estas envueltas presentan actividad antioxidante debida a las proteínas del lactosuero. Como se comentó en la introducción, estas proteínas funcionan como antioxidantes naturales frente a la oxidación lipídica, utilizando diversos mecanismos, como la neutralización de radicales libres mediante los grupos sulfhidrilo de la cisteína y por otros aminoácidos como el triptófano o la tirosina, o a través de la quelación de metales por la transferrina o seroalbúmina bovina (Tong *et al.*, 2000). Esta actividad antioxidante se podría ver incrementada al exponer los grupos y aminoácidos antioxidantes mediante la desnaturalización proteica (Elías *et al.*, 2005), como se ha hecho en este trabajo al calentar las disoluciones de CPS durante su elaboración.

Al comparar los dos momentos de aplicación, se observan cantidades significativamente menores ($p < 0,001$) en las muestras RDC, tanto en el valor de *peróxidos* como en el de *SRATB*, cuando los datos se expresan en kg de carne. Sin embargo, estas diferencias desaparecen al expresar los valores en

función del contenido lipídico ($p \geq 0,05$). Así pues, la aplicación de los recubrimientos de CPS después de la congelación parece reducir la oxidación lipídica de los filetes de salmón, en comparación con la obtenida al aplicar los recubrimientos antes de la congelación. Estos resultados podrían deberse a la mejor adhesión de las envueltas proteicas de CPS sobre la superficie congelada de los filetes que sobre la superficie fresca. Esta mejor adhesión también se vería reflejada en mayores cantidades en las muestras RDC de *rendimiento* (aunque no significativo) y los *rendimientos tras descongelar* ($p < 0,01$), y menores valores de las *pérdidas por goteo al descongelar* ($p < 0,001$) (*Tabla 4.2*). La menor oxidación lipídica en las muestras RDC también se observó en el color del pescado, donde los carotenoides parecieron estar más protegidos contra la oxidación cuando la envuelta se aplicó sobre las muestras ya congeladas (*Tabla 4.5*) respecto a la aplicación sobre filetes frescos (*Tabla 4.4*).

En relación al empleo de sorbitol o glicerol, no se observan diferencias significativas en el valor de *peróxidos* al utilizar uno u otro plastificante ($p \geq 0,05$). Sin embargo, los valores de *SRATB* de las muestras envueltas con CPS+glicerol, expresadas sobre el contenido graso, son significativamente menores a los de las muestras recubiertas con sorbitol ($p < 0,01$). Como ya se comentó en la introducción, cuando se preparan películas independientes a partir de proteínas de lactosuero, es necesaria la adición de algún tipo de plastificante (glicerol, sorbitol, sacarosa, etc.), ya que sin él las películas son quebradizas y poco manejables (Sothorvit & Krochta, 2001). Los plastificantes reducen las uniones intermoleculares entre las moléculas de la base polimérica, aumentando así la flexibilidad y la permeabilidad de las películas, lo cual podría suceder también en los recubrimientos.

Los menores valores de oxidación observados en las envueltas con glicerol en comparación con las de sorbitol parecen chocar con los estudios realizados en películas independientes de β -lactoglobulina (Sothorvit & Krochta, 2000) aislado proteico de lactosuero (McHugh & Krochta, 1994b) y caseínas (Chick & Ustunol, 1998). En estos trabajos las películas elaboradas con sorbitol presentaron una menor permeabilidad al oxígeno que las preparadas con glicerol, constituyendo así estas últimas en teoría una peor barrera frente a la oxidación. Sin embargo, se deben tener en cuenta varios aspectos; en primer lugar, todos estos estudios se realizaron sobre películas independientes y no sobre recubrimientos aplicados a alimentos, por lo que las diversas características de una matriz alimentaria compleja como serían unos filetes de salmón, o la diferencia de estructura entre películas y recubrimientos, podrían modificar el comportamiento de las envueltas. En segundo lugar, el glicerol es un plastificante más efectivo a la hora de mejorar las propiedades mecánicas de las películas (Sothorvit & Krochta, 2001; Danganan & Tomasula, 2006), lo que podría hacer que las envueltas con glicerol también presentasen una mejor consistencia estructural durante el almacenamiento en congelación y una mejor fijación al alimento, lo que desembocaría en una mayor protección del pescado. En último lugar, desde el punto de vista de la capacidad antioxidante de las proteínas, también se ha señalado (Sothornvit *et al.*, 2002) que el glicerol, debido a su bajo peso molecular, mayor higroscopicidad y estado líquido en condiciones ambientales estándar, podría presentar una mayor eficiencia a la hora de interferir en las distintas uniones entre las cadenas proteicas (en comparación con el sorbitol), pudiendo modificar la estructura proteica y exponer grupos y residuos aminoacídicos con poder antioxidante, favoreciendo así la capacidad

antioxidante de las proteínas del lactosuero y reduciendo de esta forma la oxidación lipídica.

El empleo de diferentes proporciones de los plastificantes en la formulación de las envueltas de CPS no ha afectado de manera clara a la oxidación lipídica, a diferencia de lo que se ha constatado para varios plastificantes en películas secas, incluidos el sorbitol y el glicerol, en las que un aumento de la cantidad de plastificante utilizada incrementa la permeabilidad al oxígeno (Sothorvit & Krochta, 2000; Osés *et al.*, 2008). Por tanto, en nuestro caso, los recubrimientos CPS+glicerol 1:1 y CPS+sorbitol 1:1 deberían tener la mayor permeabilidad al oxígeno y por tanto, los mayores valores de oxidación. Sin embargo, parece que en los recubrimientos de CPS no sucede lo observado en las películas en relación a este aspecto.

Finalmente, analizando por separado los distintos tipos de envueltas testadas observamos que la envuelta elaborada con CPS más eficaz desde el punto de vista de la protección frente a la oxidación lipídica, fue la CPS+glicerol 1:1 especialmente la RAC, cuya utilización supondría una reducción de los valores de *SRATB* del 47,35% respecto a los filetes sin envuelta.

Capítulo 5 Aplicación de recubrimientos elaborados con ovoalbúmina purificada (OVO) en salmón del Atlántico congelado: efecto del plastificante y del momento de aplicación

5.1. Características del salmón empleado como materia prima

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los distintos parámetros de caracterización de la carne de salmón utilizada como materia prima en este estudio, se muestran en la *Tabla 5.1*. Se incluye la *composición química*, los valores de *pH* y *color* CIELab y los *índices de oxidación lipídica*.

Tabla 5.1. Caracterización fisicoquímica del salmón utilizado como materia prima (media \pm desviación estándar).

Composición	
Extracto seco (g/100 g carne)	34,72 \pm 4,22
Lípidos (g/100 g carne)	13,52 \pm 4,83
Cenizas (g/100 g carne)	1,17 \pm 0,09
pH	
	6,20 \pm 0,13
Color	
L*	43,04 \pm 6,59
a*	16,33 \pm 2,37
b*	17,25 \pm 3,06
Blancura	38,73 \pm 6,93
Índices de oxidación lipídica	
Dienos conjugados (mMol hidroperóxidos/kg lípidos)	40,84 \pm 10,87
Peróxidos (meq cumene/kg carne)	0,69 \pm 0,20
Peróxidos (meq cumene/kg lípidos)	5,41 \pm 1,94
Valor SRATB (mg MDA/kg carne)	0,15 \pm 0,11
Valor SRATB (mg MDA/kg lípidos)	1,14 \pm 0,74

SRATB: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

MDA: malondialdehído

La composición química descrita en este trabajo para el salmón del Atlántico se ajusta en rasgos generales con las descritas por Shearer *et al.* (1994). Sin embargo, se observaron ciertas diferencias respecto a la explicada para el salmón fresco empleado en el *Capítulo 4, apartado 4.1* en los contenidos graso y de extracto seco. En este caso la cantidad de lípidos fue inferior (13,52%) debido posiblemente a variaciones biológicas, bien intrínsecas, como el estado nutricional o grado de madurez sexual de los especímenes o bien extrínsecas, como la estación del año en la que los animales fueron capturados (Hamilton *et al.*, 2005). Las diferencias respecto al extracto seco vendrían dadas por los distintos contenidos lipídicos, debido a la relación inversa existente entre el contenido en agua y el contenido en grasa en el músculo de los pescados (Aubourg *et al.*, 2005).

El valor de *pH* encontrado en el salmón inicial (6,20) se explica por la producción de ácido láctico a partir de glucógeno a través del metabolismo anaeróbico *postmortem* (Love, 1988) y es algo superior al *pH* (6,11) señalado en el pescado fresco del capítulo anterior. El descenso del *pH* debido a la acumulación de ácido láctico depende de diversos factores como la estación del año (Morkore & Rorvik, 2001), la edad del animal (Lavéty *et al.*, 1988), el grado de madurez del mismo (Aksnes *et al.*, 1986) y el estado metabólico o nutricional del pez en el momento de la muerte (Abbas, 2008).

La medida instrumental del *color* del salmón fresco coincide en general con los rangos descritos para los parámetros CIELab en el salmón atlántico por Christiansen *et al.* (1995). Las coordenadas *a** y *b** presentaron valores medios inferiores a los descritos en el salmón utilizado en el *Capítulo 4*, lo que resulta fácilmente explicable por el menor contenido lipídico, ya que un menor

contenido graso da lugar a valores inferiores de a^* y b^* (Skrede & Wold, 2008). También se observó un mayor valor de L^* que en la carne de los salmones descritos en el capítulo anterior.

Respecto a los *índices de oxidación lipídica*, el contenido medio de peróxidos inicial (0,69 meq cumene/kg carne) fue algo inferior al valor de 1,34 meq/kg carne descrito en el trabajo de Stuchell & Krotcha (1995) con salmón real. Por otro lado, el valor medio obtenido para las SRATB (1,14 mg MDA/kg lípidos) es similar a los descritos para el salmón rosado por Sathivel (2005) y Sathivel *et al.* (2007, 2008). Finalmente, puede observarse que, en conjunto, los datos indicaron un estado de oxidación inicial más temprano (mayores valores de peróxidos y menores de SRATB) en el salmón utilizado para la aplicación de las envueltas OVO que en el empleado con las envueltas de CPS.

5.2. Rendimientos, pérdidas por goteo y por cocinado.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *rendimiento*, *rendimiento tras descongelar*, *las pérdidas por goteo al descongelar*, *las pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, *las pérdidas por cocinado* y los valores de *pH* de los filetes de salmón tras el almacenamiento, se muestran en la *Tabla 5.2*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Todos los parámetros, a excepción del *pH*, vienen expresados en tanto por ciento (%).

Tabla 5.2. Rendimiento, rendimiento al descongelar, pérdidas por goteo al descongelar y tras almacenamiento en refrigeración, pérdidas por cocinado y pH tras descongelación (media \pm desviación estándar) de muestras recubiertas con OVO tras 4 meses de almacenamiento en congelación a -20 °C.

Muestras	Rendimiento (%)	Rendimiento (%) tras descongelar (%)	Pérdidas por goteo al descongelar (%)	Pérdidas por goteo tras refrigeración (%)	Pérdidas por cocinado (%)	pH
Recubiertas antes de congelar						
Sin envuelta	99,95 \pm 0,53a	96,46 \pm 0,79a	3,48 \pm 0,96a	9,75 \pm 1,24b	13,38 \pm 1,12a	6,29 \pm 0,02a
OVO	101,33 \pm 0,76b	97,15 \pm 0,92a	4,12 \pm 0,25ab	9,72 \pm 1,60b	12,52 \pm 2,34a	6,30 \pm 0,04a
OVO+sorbitol 1:1	101,71 \pm 0,69b	97,23 \pm 1,84a	4,41 \pm 1,17ab	7,71 \pm 0,78a	12,47 \pm 2,38a	6,28 \pm 0,02a
OVO+sorbitol 2:1	100,84 \pm 0,62ab	96,90 \pm 0,91a	3,91 \pm 0,44ab	8,02 \pm 0,42ab	11,57 \pm 1,97a	6,27 \pm 0,02a
OVO+glicerol 1:1	101,27 \pm 0,63b	97,60 \pm 0,49a	3,62 \pm 0,16ab	7,22 \pm 0,69a	12,09 \pm 0,58a	6,28 \pm 0,03a
OVO+glicerol 2:1	101,38 \pm 0,87b	96,36 \pm 1,67a	4,96 \pm 0,94b	7,73 \pm 0,59a	11,42 \pm 1,33a	6,28 \pm 0,03a
Recubiertas tras congelar						
Sin envuelta	99,58 \pm 1,07a	96,13 \pm 0,87a	3,45 \pm 1,06a	10,16 \pm 0,56a	12,61 \pm 0,99ab	6,30 \pm 0,02a
Glaseado	100,59 \pm 0,31ab	95,98 \pm 0,49a	4,48 \pm 0,78ab	16,51 \pm 0,99b	13,84 \pm 0,49b	6,31 \pm 0,01a
OVO	101,11 \pm 0,87b	95,95 \pm 0,70a	5,09 \pm 1,45ab	11,85 \pm 1,36a	11,69 \pm 1,81a	6,29 \pm 0,01a
OVO+sorbitol 1:1	101,46 \pm 1,00b	95,03 \pm 0,10a	6,34 \pm 0,87b	12,30 \pm 3,85a	12,87 \pm 1,21ab	6,29 \pm 0,03a
OVO+sorbitol 2:1	101,36 \pm 0,90b	95,35 \pm 2,17a	5,94 \pm 1,30b	12,65 \pm 3,36ab	12,93 \pm 0,91ab	6,26 \pm 0,04a
OVO+glicerol 1:1	101,24 \pm 0,78b	95,68 \pm 1,66a	5,50 \pm 0,92b	10,22 \pm 1,99a	12,34 \pm 0,88ab	6,28 \pm 0,04a
OVO+glicerol 2:1	100,73 \pm 0,42ab	94,96 \pm 1,09a	5,73 \pm 1,46b	9,13 \pm 1,36a	12,65 \pm 0,82ab	6,28 \pm 0,03a
A	ns	**	***	***	ns	ns
B	ns	ns	ns	ns	ns	ns

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar (RAC) versus después de congelar (RDC); * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

La aplicación de envueltas proteicas de OVO aumenta significativamente ($p < 0,05$) el *rendimiento* de los filetes, al igual que se ha visto con las envueltas de CPS en el capítulo anterior (*Capítulo 4, apartado 4.2*). Los incrementos en los rendimientos medios son del 0,89-1,76% para las muestras RAC y del 1,01-1,88% para las muestras RDC. Se observa un mayor incremento con OVO+sorbitol 1:1, tanto en las muestras RAC (1,76%) como en las RDC (1,88%). Diversos autores ya obtuvieron aumentos en los rendimientos de filetes de pescado almacenados en congelación, al aplicar distintos tipos de envueltas comestibles, como se ha comentado en el capítulo anterior (Sathivel 2005; Ambardekar, 2007; Sathivel *et al.*, 2007, 2008). Sathivel (2005) describió un aumento del rendimiento del 2,3% al utilizar envueltas de ovoalbúmina con glicerol (2:1 proteína:plastificante aprox.). Aunque este porcentaje es superior al descrito en el presente trabajo (1,43% para OVO+glicerol 2:1 RAC), hay que señalar que el valor descrito por Sathivel (2005) está ligeramente sobreestimado al considerar el rendimiento de los filetes sin envuelta del 100%. Los datos obtenidos de rendimiento también indican la formación de recubrimientos de mayor grosor en las muestras de OVO+sorbitol 1:1, tanto en las muestras RAC como en las RDC. Finalmente, cabe señalar que los incrementos de rendimiento obtenidos con los recubrimientos de OVO son menores a los obtenidos con las envueltas de CPS (*Capítulo 4, apartado 4.3*), aunque en ambos casos es superior al rendimiento obtenido con el glaseado. Por tanto, aunque se produce una fijación satisfactoria de las envueltas de OVO sobre los filetes de pescado, ésta es de menor magnitud que la observada con las envueltas de CPS.

Los *rendimientos tras descongelar* de las muestras no presentan diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre la presencia o no de envueltas ni entre

las distintas formulaciones de las mismas, tanto en las muestras RAC como en las RDC, oscilando los valores del 96,36-97,60% y del 95,03-95,98% respectivamente. Este resultado difiere del señalado para las envueltas con CPS, que presentaron rendimientos tras descongelar superiores a los de las muestras sin envuelta o glaseadas. Por tanto, parece que los recubrimientos con OVO se pierden en gran medida durante la descongelación.

Las *pérdidas por goteo al descongelar* en las muestras sin envuelta (3,48% RAC; 3,45% RDC) son significativamente menores que en el resto. Estos resultados indican que parte de la envuelta se pierde durante el proceso de descongelación. Sathivel (2005) observó un comportamiento similar en este parámetro utilizando diferentes tipos de recubrimientos, entre ellos un recubrimiento con proteína de huevo purificada. El origen de estas pérdidas se podría encontrar en la pérdida de parte de las envueltas conjuntamente con el exudado producido en la descongelación.

En relación a las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, no se observó una tendencia clara. En las muestras RAC los filetes envueltos con OVO, con un tipo u otro de plastificante, presentan menores pérdidas que los filetes sin envuelta. En las muestras RDC, por su parte, las muestras glaseadas presentan las mayores pérdidas (16,51%).

Las muestras RAC presentaron *pérdidas por cocinado* sin diferencias significativas entre sí y con los filetes sin envuelta, oscilando entre un 11,42 y un 13,38%. En las muestras RDC, sólo se observaron diferencias significativas entre las muestras glaseadas (13,84%) y las muestras sólo con OVO (11,69%). Por lo tanto, la utilización de envueltas no afecta al

rendimiento de los filetes durante su cocinado, como también se describió en las envueltas de CPS (*Capítulo 4, apartado 4.3*). Esta observación es compartida por Sathivel (2005) para envueltas de quitosano, concentrado proteico de soja, ovoalbúmina e hidrolizados proteicos de pescados (pérdidas del 11,2-15,8%); y Ambardekar (2007) para recubrimientos elaborados con proteína de lactosuero (CPS), concentrado proteico de soja e hidrolizados proteicos de fletán obtenidos por diferentes métodos (pérdidas del 7,4-12,2%). Concretamente para una envuelta de ovoalbúmina con glicerol (2:1 proteína:plastificante aprox.), Sathivel (2005) observó unas pérdidas del 15,1%. Este valor es superior al observado en el presente estudio para OVO+glicerol 2:1 RAC (11,42%).

El tipo de envuelta utilizada no afecta significativamente a los valores pH tras el almacenamiento. Tras el almacenamiento en congelación, al igual que se señaló en el capítulo anterior, se observó un aumento importante del pH, en comparación con el inicial en fresco (6,20), tanto en las muestras sin envuelta como en las muestras con envuelta proteica con o sin plastificante (6,27-6,31).

El momento de aplicación del recubrimiento afecta significativamente a los *rendimientos tras descongelar* ($p < 0,01$), a las *pérdidas por goteo al descongelar* ($p < 0,001$) y a las *pérdidas por goteo tras almacenamiento* ($p < 0,001$). Cuando la aplicación de la envuelta se produce antes de la congelación de los filetes el *rendimiento tras descongelar* es significativamente mayor y las *pérdidas por goteo al descongelar* y *tras el almacenamiento* son significativamente menores. Estos resultados pueden deberse a la mejor adhesión de las envueltas proteicas de OVO sobre la

superficie fresca de los filetes que sobre la superficie congelada. Esta mejor adhesión difiere de lo señalado con los recubrimientos con CPS, donde se señalaba que había mejor adhesión de las envueltas proteicas de CPS sobre la superficie congelada de los filetes que sobre la superficie fresca.

En relación al empleo de los dos tipos de plastificantes, no existen diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre la utilización de glicerol o sorbitol en ninguno de los parámetros estudiados.

5.3. Extracto seco, lípidos y cenizas

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *extracto seco*, *extracto seco magro*, *contenido en lípidos* y *contenido en cenizas* de los filetes de salmón tras el almacenamiento en congelación y *el extracto seco tras cocinado*, se muestran en la *Tabla 5.3*. En ésta también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Los valores del *extracto seco*, *extracto seco magro*, *extracto seco tras cocinado*, *grasa* y *cenizas* vienen expresados en g/100 g de carne.

El contenido lipídico medio de los filetes varió entre un 19,01 y 26,36% tanto en RAC como en RDC, observándose una gran oscilación como sucedía con los filetes recubiertos de CPS en el *Capítulo 4 (apartado 4.2)*. Esta variabilidad en el contenido graso de los filetes puede atribuirse a diferencias interindividuales debidas a la especie (Hamilton *et al.*, 2005), del grado de maduración sexual (Refsgaard *et al.*, 1998a), de la estación del año

Tabla 5.3. Extracto seco, extracto seco magro, contenidos en lípidos y cenizas de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en congelación y extracto seco tras cocinado, (g/100g pescado; media \pm desviación estándar).

Muestras	Descongeladas			Cocinadas	
	Extracto seco	Contenido lipídico	Extracto seco magro	Cenizas	Extracto seco tras cocinado
Recubiertas antes de congelar					
Sin envuelta	38,76 \pm 1,39a	19,01 \pm 4,68a	19,75 \pm 4,11c	1,15 \pm 0,05b	41,17 \pm 0,97a
OVO	37,53 \pm 1,02a	26,36 \pm 3,01b	11,16 \pm 2,31a	1,12 \pm 0,04b	41,71 \pm 2,29a
OVO+sorbitol 1:1	38,82 \pm 0,74a	24,30 \pm 0,48b	14,53 \pm 0,34ab	1,11 \pm 0,02ab	41,86 \pm 3,36a
OVO+sorbitol 2:1	38,50 \pm 0,98a	23,41 \pm 2,58ab	15,10 \pm 1,64b	1,08 \pm 0,06ab	40,32 \pm 0,83a
OVO+glicerol 1:1	38,33 \pm 1,26a	21,82 \pm 3,09ab	16,51 \pm 1,85cb	1,12 \pm 0,02b	40,78 \pm 1,38a
OVO+glicerol 2:1	37,74 \pm 1,82a	23,85 \pm 2,03ab	13,89 \pm 0,22ab	1,05 \pm 0,03a	40,47 \pm 0,66a
Recubiertas tras congelar					
Sin envuelta	39,46 \pm 2,03b	19,76 \pm 3,92a	19,69 \pm 2,34a	1,11 \pm 0,04ab	41,86 \pm 1,66b
Glaseado	37,72 \pm 1,22ab	19,07 \pm 2,53a	18,65 \pm 1,98a	1,17 \pm 0,05b	39,07 \pm 0,34a
OVO	38,92 \pm 0,83b	19,40 \pm 4,57a	19,51 \pm 4,01a	1,08 \pm 0,02a	42,15 \pm 1,14b
OVO+sorbitol 1:1	38,60 \pm 0,69ab	21,16 \pm 2,72a	17,44 \pm 2,03a	1,08 \pm 0,04a	41,79 \pm 2,19b
OVO+sorbitol 2:1	37,73 \pm 0,91ab	18,02 \pm 1,36a	19,71 \pm 0,78a	1,08 \pm 0,06a	40,42 \pm 1,19ab
OVO+glicerol 1:1	37,03 \pm 0,23a	21,23 \pm 4,95a	15,81 \pm 4,78a	1,05 \pm 0,04a	39,93 \pm 0,95ab
OVO+glicerol 2:1	37,78 \pm 0,27ab	21,15 \pm 4,93a	16,63 \pm 5,09a	1,03 \pm 0,05a	39,74 \pm 2,11ab
A	ns	**	**	ns	ns
B	ns	ns	ns	ns	ns

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

(Roth *et al.*, 2005), alimentación, tamaño (Shearer *et al.*, 1994; Hemre & Sandnes, 1999) e intraindividuales como sección del pez a la que corresponden los filetes, tanto en el eje longitudinal como ventral (Kinsella *et al.*, 1977; Polvi & Ackman, 1992; Bell *et al.*, 1998; Katikou *et al.*, 2001). La elevada variabilidad observada en el presente trabajo concuerda con los datos obtenidos por Refsgaard *et al.* (1998a) que obtuvieron contenidos grasos entre 9 y 21% para los filetes de distintas regiones de salmones del Atlántico. También Morkore *et al.* (2001) observaron contenidos variables en filetes obtenidos de diferentes regiones corporales en salmones criados en granja (14,5-21,8%).

Por lo tanto, las diferencias observadas en relación al contenido en grasa entre distintas envueltas y los distintos momentos de aplicación pueden explicarse como resultado de la variabilidad inter- e intraindividual de los salmones y no como consecuencia del almacenamiento en congelación, ni de la aplicación de recubrimientos de OVO, ni del momento de aplicación.

El contenido medio en *extracto seco* de los filetes en fresco fue de un 34,72%, lo que supone un contenido en humedad del 65,28% (*Tabla 5.1*). Tras cuatro meses en congelación, los filetes sin envuelta descongelados presentaron un contenido en extracto seco del 38,76-39,46% (humedad del 60,54-61,24%), lo que supone una pérdida de humedad de un 4,88-4,04%. Sathivel (2005) también observó pérdidas de humedad de un 4,1% en salmón rosado tras tres meses de almacenamiento en congelación sin envuelta. Las diferencias en los porcentajes de pérdidas con el capítulo anterior (*Capítulo 4, apartado 4.2*) se podrían explicar por las diferencias en el contenido graso entre los pescados utilizados.

Como se señaló en el capítulo anterior, teniendo en cuenta la elevada variabilidad en el contenido graso de los filetes utilizados para cada tipo de recubrimiento, se calculó el contenido en *extracto seco magro* de las muestras. El contenido medio en *extracto seco magro* de las muestras osciló entre 14,70 y 21,27%, lo que significaría valores de humedad de la materia magra de un rango del 78,28-85,30%.

En las muestras RAC, los filetes sin envuelta presentaron contenidos superiores en *extracto seco magro* (menores contenidos en humedad) que aquellos filetes recubiertos con OVO en cualquier formulación, siendo los filetes recubiertos con OVO sin plastificante los que presentaron un *extracto seco magro* significativamente menor, y por tanto los de mayor contenido en humedad tras el almacenamiento. Sathivel (2005) también describió mayores contenidos en humedad en filetes de salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*) tras tres meses de congelación, recubiertos con envueltas proteicas de ovoalbúmina y de soja, en comparación con los filetes sin envuelta. Igualmente Stuchell & Krochta (1995) encontraron mayores valores de humedad en filetes de salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) recubiertos con soluciones de aislado proteico de proteínas de lactosuero y ácidos grasos monoacetilados (Myvacet 9-08) tras tres meses en congelación. Sin embargo, cuando aplicamos las envueltas tras la congelación, no se observaron diferencias significativas entre las muestras en relación al contenido de extracto seco magro.

Los valores de *extracto seco magro* de las muestras RDC fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) que los obtenidos para los filetes RAC. Por lo tanto, el momento de la aplicación de la envuelta influyó de manera

significativa el contenido en extracto seco magro (humedad), lo cual podría atribuirse a una mejor protección frente a la pérdida de humedad durante el almacenamiento en congelación, cuando la envuelta es aplicada antes de la congelación. Esta hipótesis se complementa con los datos de las *pérdidas por goteo al descongelar* (Tabla 5.2), que fueron menores en las muestras RAC, indicando así la mejor protección frente a la pérdida de humedad cuando los filetes son recubiertos antes de la congelación.

Finalmente, todos los filetes presentaron contenidos en *cenizas* similares, con valores medios que variaron entre 1,03 y 1,17%, lo que significa que las envueltas no modifican el contenido mineral de los filetes de salmón durante su almacenamiento en congelación ni tras su descongelación.

Respecto a los contenidos en *extracto seco* de las muestras *tras el cocinado*, sólo se observaron diferencias significativas en los filetes RDC glaseados respecto a los sin envuelta y los envueltos con OVO y OVO+sorbitol 1:1, no habiéndose podido establecer un efecto claro del uso de los distintos tipos de envueltas sobre este parámetro.

5.4. Parámetros de color.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes a las coordenadas de color CIELab y blancura (whiteness) de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en *congelación*, una vez *descongelados* y tras su *cocinado*, de las muestras RAC se muestran en la *Tabla 5.4*. En ésta también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos.

Tabla 5.4. Parámetros de color de los filetes recubiertos con OVO antes de su congelación, tras 4 meses de almacenamiento. Valores de las muestras congeladas, descongeladas y cocinadas (media \pm desviación estándar).

Muestras	L*	a*	b*	Whiteness
Congeladas				
Sin envuelta	52,85 \pm 1,50b	12,64 \pm 2,03a	10,63 \pm 1,84a	50,01 \pm 2,22ab
OVO	51,52 \pm 1,24ab	12,47 \pm 0,78a	10,71 \pm 1,15a	48,79 \pm 0,82ab
OVO+sorbitol 1:1	50,22 \pm 1,02a	11,45 \pm 1,08a	9,45 \pm 0,90a	48,04 \pm 1,04a
OVO+sorbitol 2:1	51,60 \pm 0,78ab	11,31 \pm 1,02a	9,44 \pm 1,07a	49,39 \pm 1,15ab
OVO+glicerol 1:1	53,29 \pm 0,72b	12,31 \pm 1,29a	10,23 \pm 1,23a	50,61 \pm 1,21b
OVO+glicerol 2:1	53,10 \pm 0,74b	12,54 \pm 0,52a	11,23 \pm 1,03a	50,16 \pm 0,75ab
Descongeladas				
Sin envuelta	47,10 \pm 0,19a	15,92 \pm 0,81a	16,53 \pm 0,95a	42,33 \pm 0,40a
OVO	48,18 \pm 1,03a	15,51 \pm 0,64a	15,85 \pm 0,69a	43,62 \pm 0,81a
OVO+sorbitol 1:1	47,91 \pm 0,51a	15,02 \pm 0,50a	15,59 \pm 0,96a	43,59 \pm 0,78a
OVO+sorbitol 2:1	48,19 \pm 0,87a	15,16 \pm 0,55a	15,66 \pm 0,77a	43,79 \pm 1,01a
OVO+glicerol 1:1	46,96 \pm 0,94a	15,37 \pm 0,41a	15,89 \pm 0,72a	42,53 \pm 1,15a
OVO+glicerol 2:1	47,64 \pm 1,09a	15,39 \pm 0,32a	16,17 \pm 0,10a	43,07 \pm 1,00a
Cocinadas				
Sin envuelta	70,40 \pm 0,95a	14,98 \pm 1,20a	16,66 \pm 1,37b	62,86 \pm 2,55a
OVO	70,83 \pm 0,99ab	14,01 \pm 0,89a	16,23 \pm 0,60b	63,79 \pm 0,89ab
OVO+sorbitol 1:1	72,56 \pm 1,02ab	14,27 \pm 0,98a	15,71 \pm 0,48ab	65,31 \pm 1,30ab
OVO+sorbitol 2:1	73,25 \pm 1,68b	13,58 \pm 0,67a	14,59 \pm 0,71a	66,64 \pm 1,88b
OVO+glicerol 1:1	73,18 \pm 0,74b	14,44 \pm 0,96a	15,47 \pm 0,25ab	65,83 \pm 0,95b
OVO+glicerol 2:1	72,33 \pm 1,28ab	14,37 \pm 0,17a	15,42 \pm 1,17ab	65,21 \pm 1,55ab

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes las coordenadas de color CIELab y blancura de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en *congelación*, una vez *descongelados* y tras su *cocinado*, de las muestras RDC se muestran en la *Tabla 5.5*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado.

Tabla 5.5. Parámetros de color de los filetes recubiertos con OVO después de su congelación, tras 4 meses de almacenamiento. Valores de las muestras congeladas, descongeladas y cocinadas (media ± desviación estándar).

Muestras	L*	a*	b*	Blancura
Congeladas				
Sin envuelta	50,08 ± 1,63a	14,09 ± 1,65b	11,18 ± 1,41b	46,90 ± 1,64a
Glaseado	64,74 ± 1,15d	11,77 ± 0,37a	8,74 ± 0,36a	61,81 ± 1,25d
OVO	61,22 ± 2,61cd	10,13 ± 0,77a	9,62 ± 0,52a	58,77 ± 2,46cd
OVO+sorbitol 1:1	60,08 ± 3,5c	11,30 ± 1,08a	9,33 ± 0,64a	57,48 ± 3,69c
OVO+sorbitol 2:1	58,83 ± 0,72c	11,01 ± 0,35a	9,25 ± 0,14a	56,40 ± 0,77c
OVO+glicerol 1:1	54,25 ± 0,53b	10,27 ± 1,72a	8,32 ± 1,56a	52,34 ± 0,50b
OVO+glicerol 2:1	54,86 ± 2,64b	10,89 ± 0,49a	9,42 ± 0,09a	52,62 ± 2,62b
A	***	**	*	***
B	ns	ns	ns	ns
Descongeladas				
Sin envuelta	43,47 ± 1,11ab	14,56 ± 0,63b	13,84 ± 0,60b	40,00 ± 0,85ab
Glaseado	48,76 ± 1,56c	12,66 ± 0,38a	12,00 ± 0,31a	45,87 ± 1,35c
OVO	42,97 ± 0,71a	14,92 ± 0,70b	13,76 ± 0,73b	39,46 ± 1,00a
OVO+sorbitol 1:1	43,40 ± 1,15ab	14,62 ± 0,72b	13,28 ± 0,55ab	40,04 ± 1,04ab
OVO+sorbitol 2:1	44,36 ± 0,54ab	14,20 ± 0,75b	12,93 ± 1,09b	41,13 ± 0,83ab
OVO+glicerol 1:1	44,08 ± 0,61ab	14,42 ± 0,63b	13,50 ± 0,77b	40,69 ± 0,83ab
OVO+glicerol 2:1	45,00 ± 0,91b	13,96 ± 0,47b	13,41 ± 0,64b	41,69 ± 0,98b
A	***	***	***	***
B	ns	ns	ns	ns
Cocinadas				
Sin envuelta	70,30 ± 1,25a	15,07 ± 1,78ab	16,66 ± 1,27b	62,73 ± 1,84a
Glaseado	73,78 ± 0,83c	13,13 ± 0,43a	14,69 ± 0,67a	67,20 ± 1,13c
OVO	71,46 ± 1,06ab	15,26 ± 1,65b	16,17 ± 1,30ab	63,81 ± 2,03ab
OVO+sorbitol 1:1	73,11 ± 0,89bc	14,17 ± 1,26ab	15,79 ± 0,16ab	65,74 ± 1,09bc
OVO+sorbitol 2:1	71,08 ± 1,79a	15,53 ± 0,10b	15,39 ± 0,72ab	63,74 ± 1,77ab
OVO+glicerol 1:1	71,49 ± 1,03ab	15,70 ± 0,47b	16,70 ± 1,23b	63,41 ± 1,38ab
OVO+glicerol 2:1	71,29 ± 0,72ab	15,84 ± 1,41b	15,92 ± 1,66ab	63,52 ± 1,55ab
A	ns	**	ns	*
B	ns	ns	ns	ns

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

Los filetes *congelados* tras el almacenamiento presentaron un aumento de la coordenada de luminosidad (L*) en comparación con el fresco (Tabla 5.1), como ya se describió en el capítulo anterior con las envueltas de CPS,

presentando la carne de salmónes congelados valores similares con ambos tipos de recubrimientos (CPS y OVO). Aunque el valor de luminosidad de la carne de los salmónes frescos era algo superior en los empleados en este capítulo que en el anterior, el producto congelado L^* presentó valores similares. En relación al pescado fresco, los valores de a^* y b^* también descendieron en la carne de los salmónes congelados.

Mientras que en el pescado congelado cubierto antes de la congelación (RAC) (*Tabla 5.4*), la aplicación de la envuelta no modificó de manera significativa el color (salvo en la coordenada L^* en relación con OVO+sorbitol 1:1), las muestras RDC con envuelta mostraron valores significativamente diferentes en todos los parámetros (L^* , a^* , b^* y blancura) en relación a las muestras sin envuelta (*Tabla 5.5*). Por tanto, las muestras con envueltas de OVO aplicadas antes de la congelación presentan una coloración similar a las no envueltas mientras que las recubiertas después de la congelación tienen una coloración diferente respecto a los filetes sin cobertura. Por otro lado, las muestras RDC sin envuelta presentaron valores de las coordenadas de color más similares a las de los filetes iniciales previos a la congelación, que los filetes recubiertos o glaseados, por lo que parece que la aplicación de las envueltas tras la congelación daría lugar a mayores diferencias de color en los filetes *congelados*.

Tras el periodo de almacenamiento en congelación, los filetes *descongelados* de salmón, tanto RAC como RDC, presentaron mayores valores de luminosidad (L^*) y blancura y menores valores de las coordenadas a^* (índice de rojez) y b^* en comparación con los valores del pescado *fresco* (*Tabla 5.1*). Esta observación coincide con lo señalado en el capítulo anterior

para las envueltas de CPS y con lo observado en otros trabajos (Sathivel, 2005). La posible explicación ya se comentó en el capítulo anterior: la degradación de pigmentos carotenoides (Andersen *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1999; Sheehan *et al.*, 1998) y la desnaturalización proteica (Ozbay *et al.*, 2006) que pueden ocurrir durante la congelación, causando esta última una pérdida de carotenoides en el líquido exudado durante la descongelación.

En las muestras RAC tras el almacenamiento y *descongelación* (Tabla 5.4) no se observaron diferencias significativas entre los filetes sin envuelta y los envueltos para todas las formulaciones testadas. Así pues el empleo de los recubrimientos de ovoalbúmina antes de la congelación no afectaría al color del pescado *descongelado*.

En el caso de las muestras RDC *descongeladas* (Tabla 5.5), los filetes glaseados mostraron valores significativamente superiores de luminosidad y blancura, a la vez que valores inferiores de las coordenadas a^* y b^* en comparación con el resto de filetes, tanto con o sin envuelta proteica. Por tanto las envueltas de OVO podrían suponer una mejor opción a la hora de preservar el color del salmón durante el almacenamiento en congelación, en comparación con el glaseado.

Los filetes *cocinados*, para ambos momentos de aplicación de las envueltas, presentaron valores de luminosidad y blancura mucho más elevados, y coordenadas a^* y b^* menores que las muestras sin cocinar, al igual que se observó en el capítulo anterior en el estudio de las envueltas de CPS. Las modificaciones del color probablemente sean debidas, como se señaló en el capítulo anterior, a la migración del colágeno (en lo referido al aumento de

luminosidad) y a la destrucción de carotenoides por el calor (en cuanto al descenso de a^* y b^*). Aquí sí se observa que las muestras cocinadas procedentes de filetes glaseados presentaron valores de luminosidad y blancura significativamente mayores y valores de a^* y b^* menores en comparación con el resto de muestras cocinadas. La presencia de uno u otro tipo de envuelta no tiene una influencia clara en el color del salmón *cocinado*, no observándose, como en las envueltas de CPS, que la envuelta con glicerol 2:1 presente mayores valores de luminosidad y blancura y menor de a^* y b^* .

El momento de aplicación de la envuelta afectó al color de los filetes. Los filetes *congelados* correspondientes a las muestras RDC presentaron mayores valores de L^* , blancura ($p < 0,001$) y menores de a^* ($p < 0,01$) y b^* ($p < 0,05$) que las RAC. A su vez, tras la *descongelación* de los filetes, los RAC presentaron mayores valores de L^* , a^* , b^* y blancura ($p < 0,001$ en los cuatro parámetros) en relación con los RDC. Sin embargo, en las muestras *cocinadas*, sólo se observaron diferencias en los parámetros a^* y blancura, presentando las muestras RDC un significativo mayor valor de a^* ($p < 0,01$) y menor de blancura ($p < 0,05$) que las RAC.

Las diferencias observadas entre los dos momentos de aplicación podrían explicarse teniendo en cuenta los resultados obtenidos de rendimiento tras la descongelación y en las *pérdidas por goteo al descongelar*. Como se observó en la *Tabla 5.2*, las muestras RAC presentaron menores *pérdidas por goteo al descongelar*, lo cual podría relacionarse con una menor cantidad de líquido exudado y por consiguiente una menor desnaturalización proteica. Estos datos apoyarían la hipótesis de que las variaciones de color tras la descongelación están relacionadas con la desnaturalización proteica (ya sea

por menor pérdida de pigmentos en el exudado o por una menor modificación de las propiedades reflectivas del músculo), puesto que son las muestras RAC las que presentan una menor variación de color tras la *descongelación* (mayores valores de las coordenadas a^* y b^*). También es posible que influya que haya una menor oxidación de los carotenoides en las muestras RAC en relación a las RDC, lo cual se estudia en el apartado siguiente.

En relación al efecto del tipo de plastificante utilizado, no se han encontrado diferencias en las muestras *congeladas*, *descongeladas* ni *cocinadas* ($p \geq 0,05$).

5.5. Índices de oxidación.

Los contenidos medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los indicadores de oxidación obtenidos por el valor de *dienos conjugados*, el índice o valor de *peróxidos* y el valor de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (*SRATB*) se muestran en la *Tabla 5.6*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Los valores de los *dienos conjugados* vienen expresados en milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos, los *peróxidos* en miliequivalentes de cumene por kg de carne o de lípidos y los compuestos secundarios (*SRATB*) en mg de malondialdehído por kg de carne o de lípidos.

Tabla 5.6. Indicadores de la oxidación lipídica (media \pm desviación estándar) de los filetes de pescado RAC y RDC tras 4 meses de almacenamiento en congelación.

Muestras	Dienos conjugados			Valor de peróxidos			Valor de SRATB		
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)				
Recubiertas antes de congelar									
Sin envuelta	32,14 \pm 1,27ab	2,72 \pm 0,21d	14,94 \pm 4,01c	2,42 \pm 0,21c	13,05 \pm 1,92c				
OVO	34,56 \pm 4,19ab	2,35 \pm 0,21c	9,02 \pm 1,60b	2,19 \pm 0,07bc	8,37 \pm 0,67ab				
OVO+sorbitol 1:1	32,09 \pm 6,93ab	2,11 \pm 0,17c	8,68 \pm 0,59ab	1,84 \pm 0,08ab	7,56 \pm 0,44ab				
OVO+sorbitol 2:1	32,08 \pm 1,26ab	1,69 \pm 0,12b	7,30 \pm 1,24ab	1,87 \pm 0,17ab	7,99 \pm 0,36ab				
OVO+glicerol 1:1	28,78 \pm 8,60a	1,44 \pm 0,08ab	6,71 \pm 1,19ab	1,92 \pm 0,03ab	8,89 \pm 1,15b				
OVO+glicerol 2:1	37,65 \pm 2,02b	1,25 \pm 0,09a	5,30 \pm 0,74a	1,60 \pm 0,48a	6,65 \pm 1,41a				
Recubiertas tras congelar									
Sin envuelta	43,75 \pm 2,65a	2,61 \pm 0,54cd	13,25 \pm 1,35bc	2,41 \pm 0,15d	12,47 \pm 2,21b				
Glaseado	51,44 \pm 9,77a	2,65 \pm 0,43d	13,89 \pm 0,94c	2,16 \pm 0,10c	11,41 \pm 1,26b				
OVO	43,73 \pm 3,33a	1,81 \pm 0,07ab	9,68 \pm 2,39ab	1,83 \pm 0,13ab	9,80 \pm 2,36ab				
OVO+sorbitol 1:1	44,18 \pm 4,79a	1,82 \pm 0,11ab	8,69 \pm 1,20a	2,05 \pm 0,02bc	9,78 \pm 1,23ab				
OVO+sorbitol 2:1	45,71 \pm 8,67a	1,50 \pm 0,03ab	8,38 \pm 0,61a	1,92 \pm 0,08bc	10,71 \pm 0,84ab				
OVO+glicerol 1:1	42,48 \pm 3,95a	2,06 \pm 0,47bc	10,17 \pm 3,40ab	1,71 \pm 0,16a	8,26 \pm 1,27a				
OVO+glicerol 2:1	50,84 \pm 5,85a	1,95 \pm 0,08bc	9,69 \pm 2,96ab	1,67 \pm 0,22a	8,07 \pm 1,27a				
A	***	ns	*	ns	**				
B	ns	ns	ns	*	ns				

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

SRATB: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

(1): mMol hidroperóxidos/kg lípidos

(2): meq de cumene/kg carne; (3): meq de cumene/kg lípidos

(4): mg de malondialdehído/kg carne; (5): mg de malondialdehído/kg lípidos

Los contenidos medios de *dienos conjugados* en los filetes RAC oscilaron entre 28,78 y 37,65 milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos. Presentan las muestras recubiertas con OVO+glicerol 2:1 los valores significativamente más elevados y las muestras OVO+glicerol 1:1 los menores. En los filetes RDC, los valores medios se encontraron entre 42,48 y 51,44 milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos. En este caso, no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las distintas envueltas empleadas.

Los valores medios de *peróxidos* en las muestras RAC (*Tabla 5.6*) fluctuaron entre 1,25 y 2,35 meq de cumene por kg de carne, siendo las muestras OVO+glicerol 2:1 las que presentaron los contenidos significativamente más bajos (1,25meq), y las muestras sin envuelta los valores significativamente más elevados (2,72 meq). Esta tendencia se mantiene al expresar los datos en relación al contenido en grasa. En este caso, los valores oscilaron entre 5,30 y 9,02 meq de cumene por kg de lípidos, siendo de nuevo las muestras envueltas con OVO+glicerol 2:1 las que presentaron los menores valores y las sin envuelta los mayores (14,94 meq), con diferencias significativas con respecto al resto de muestras. Por su parte, los filetes RDC (*Tabla 5.6*) presentaron contenidos de entre 1,50 y 2,65 meq de cumene por kg de carne, y de entre 8,38 y 13,89 meq de cumene por kg de lípidos. En este caso, los filetes OVO+sorbitol en ambas proporciones exhibieron los menores valores de peróxidos cuando se expresaron en meq de cumene por kg de lípidos, presentando diferencias significativas respecto a las muestras sin envuelta proteica.

Cabe destacar que, independientemente de que se expresen los resultados en meq de cumene por kg de carne o en meq de cumene por kg de lípidos, los filetes glaseados presentaron los mayores contenidos de peróxidos, con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a las muestras recubiertas, presentando dichos filetes glaseados valores similares a las muestras sin envuelta. Fenómeno ya observado en los recubrimientos de proteínas de lactosuero (*Capítulo 4, apartado 4.5*), donde las muestras glaseadas presentaron valores de peróxidos; superiores a los de las muestras recubiertas con CPS y similares a los de las muestras sin envuelta.

En relación a los *productos de oxidación secundarios*, los resultados indican que los filetes recubiertos con OVO, en cualquiera de las formulaciones testadas, presentan una menor oxidación que las muestras sin recubrimiento o glaseadas. Los valores medios de *SRATB* en las muestras RAC (*Tabla 5.6*) oscilaron entre 1,60 y 2,19 mg de malondialdehído por kg de carne, presentándose un valor significativamente mayor en los filetes sin envuelta (2,42 mg) en comparación con los filetes envueltos, cualesquiera que fuera su formulación. Por otro lado, las muestras OVO+glicerol 2:1 presentaron los menores contenidos. La misma tendencia se observa al expresar los valores de oxidación respecto al contenido graso, obteniéndose en las muestras recubiertas contenidos de entre 6,65 y 8,37 mg de malondialdehído por kg de lípidos. De nuevo, los valores de *SRATB* son significativamente superiores en las muestras sin envuelta (13,05 meq) en comparación con los recubiertos con OVO con o sin plastificante, siendo las muestras OVO+glicerol las que reportaron menores contenidos.

En las muestras RDC (*Tabla 5.6*), los valores de *SRATB* se encontraron en un rango entre 1,67 y 2,16 mg de malondialdehído por kg de carne. Tanto las muestras sin envuelta (2,41 mg) como las muestras glaseadas (2,16 mg) presentaron valores superiores en comparación con los filetes recubiertos con OVO independientemente de su formulación. Por otro lado, los menores contenidos se observaron en las muestras OVO+glicerol 1:1 y 2:1 con diferentes significativas con las muestras sin envuelta, glaseadas y OVO+sorbitol. Como en el caso anterior, la tendencia se repite al expresar los resultados en función del contenido graso, obteniendo valores entre 8,07 y 10,71 mg de malondialdehído por kg de lípidos en las muestras recubiertas con OVO. De nuevo, se encontraron mayores contenidos en las muestras sin envuelta (12,47 mg) y en las muestras glaseadas (11,41 mg) y los menores valores en las muestras OVO+glicerol 1:1 y 2:1 con diferencias significativas respecto a las anteriores (sin envuelta y glaseadas).

Los valores de *SRATB* encontrados en el presente estudio para las distintas envueltas de OVO expresados sobre carne (1,60-2,19 mg MDA/kg tejido) son similares a los resultados descritos por Sathivel (2005) (1,8 mg MDA/kg tejido) para salmón rosado tras tres meses en congelación empleando envueltas de ovoalbúmina+glicerol (4,7% proteína/1,8% plastificante). Por otro lado, si referimos la oxidación de los filetes recubiertos en función de la oxidación de los filetes sin envuelta, obtendríamos que en el trabajo de Sathivel (2005) los filetes con ovoalbúmina+glicerol presentarían un 45,45% menos de oxidación respecto a los sin envuelta, mientras que en el presente estudio esta reducción podría llegar hasta un 33,88% en las muestras RAC y 30,70% en las RDC. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la duración del

estudio de Sathivel (2005) es de tres meses, un mes menos que el presente estudio, lo que supondría un 25% menos de tiempo de almacenamiento.

Otros estudios han obtenido reducciones en los valores de SRATB con la utilización de recubrimientos elaborados con otras proteínas: concentrados proteicos de suero (24,81%), proteína de soja e hidrolizados de proteínas de pescado (57,57%) en salmón rosado tras tres meses en congelación (Sathivel, 2005; Ambardekar, 2007).

Cabe destacar también que los valores de los *índices de oxidación* (*peróxidos* y *SRATB*) del pescado glaseado son superiores a los obtenidos para los distintos tipos de envueltas de OVO. Este mismo efecto se ha descrito en el *Capítulo 4* (*apartado 4.5*) con la aplicación de envueltas de CPS.

Por tanto, como con las envueltas de CPS, los valores de los distintos *índices de oxidación* indican que la aplicación de envueltas de OVO es efectiva a la hora de reducir la oxidación lipídica en el salmón congelado, proporcionando una mejor protección frente a la misma que el glaseado. Como en el caso del empleo de CPS, la reducción de la oxidación lipídica observada con las envueltas de OVO podría explicarse por dos mecanismos. En primer lugar, las envueltas de OVO evitarían la entrada de oxígeno, al igual que sucede con otros films proteicos (McHugh & Krochta, 1994b; Maté & Krochta, 1996; Osés *et al.*, 2009). En segundo lugar, estas envueltas presentarían actividad antioxidante derivada de secuencias existentes en la estructura de la ovoalbúmina. Como se señaló en la introducción, las proteínas de la clara de huevo, principalmente la ovoalbúmina, funcionan como antioxidantes naturales frente a la oxidación lipídica, neutralizando radicales

libres mediante grupos sulfhidrilo o aminoácidos como la histidina o la tirosina, presentes en determinadas secuencias peptídicas (Tsuge *et al.*, 1991; Dávalos *et al.*, 2004). Al igual que se comentó con las proteínas del lactosuero, esta actividad antioxidante podría verse aumentada al exponer los aminoácidos y grupos antioxidantes gracias a la desnaturalización proteica (Elías *et al.*, 2005), aunque en este estudio el calentamiento que han sufrido las disoluciones de OVO durante su elaboración (45 °C/20 minutos) han sido inferiores a las de las disoluciones de CPS (80 °C/30 minutos).

Al comparar los dos momentos de aplicación, se observan contenidos significativamente menores en las muestras RAC, tanto en el valor de *dienos conjugados* ($p < 0,001$) y *peróxidos* ($p < 0,05$), como en el de *SRATB* ($p < 0,01$), cuando las cantidades de los dos últimos se expresan en función del contenido graso. Sin embargo, estas diferencias desaparecen al expresar los valores en función de la carne ($p \geq 0,05$). Así pues, la aplicación de los recubrimientos de OVO antes de la congelación parece reducir la oxidación lipídica de los filetes de salmón, en comparación con la obtenida al aplicar los recubrimientos tras la congelación. Estos resultados podrían deberse a la mejor adhesión de las envueltas proteicas de OVO sobre la superficie fresca de los filetes que sobre la superficie congelada. Esta mejor adhesión también se vería reflejada en las muestras RAC: en los mayores valores de *rendimiento* (aunque no significativos) y *rendimientos tras descongelar* ($p < 0,01$), así como en los menores valores de *pérdidas por goteo al descongelar* ($p < 0,001$) y *pérdidas por goteo tras almacenamiento* ($p < 0,001$) (apartado 5.2). La menor oxidación lipídica de las muestras RAC también influyó en el color del pescado, donde los carotenoides parecieron estar más protegidos contra la oxidación cuando la envuelta se aplicaba en muestras sin congelar que cuando se realizaba en

188

filetes congelados (*apartado 5.4*). En este caso, el menor valor de a^* y b^* en las muestras congeladas RDC que en las RAC podría haberse debido a una mayor degradación oxidativa de los carotenoides.

En relación al empleo de sorbitol o glicerol, se observan diferencias significativas al utilizar uno u otro plastificante en el valor de *SRATB* expresados sobre carne ($p < 0,01$), siendo los valores de las muestras con OVO+glicerol significativamente menores a los de las muestras recubiertas con sorbitol. Como se señaló en el estudio de las envueltas con CPS, el glicerol, debido a su bajo peso molecular y su estado líquido en condiciones ambientales estándar, es probablemente más eficaz rompiendo los puentes de hidrógeno entre las cadenas proteicas que el sorbitol (Sothornvit *et al.*, 2002); este efecto podría cambiar la configuración proteica y exponer, en este caso, los grupos de aminoácidos antioxidantes de las proteínas de ovoalbúmina y por tanto aumentando su poder antioxidante, lo que provocaría un descenso de la oxidación.

El empleo de diferentes proporciones de los plastificantes en la formulación de las envueltas de CPS (*Capítulo 4*) no había afectado de manera clara a la oxidación lipídica, a pesar de que se ha constatado para varios plastificantes en películas independientes, incluidos el sorbitol y el glicerol, que un aumento de la cantidad de plastificante utilizada incrementa la permeabilidad al oxígeno (Sothornvit & Krochta, 2000; Osés *et al.*, 2008). A diferencia de las envueltas de CPS, en los recubrimientos de OVO se observa que las formulaciones sorbitol 2:1 y glicerol 2:1, en general, consiguen reducir la oxidación (valor de peróxidos y *SRATB*) en relación a las formulaciones sorbitol 1:1 y glicerol 1:1 respectivamente, con diferencias significativas en

muestras RAC (con sorbitol en peróxidos expresados en meq de cumene/kg de carne y con glicerol en SRATB expresados en mg de malondialdehído/kg de carne). En este caso, estos resultados parecen corroborar lo señalado en otros trabajos (Sothorvit & Krochta, 2000; Osés *et al.*, 2008), los cuales indican que un aumento de la cantidad de plastificante utilizada incrementa la permeabilidad al oxígeno en películas proteicas; parece que, en el caso de las envueltas líquidas, el efecto del contenido del plastificante depende del tipo de proteína.

En último lugar, al comparar los resultados de los distintos índices de oxidación lipídica obtenidos con los recubrimientos con CPS (*Capítulo 4, apartado 4.5*), observamos que los valores de *dienos conjugados* son similares con los obtenidos con OVO.

Considerando en conjunto los valores de todos los filetes recubiertos con OVO, tanto RAC como RDC y teniéndose en cuenta las diferencias en los valores de las muestras sin envuelta para cada proteína; las muestras OVO presentaron una mayor reducción media de los valores de peróxidos respecto a los sin envuelta (reducción del 40,04%) y una menor reducción de los valores de SRATB (32,38%) en comparación con las muestras CPS (con reducciones medias del 18,07% y 35,49% respectivamente). Estos resultados sugerirían un estado de oxidación lipídica más temprano de los filetes con CPS, es decir, que la utilización de CPS en los recubrimientos retrasaría en mayor medida la oxidación en comparación con la utilización de OVO, por lo menos, bajo las condiciones aquí testadas. No obstante, al comparar los valores obtenidos en cada uno de los momentos de aplicación, observamos que para las muestras RAC, son las envueltas con OVO las que obtuvieron las mayores reducciones

en la oxidación respecto a los sin envuelta, mientras que para los filetes RDC fueron los recubrimientos con CPS. Así pues, las envueltas con CPS obtuvieron mejores resultados en conjunto cuando se aplicaron tras la congelación, mientras que en el caso de las OVO fueron mejores las RAC.

Finalmente, analizando por separado los distintos tipos de envueltas testadas observamos que mientras que en las envueltas con CPS, la envuelta más eficaz desde el punto de vista de la protección frente a la oxidación lipídica fue la CPS+glicerol 1:1 especialmente la RAC, cuya utilización supondría una reducción de los valores de *SRATB* del 47,35% respecto a los filetes sin envuelta; en el caso de las envueltas de OVO la envuelta que obtuvo los mejores resultados fue la OVO+glicerol 2:1 RAC, con una reducción de los valores de *SRATB* del 49,09% en comparación con las sin envuelta.

Capítulo 6 Estudio de la aplicación de envueltas elaboradas con concentrado de proteínas de soja (SOJA) en salmón del Atlántico congelado: efecto del plastificante y del momento de aplicación

6.1. Características del salmón empleado como materia prima

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los distintos parámetros químicos y físico-químicos de la carne de salmón utilizada como materia prima en este estudio se muestran en la *Tabla 6.1*. Se incluye la *composición química*, los valores de *pH* y *color* CIELab y los *índices de oxidación lipídica*.

Tabla 6.1. Caracterización fisicoquímica del salmón utilizado como materia prima (media \pm desviación estándar).

Composición	
Extracto seco (g/100 g carne)	35,65 \pm 6,18
Lípidos (g/100 g carne)	18,82 \pm 5,33
Cenizas (g/100 g carne)	1,06 \pm 0,01
pH	
	6,10 \pm 0,03
Color	
L*	36,91 \pm 3,98
a*	22,46 \pm 2,45
b*	24,09 \pm 3,60
Blancura	30,01 \pm 4,72
Índices de oxidación lipídica	
Dienos conjugados (mMol hidroperóxidos/kg lípidos)	32,04 \pm 7,67
Peróxidos (meq cumene/kg carne)	0,47 \pm 0,22
Peróxidos (meq cumene/kg lípidos)	5,46 \pm 2,79
Valor SRATB (mg MDA/kg carne)	0,57 \pm 0,25
Valor SRATB (mg MDA/kg lípidos)	3,12 \pm 1,09

SRATB: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

MDA: malondialdehído

La composición química descrita en este trabajo para el salmón del Atlántico se ajusta en rasgos generales con las descritas por Shearer *et al.* (1994) y con la explicada para el salmón fresco empleado en el *Capítulo 4 (apartado 4.1)* (estudio de envueltas de CPS) presentando la composición descrita en ambos *Capítulos (4 y 6)* un contenido lipídico superior al del salmón empleado para el estudio de las envueltas de ovoalbúmina (*Capítulo 5, apartado 5.1*).

Los valores de la coordenadas de color también son similares a las señaladas en el salmón del *Capítulo 4*, presentando valores de a^* y b^* superiores a la carne del *Capítulo 5*. Este resultado confirma la influencia del contenido lipídico de la carne en estas coordenadas de color, lo cual ya ha sido reseñado en otros trabajos (Einen & Skrede, 1998; Skrede & Wold, 2008).

El valor de pH (6,10) también es similar al de la materia prima empleada en el *Capítulo 4 (6,11)* e inferior al del siguiente capítulo (6,20) por lo que el contenido lipídico de la carne parece influir en los valores de pH (a menor contenido lipídico, mayor pH).

La diferencia más destacable con las muestras de los capítulos anteriormente citados se encontraría en los valores del *índice de oxidación, SRATB* expresados tanto sobre el contenido de carne como el de lípidos. En el presente capítulo los valores de *SRATB* (0,57 mg MDA/kg carne y 3,12 mg MDA/kg lípidos) fueron superiores en comparación a los contenidos observados en los salmones del *Capítulo 4* (0,31 mg MDA/kg carne y 1,66 mg MDA/kg lípidos) y del *Capítulo 5* (0,15 mg MDA/kg carne y 1,14 mg MDA/kg lípidos), lo que indicaría un estado de oxidación inicial más

avanzado en la materia prima utilizada en este apartado en comparación al resto.

6.2. Rendimientos, pérdidas por goteo y cocinado.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *rendimiento*, *rendimiento al descongelar*, las *pérdidas por goteo al descongelar*, las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, las *pérdidas por cocinado* y los valores de *pH* de los filetes de salmón tras el almacenamiento, se muestran en la *Tabla 6.2*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Todos los parámetros, a excepción del *pH*, vienen expresados en tanto por ciento (%).

La aplicación de envueltas proteicas de SOJA también aumenta significativamente el *rendimiento* de los filetes, al igual que se observó con las envueltas de CPS y OVO en los capítulos anteriores (*Capítulo 4 y 5, apartados 4.2 y 5.2*). Los incrementos en los rendimientos medios son del 1,22-2,59% para las muestras RAC y del 1,44-2,26% para las muestras RDC. El mayor incremento se observa al aplicar SOJA+sorbitol 1:1 en las muestras RAC (2,59%) y SOJA+sorbitol 2:1 en las RDC (2,26%). El aumento del rendimiento de los filetes congelados podría explicarse por la fijación satisfactoria de las envueltas sobre los filetes de pescado, lo que provocaría un aumento de peso y por tanto del *rendimiento* final. Estos resultados coinciden con los descritos por diversos autores, al aplicar distintas envueltas

Tabla 6.2. Rendimiento, rendimiento al descongelar, pérdidas por goteo al descongelar y tras almacenamiento en refrigeración, pérdidas por cocinado y pH tras descongelación (media \pm desviación estándar) de muestras recubiertas con SOJA tras 4 meses de almacenamiento en congelación a -20 °C.

Muestras	Rendimiento (%)	Rendimiento (%) tras descongelar	Pérdidas por goteo al descongelar (%)	Pérdidas por goteo tras refrigeración (%)	Pérdidas por cocinado (%)	pH
Recubiertas antes de congelar						
Sin envuelta	99,53 \pm 0,15a	96,71 \pm 0,32ab	2,83 \pm 0,19a	9,72 \pm 0,60c	9,26 \pm 0,38a	6,13 \pm 0,02ab
SOJA	101,17 \pm 0,11b	97,20 \pm 1,90b	3,92 \pm 1,91ab	9,47 \pm 1,71bc	11,17 \pm 2,00a	6,14 \pm 0,07b
SOJA+sorbitol 1:1	102,11 \pm 0,52c	97,88 \pm 1,50b	4,14 \pm 1,04ab	7,51 \pm 1,25ab	12,75 \pm 2,74a	6,16 \pm 0,02b
SOJA+sorbitol 2:1	100,75 \pm 0,65b	97,70 \pm 1,09b	3,02 \pm 1,68a	8,75 \pm 0,83abc	11,27 \pm 1,87a	6,11 \pm 0,03ab
SOJA+glicerol 1:1	101,01 \pm 0,70b	94,95 \pm 0,46a	5,99 \pm 0,73b	6,99 \pm 0,15a	11,54 \pm 1,62a	6,14 \pm 0,04b
SOJA+glicerol 2:1	100,89 \pm 0,44b	94,88 \pm 0,04a	5,96 \pm 0,42b	7,13 \pm 1,58a	11,17 \pm 2,58a	6,06 \pm 0,03a
Recubiertas tras congelar						
Sin envuelta	99,21 \pm 0,18a	96,37 \pm 0,92a	2,86 \pm 0,76ab	9,67 \pm 3,30b	8,04 \pm 1,03a	6,11 \pm 0,02ab
Glaseado	100,64 \pm 0,38b	96,27 \pm 0,68a	4,34 \pm 0,72bc	9,34 \pm 0,73ab	8,33 \pm 0,63a	6,09 \pm 0,06ab
SOJA	100,95 \pm 0,31b	96,71 \pm 2,09ab	4,20 \pm 1,81bc	9,98 \pm 1,53b	10,75 \pm 0,79b	6,13 \pm 0,08ab
SOJA+sorbitol 1:1	101,45 \pm 0,90bc	99,03 \pm 1,00c	2,38 \pm 0,22a	9,11 \pm 0,81ab	12,16 \pm 1,18b	6,16 \pm 0,01b
SOJA+sorbitol 2:1	102,33 \pm 1,00c	98,47 \pm 1,08bc	3,77 \pm 0,19abc	7,22 \pm 2,59ab	11,64 \pm 1,76b	6,13 \pm 0,01ab
SOJA+glicerol 1:1	100,96 \pm 0,22b	96,31 \pm 0,91a	4,60 \pm 0,70c	7,50 \pm 2,81ab	10,52 \pm 1,05b	6,12 \pm 0,05ab
SOJA+glicerol 2:1	100,79 \pm 0,21b	95,59 \pm 0,42a	5,15 \pm 0,43c	5,76 \pm 0,88a	11,17 \pm 0,44b	6,06 \pm 0,02a
A	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B	*	***	***	ns	ns	**

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar (RAC) versus después de congelar (RDC); * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

comestibles a filetes de pescado almacenados en congelación (Sathivel 2005; Ambardekar, 2007; Sathivel *et al.*, 2007, 2008). Concretamente, Sathivel (2005) reportó un aumento del rendimiento del 3,4% al utilizar envueltas de concentrado proteico de soja con glicerol (2:1 proteína:plastificante aprox.). Sin embargo, aunque este porcentaje es superior al observado en el presente trabajo (1,37% para SOJA+glicerol 2:1 RAC), hay que señalar que el valor descrito por Sathivel (2005) está ligeramente sobreestimado al considerar el rendimiento de los filetes sin envuelta del 100%. Por otro lado, Ambardekar (2007) describió un ligero aumento aunque no significativo del rendimiento (1%) al utilizar envueltas de concentrado proteico de soja con glicerol (2,5:1 proteína:plastificante aprox.). Estas diferencias de resultados entre los estudios podrían deberse al menor tiempo de inmersión de los filetes en las disoluciones proteicas en el trabajo de Ambardekar (2007) y en el presente estudio (1 minuto), frente a los 5 minutos empleados en el trabajo de Sathivel (2005). En comparación con los rendimientos obtenidos con CPS y OVO en los capítulos anteriores del presente trabajo, los valores con la aplicación de SOJA son algo superiores que los obtenidos con OVO (0,89-1,76% para las muestras RAC y del 1,01-1,88% para las muestras RDC) e inferiores a los que se consiguieron con el empleo de CPS (2,75-4,25% para las muestras RAC y 1,70-3,30% para las muestras RDC). Por tanto, de las tres proteínas utilizadas, las de lactosuero parecen ser las que mejor se adhieren al pescado.

Los *rendimientos tras descongelar* de las muestras RAC oscilaron entre 94,88 y 97,88% y los de las muestras RDC entre 95,59 y 99,03%. En ambos casos, las muestras SOJA+sorbitol 1:1 presentaron los mayores *rendimientos tras descongelar* mientras que las envueltas de SOJA+glicerol obtuvieron valores significativamente menores al resto de envueltas.

Finalmente, sólo los filetes RDC recubiertos con SOJA+sorbitol en ambas proporciones presentaron valores significativamente superiores a los *rendimientos tras descongelar* de las muestras sin envuelta.

Las *pérdidas por goteo al descongelar* de las muestras RAC oscilaron entre 3,02 y 5,99% y los de las muestras RDC entre 2,38 y 5,15%. Tanto en los filetes RAC como en los RDC, las envueltas de SOJA+glicerol obtuvieron valores significativamente mayores al resto de envueltas. Estos resultados estarían en consonancia con los descritos anteriormente para los *rendimientos tras descongelar*, puesto que las muestras con menores *rendimientos tras descongelar* (SOJA+glicerol) fueron las que tuvieron mayores *pérdidas por goteo al descongelar*.

En relación a las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, no se observó una tendencia clara. Sin embargo, tanto en las muestras RAC como en las RDC, los filetes sin envuelta presentaron pérdidas superiores a las de las muestras con recubrimientos proteicos. Además, los filetes con SOJA+glicerol 2:1 obtuvieron las pérdidas significativamente menores, para ambos momentos de aplicación.

Las muestras RAC con SOJA presentan *pérdidas por cocinado* sin diferencias significativas, las cuales oscilaron entre un 11,17 y un 12,75%, siendo las pérdidas de las muestras sin envuelta del 9,26%. Sin embargo, en las muestras RDC, a pesar de que los filetes recubiertos presentaron también pérdidas sin diferencias significativas (valores entre 10,52 y 12,16%), las muestras sin envuelta (8,04%) y las glaseadas (8,33%) obtuvieron pérdidas significativamente menores con relación a las muestras recubiertas. Los

porcentajes de pérdidas por cocinado obtenidos se asemejan a los descritos por Sathivel (2005) y Ambardekar (2007). Concretamente, Sathivel (2005) observó unas pérdidas por cocinado del 15,8% para envueltas de concentrado proteico de soja con glicerol (2:1 proteína:plastificante aprox.). Por su parte, Ambardekar (2007) reportó pérdidas por cocinado del 7,5% para envueltas de concentrado proteico de soja con glicerol (2,5:1; proteína:plastificante aprox.). No obstante, ninguno de estos autores encontró diferencias significativas entre las pérdidas por cocinado de muestras sin envuelta y muestras recubiertas con diversas proteínas.

Tras el almacenamiento en congelación, como en los capítulos anteriores, se observa en general un aumento del pH en comparación con el inicial en fresco (6,10), tanto en las muestras sin envuelta como en las muestras con envuelta proteica con o sin plastificante, a excepción de las muestras con SOJA+glicerol 2:1 (6,06), las cuales mostraron un ligero descenso.

El tipo de plastificante utilizado en la elaboración de los recubrimientos afecta significativamente a los *rendimientos* ($p < 0,05$), a los *rendimientos tras descongelar* ($p < 0,001$), a las *pérdidas por goteo al descongelar* ($p < 0,001$) y al pH ($p < 0,01$). Cuando se emplea glicerol en la formulación, los filetes envueltos presentan menores *rendimientos* y *rendimientos tras descongelar*, mostrando a su vez mayores *pérdidas por goteo al descongelar*, de ahí los menores rendimientos. Además los filetes en cuyas envueltas se utilizó el sorbitol obtuvieron valores de pH significativamente mayores. Así pues, la utilización de sorbitol como plastificante sería significativamente favorable en relación a estos parámetros

en comparación con la utilización de glicerol. Es posible que el efecto en el pH se deba a que, de acuerdo con las especificaciones del fabricante de los plastificantes (Panreac), una disolución acuosa de sorbitol (100 g/l) tiene valores de pH entre 6-7, mientras que el glicerol en igual concentración posee un pH de 5. Esta diferencia podría influir también en las interacciones de las envueltas con las proteínas del pescado. Así pues, es posible que los cambios en las pérdidas y rendimientos se deban a las diferentes interacciones que puedan tener el glicerol y el sorbitol con las proteínas de soja, que afecten a la estructura de la envuelta y a su adherencia.

Por el contrario, a diferencia de lo que sucedía cuando se estudiaron las envueltas con CPS y OVO, el momento de aplicación del recubrimiento de SOJA no afectó significativamente a ninguno de los parámetros aquí descritos.

6.3. Extracto seco, lípidos y cenizas

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *extracto seco*, *extracto seco magro*, contenido en *lípidos* y contenido en *cenizas* de los filetes de salmón tras el almacenamiento en congelación, y el *extracto seco tras cocinado* se muestran en la *Tabla 6.3*. En ésta también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Los valores del *extracto seco*, *extracto seco magro*, *lípidos* y *cenizas* vienen expresados en g/100 g de carne.

Tabla 6.3. Extracto seco, extracto seco magro, contenidos en lípidos y cenizas de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en congelación y extracto seco tras cocinado, (g/100g pescado; media \pm desviación estándar).

Muestras	Descongeladas			Cocinadas	
	Extracto seco	Contenido lipídico	Extracto seco magro	Cenizas	Extracto seco tras cocinado
Recubiertas antes de congelar					
Sin envuelta	41,37 \pm 0,70a	24,92 \pm 1,38a	16,44 \pm 1,41a	1,13 \pm 0,06ab	42,73 \pm 1,55ac
SOJA	36,00 \pm 5,12b	19,23 \pm 0,26b	16,77 \pm 5,20a	1,12 \pm 0,10ab	40,30 \pm 3,14a
SOJA+sorbitol 1:1	35,72 \pm 0,78b	17,92 \pm 3,37b	17,80 \pm 2,72a	1,15 \pm 0,07a	39,45 \pm 1,84a
SOJA+sorbitol 2:1	40,25 \pm 1,29a	19,97 \pm 4,14ab	20,28 \pm 3,55ab	1,11 \pm 0,01ab	42,08 \pm 1,65ac
SOJA+glicerol 1:1	43,09 \pm 0,49a	19,03 \pm 2,85b	24,06 \pm 2,72b	1,06 \pm 0,05ab	46,27 \pm 1,35b
SOJA+glicerol 2:1	42,28 \pm 1,59a	20,80 \pm 2,94ab	21,48 \pm 3,16ab	1,04 \pm 0,03b	44,85 \pm 1,64bc
Recubiertas tras congelar					
Sin envuelta	44,14 \pm 1,19ae	23,36 \pm 0,77a	20,78 \pm 1,47a	1,08 \pm 0,05ab	43,18 \pm 1,88ad
Glaseado	33,76 \pm 0,92b	15,04 \pm 0,45b	18,71 \pm 0,58ab	1,11 \pm 0,06ab	34,71 \pm 0,38b
SOJA	37,02 \pm 6,02bcd	18,01 \pm 7,09ab	19,01 \pm 1,18ab	1,11 \pm 0,08ab	43,07 \pm 3,68ad
SOJA+sorbitol 1:1	35,19 \pm 1,55bcd	14,51 \pm 1,71b	20,68 \pm 1,38a	1,12 \pm 0,06ab	38,65 \pm 3,48bc
SOJA+sorbitol 2:1	37,47 \pm 0,76bcd	19,91 \pm 4,42ab	17,57 \pm 3,84ab	1,17 \pm 0,04a	40,88 \pm 2,52ac
SOJA+glicerol 1:1	39,03 \pm 1,57cd	22,55 \pm 1,70a	16,48 \pm 2,96b	1,08 \pm 0,04ab	43,38 \pm 1,32ad
SOJA+glicerol 2:1	39,63 \pm 2,41de	23,04 \pm 3,88a	16,58 \pm 2,67b	1,07 \pm 0,04b	45,97 \pm 0,35d
A	ns	ns	ns	ns	ns
B	***	*	ns	***	***

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

El contenido en lípidos de los filetes osciló entre un 14,51 y 24,92%. Al igual que sucedía con los filetes de los capítulos anteriores (*Capítulo 4, apartado 4.2* y *Capítulo 5, apartado 5.2*), la variabilidad y diferencias significativas observadas en el contenido graso de los filetes puede atribuirse a diferencias inter- e intraindividuales más que al tipo de recubrimiento empleado.

El contenido medio en extracto seco de los filetes frescos fue de un 35,65%, lo que supone un contenido en humedad del 64,35% (*Tabla 6.1*). Tras cuatro meses en congelación, los filetes sin envuelta descongelados presentaron un contenido en extracto seco del 41,37-44,14% (humedad del 55,86-58,63%), lo que supone una pérdida de humedad de un 5,72-8,49%. Las diferencias en los porcentajes de pérdidas entre los *Capítulos 4, 5 y 6* se podrían explicar por las diferencias en el contenido graso entre los pescados utilizados en los tres casos.

Por tanto, el análisis de los resultados se centrará más en el estudio del *extracto seco magro*. En las muestras RAC, el contenido medio en este *extracto seco magro* de las muestras osciló entre 16,77 y 24,06%, siendo el contenido de las muestras sin envuelta del 16,44%. Los filetes sin envuelta, los recubiertos con SOJA y con SOJA+sorbitol 1:1, presentaron menores contenidos en *extracto seco magro* (mayores contenidos en humedad), mientras que los filetes recubiertos con SOJA+glicerol 1:1 fueron los que presentaron un *extracto seco magro* significativamente mayor ($p < 0,05$), y por tanto los de menor contenido en humedad tras el almacenamiento.

En las muestras RDC, los filetes sin envuelta y los recubiertos con SOJA+sorbitol 1:1 presentan contenidos en *extracto seco magro* significativamente mayores, y por tanto menores contenidos en humedad en comparación con las muestras con glicerol. Por su parte, las muestras recubiertas con SOJA+glicerol 1:1 y 2:1 presentaron valores significativamente menores en comparación con el resto, mostrando por tanto, el mayor contenido en humedad. Así pues, a la vista de estos resultados se podría concluir que los recubrimientos elaborados con SOJA+glicerol 1:1 y glicerol 2:1 en menor medida, ofrecerían sobre los filetes de pescado una mejor protección frente a la pérdida de humedad, en comparación con la ausencia de envuelta o el empleo de otras formulaciones. Sin embargo, globalmente (al comparar conjuntamente las muestras RAC y RDC), no se observó influencia alguna respecto al empleo de sorbitol o glicerol sobre el contenido de *extracto seco magro*. Tampoco se observó una influencia significativa del momento de aplicación de la envuelta (antes o después de la congelación) en este parámetro.

Respecto a los contenidos en cenizas, los valores medios variaron en un rango del 1,04-1,17%, observándose ciertas diferencias significativas, posiblemente debidas a diferencias intrínsecas de los individuos utilizados en el experimento, más que a la presencia de los recubrimientos. También es preciso destacar que el rango de valores es muy similar al observado en los *Capítulos 4 y 5*.

Finalmente, en relación a los contenidos en *extracto seco* de las muestras *tras el cocinado*, tanto los filetes RAC como los RDC presentan diferencias significativas, aunque no se ha podido establecer un efecto claro del uso de los

distintos tipos de envueltas. También hay que destacar que se observan valores significativamente menores de extracto seco tras el cocinado al emplear sorbitol como plastificante en comparación con el glicerol. Este fenómeno ya había sido observado en el *Capítulo 4*.

6.4. Parámetros de color.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes las coordenadas de color CIELab y blancura (whiteness) de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en *congelación*, una vez *descongelados* y tras su *cocinado*, de las muestras RAC se muestran en la *Tabla 6.4*. En ésta, también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos.

Tabla 6.4. Parámetros de color de los filetes recubiertos con SOJA antes de su congelación, tras 4 meses de almacenamiento. Valores de las muestras congeladas, descongeladas y cocinadas (media \pm desviación estándar).

Muestras	L*	a*	b*	Blancura
Congeladas				
Sin envuelta	48,81 \pm 2,51b	16,48 \pm 1,35a	13,45 \pm 0,86ab	44,53 \pm 1,96b
SOJA	50,59 \pm 4,20b	14,29 \pm 1,2ab	13,00 \pm 0,68ab	46,91 \pm 3,60b
SOJA+sorbitol 1:1	43,47 \pm 1,58a	15,03 \pm 1,75a	13,79 \pm 1,46b	39,88 \pm 1,81a
SOJA+sorbitol 2:1	50,97 \pm 3,37b	12,57 \pm 1,35b	11,24 \pm 1,35a	48,15 \pm 3,79b
SOJA+glicerol 1:1	48,76 \pm 1,16b	14,32 \pm 0,96ab	11,87 \pm 1,81ab	45,47 \pm 1,64b
SOJA+glicerol 2:1	47,97 \pm 1,41ab	15,68 \pm 1,05a	13,61 \pm 1,09b	43,96 \pm 0,73ab
Descongeladas				
Sin envuelta	38,32 \pm 2,34a	21,41 \pm 2,15bc	25,12 \pm 1,84c	30,02 \pm 2,81a
SOJA	40,62 \pm 1,88ab	22,92 \pm 1,64c	25,23 \pm 3,35c	31,49 \pm 3,17a
SOJA+sorbitol 1:1	38,55 \pm 0,85a	19,91 \pm 0,66ab	21,83 \pm 0,36ab	31,82 \pm 0,93a
SOJA+sorbitol 2:1	43,11 \pm 1,20b	18,08 \pm 0,51a	20,45 \pm 1,24a	36,89 \pm 1,55b
SOJA+glicerol 1:1	40,04 \pm 1,58a	21,69 \pm 1,28bc	23,79 \pm 1,20bc	31,93 \pm 2,07a
SOJA+glicerol 2:1	40,24 \pm 0,39a	22,10 \pm 0,68bc	24,22 \pm 0,92bc	31,84 \pm 0,68a
Cocinadas				
Sin envuelta	70,37 \pm 1,62a	14,98 \pm 0,79a	17,59 \pm 0,97a	62,42 \pm 2,03a
SOJA	69,71 \pm 2,67a	14,70 \pm 0,90a	18,53 \pm 0,84a	61,55 \pm 2,67a
SOJA+sorbitol 1:1	71,93 \pm 0,76a	14,38 \pm 0,29a	17,59 \pm 0,46a	63,89 \pm 0,66a
SOJA+sorbitol 2:1	72,07 \pm 1,19a	14,64 \pm 1,14a	17,09 \pm 1,01a	64,11 \pm 1,19a
SOJA+glicerol 1:1	71,47 \pm 0,64a	13,97 \pm 1,26a	17,11 \pm 0,64a	63,91 \pm 1,13a
SOJA+glicerol 2:1	70,33 \pm 1,69a	13,92 \pm 1,27a	17,84 \pm 2,27a	62,67 \pm 2,68a

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes las coordenadas de color CIELab y blancura (whiteness) de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en *congelación*, una vez *descongelados* y tras su *cocinado*, de las muestras RDC se muestran en la *Tabla 6.5*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado.

Tabla 6.5. Parámetros de color de los filetes recubiertos con CPS después de su congelación, tras 4 meses de almacenamiento. Valores de las muestras congeladas, descongeladas y cocinadas (media ± desviación estándar).

Muestras	L*	a*	b*	Blancura
Congeladas				
Sin envuelta	50,47 ± 2,47a	17,43 ± 1,15e	14,68 ± 0,66c	45,46 ± 2,15a
Glaseado	58,60 ± 0,31c	13,39 ± 0,39bc	9,97 ± 0,09a	55,36 ± 0,42be
SOJA	59,05 ± 0,54c	12,21 ± 0,44ab	11,66 ± 0,72b	55,70 ± 0,76e
SOJA+sorbitol 1:1	54,94 ± 0,32b	10,86 ± 0,32a	11,48 ± 0,44b	52,24 ± 0,21c
SOJA+sorbitol 2:1	55,39 ± 1,99b	11,04 ± 1,29a	11,15 ± 1,03ab	52,70 ± 2,15cd
SOJA+glicerol 1:1	53,78 ± 2,69b	13,96 ± 0,58cd	12,12 ± 0,29b	50,21 ± 2,63bc
SOJA+glicerol 2:1	52,40 ± 2,12ab	15,07 ± 1,21d	14,08 ± 1,25c	48,10 ± 1,84ab
A	***	**	ns	***
B	ns	**	ns	ns
Descongeladas				
Sin envuelta	41,60 ± 1,21bc	19,37 ± 1,89abc	21,98 ± 3,45abc	34,61 ± 2,73bcd
Glaseado	44,88 ± 1,93c	18,69 ± 1,88ab	26,64 ± 2,77d	35,92 ± 0,71d
SOJA	39,85 ± 2,52ab	21,64 ± 1,28cd	23,65 ± 1,91bcd	31,83 ± 2,90abc
SOJA+sorbitol 1:1	37,66 ± 0,20a	20,85 ± 1,05bcd	21,76 ± 0,41ab	30,75 ± 0,33ab
SOJA+sorbitol 2:1	41,24 ± 1,30b	18,16 ± 0,41a	19,56 ± 0,46a	35,46 ± 1,29cd
SOJA+glicerol 1:1	38,56 ± 1,55ab	21,48 ± 1,37cd	22,78 ± 2,06abc	31,02 ± 2,08ab
SOJA+glicerol 2:1	39,29 ± 3,04ab	22,09 ± 1,02d	25,47 ± 1,29cd	30,56 ± 3,41a
A	ns	ns	ns	ns
B	ns	***	***	*
Cocinadas				
Sin envuelta	71,65 ± 1,73ab	13,44 ± 0,37ab	16,31 ± 1,66ab	64,60 ± 1,37abc
Glaseado	71,55 ± 0,51ab	13,55 ± 0,28ab	15,46 ± 0,56a	64,90 ± 0,74abc
SOJA	70,69 ± 3,12ab	15,45 ± 2,12bc	18,18 ± 2,23ab	62,19 ± 4,12ab
SOJA+sorbitol 1:1	73,37 ± 0,43b	13,43 ± 0,55ab	15,90 ± 0,13ab	66,20 ± 0,57bc
SOJA+sorbitol 2:1	73,25 ± 2,78ab	12,59 ± 1,84a	15,52 ± 3,09a	66,59 ± 4,32c
SOJA+glicerol 1:1	69,53 ± 3,22a	16,28 ± 1,52c	17,73 ± 1,05ab	61,09 ± 2,03a
SOJA+glicerol 2:1	70,70 ± 0,56ab	15,50 ± 1,17bc	18,56 ± 0,57b	62,00 ± 0,11ab
A	ns	ns	ns	ns
B	**	ns	*	**

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)
a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

Respecto a la coloración del salmón fresco, como sucedió en los estudios de las envueltas de CPS y OVO, los filetes *congelados* tras el almacenamiento presentaron un aumento de la coordenada de luminosidad (L*) y un descenso de los valores de a* y b*.

En general, en las muestras RAC *congeladas* (Tabla 6.4), los filetes recubiertos con SOJA con o sin plastificante (sorbitol o glicerol) no mostraron diferencias significativas en los parámetros de color L^* , a^* , b^* y blancura, en comparación con los sin envuelta, salvo en la luminosidad y blancura de las envueltas con SOJA+sorbitol 1:1 y en la coordenada a^* de los recubrimientos con SOJA+sorbitol 2:1, los cuales fueron significativamente inferiores a los valores observados en las muestras sin envuelta.

En las muestras RDC (Tabla 6.5) sí se detectaron diferencias significativas entre las muestras recubiertas y glaseadas con respecto a los filetes sin envuelta. Aquí, los filetes *congelados* recubiertos o glaseados mostraron unos valores significativamente mayores de L^* y blancura y menores de a^* y b^* que los filetes congelados sin envuelta. También hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras glaseadas y las envueltas, mostrando en casi todos los casos las glaseadas unos significativos menores valores de b^* que las recubiertas con SOJA después de la congelación.

Tras el periodo de almacenamiento en congelación, los filetes *descongelados* de salmón, tanto RAC como RDC, presentan mayores valores de luminosidad (L^*) y blancura, y valores ligeramente menores de las coordenadas a^* (índice de rojez) y b^* en comparación con los valores del pescado *fresco*. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sathivel (2005) en salmón rosado tras cuatro meses de congelación y con los observados en los capítulos anteriores (*Capítulos 4 y 5, apartados 4.4 y 5.4*), lo cual, como ya se comentó con anterioridad, puede relacionarse principalmente con la oxidación de los carotenoides y la desnaturalización proteica. También coinciden con los resultados de Ambardekar (2007), el cual

describió aumentos de L^* y blancura y un marcado descenso de la coordenada a^* en filetes descongelados de salmón rosado recubiertos con envueltas de SOJA y glicerol (2,5:1; proteína:plastificante aproximadamente), tras tres meses de congelación, aunque este autor encontró valores similares o ligeramente superiores de la coordenada b^* en comparación con el fresco.

En las muestras RAC tras el almacenamiento y *descongelación* (Tabla 6.4), los filetes con SOJA+sorbitol 2:1 presentaron valores significativamente menores de las coordenadas a^* y b^* y mayores de luminosidad y blancura, en comparación con el resto de filetes envueltos o no. Por tanto esta formulación sería la que provocaría las mayores variaciones en los parámetros de color de entre todas las testadas en relación a los filetes sin envuelta mientras que las restantes muestras envueltas serían más parecidas a las no recubiertas.

Estos resultados difieren de los encontrados por Ambardekar (2007) al aplicar envueltas de SOJA con glicerol en filetes de salmón rosado congelados durante tres meses. Este autor no encontró diferencias significativas en las coordenadas a^* y b^* entre las muestras con CPS y las muestras sin envuelta, encontrando que estas últimas presentaban valores significativamente superiores de L^* y blancura. Como ya se comentó en el *Capítulo 4*, estas diferencias en los resultados podrían deberse a la menor cantidad de envuelta adherida en el caso del estudio de Ambardekar (2007).

En las muestras RDC, tras el almacenamiento y *descongelación* (Tabla 6.5) no se observó una tendencia clara del efecto de la aplicación de recubrimientos de SOJA. Sin embargo, los filetes glaseados mostraron valores mayores de luminosidad, blancura y coordenada b^* en comparación con el

resto de filetes. Por otro lado, las muestras recubiertas con SOJA+sorbitol 2:1 presentaron valores menores de las coordenadas a^* y b^* en comparación con el resto de las muestras recubiertas o no. Así pues, la utilización de envueltas de SOJA parece afectar al color de los filetes aunque no se ha podido observar una tendencia clara. No obstante, parece que el uso de recubrimientos con SOJA produciría menos modificaciones en relación a las muestras sin envuelta en el color de los filetes en comparación con el empleo del glaseado.

Los filetes *cocinados*, para ambos momentos de aplicación de las envueltas, presentaron valores de luminosidad y blancura mucho más elevados, y coordenadas a^* y b^* mucho menores que las muestras sin cocinar, por los motivos señalados en capítulos anteriores (migración del colágeno y destrucción de los carotenoides). A pesar de que la presencia de la envuelta no tiene una influencia clara en el color del salmón *cocinado*, sí se observa que las envueltas SOJA+sorbitol 2:1, en muestras RDC, dan lugar a valores de blancura mayores y valores de a^* y b^* menores en comparación con el resto. Por otro lado, los recubrimientos con SOJA+glicerol 1:1 originan valores de luminosidad y blancura menores y valores de a^* mayores al resto.

El momento de aplicación de la envuelta afecta de forma significativa únicamente al color de los filetes *congelados*. Los filetes *congelados* correspondientes a las muestras RDC, presentaron mayores valores de L^* y blancura ($p < 0,001$) y menores de a^* ($p < 0,01$) que las RAC, por lo que la variación de color en los filetes *congelados* es mayor en relación al fresco cuando aplicamos las envueltas tras la congelación. También, al aplicar las envueltas tras la congelación se obtienen menores diferencias de coloración en los filetes *congelados* respecto a los filetes sin envuelta iniciales.

El tipo de plastificante añadido afecta principalmente al color de los filetes *descongelados*, y al de los filetes *congelados* y *cocinados* en menor medida.

Las muestras *descongeladas* plastificadas con glicerol presentaron niveles significativamente superiores de las coordenadas a^* y b^* en comparación con las de sorbitol ($p < 0,001$), teniendo así la utilización del glicerol un menor impacto sobre el color de los filetes. Por su parte, en los filetes *congelados*, el empleo de glicerol dio lugar a valores significativamente superiores de la coordenada a^* en comparación con el uso de sorbitol ($p < 0,01$). Finalmente, los valores de luminosidad y blancura fueron significativamente superiores al utilizar sorbitol en filetes cocinados ($p < 0,01$). Así pues los resultados en los tres tipos de muestras (*congeladas*, *descongeladas* y *cocinadas*) indicarían que la utilización de glicerol en las envueltas tendría un efecto más favorable sobre los diversos parámetros del color de los filetes de salmón.

Las diferencias observadas entre los dos tipos de plastificantes empleados no podrían explicarse, como se realizó en los capítulos anteriores por las diferencias observadas entre muestras RAC y RDC en las pérdidas por goteo al descongelar. En esos casos, se señalaba que mayores pérdidas por goteo implicaban una mayor desnaturalización proteica y por tanto menores valores de a^* y b^* . En este caso, no existe esa relación. Sin embargo, sí podría explicarse por el efecto de la oxidación lipídica. Es posible que la estructura de la envuelta sea diferente (quizás más homogénea) cuando se utiliza glicerol en vez de sorbitol combinado con SOJA; por ello, los carotenoides estarían más protegidos contra la oxidación cuando en la envuelta se emplea glicerol. Esta

hipótesis se verá respaldada con el estudio de los parámetros de oxidación lipídica (*peróxidos* y *SRATB*) en el apartado siguiente (*Tabla 6.6*).

6.5. Índices de oxidación.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los indicadores de oxidación obtenidos por el valor de *dienos conjugados*, el índice o valor de *peróxidos* y el valor de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (*SRATB*) se muestran en la *Tabla 6.6*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además el momento de aplicación de la envuelta y el tipo de plastificante empleado. Los valores de los *dienos conjugados* vienen expresados en milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos, los *peróxidos* en miliequivalentes de cumene por kg de carne o de lípidos y los compuestos secundarios (*SRATB*) en mg de malondialdehído por kg de carne o de lípidos.

Los contenidos medios de *dienos conjugados* en los filetes RAC oscilaron entre 27,93 y 42,11 milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos, presentando las muestras recubiertas con SOJA+sorbitol 1:1 los valores más elevados ($p < 0,05$), y las muestras sin envuelta (30,39 milimoles), las SOJA sin plastificante (30,59 milimoles) y las SOJA+glicerol 2:1 (27,93 milimoles) los menores contenidos ($p < 0,05$). En los filetes RDC, los valores medios se encontraron entre 36,84 y 48,64 milimoles de hidroperóxidos por kg de lípidos. En este caso, fueron las muestras SOJA+glicerol 1:1 (43,69 milimoles) y las glaseadas (48,34 milimoles) las que presentaron los valores mayores,

Tabla 6.6. Indicadores de la oxidación lipídica (media ± desviación estándar) de los filetes de pescado RAC y RDC tras 4 meses de almacenamiento en congelación.

Muestras	Dienes conjugados			Valor de peróxidos			Valor de SRATB		
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)				
Recubiertas antes de congelar									
Sin envuelta	30,39 ± 4,03a	2,16 ± 0,58c	9,49 ± 2,57cd	3,00 ± 0,01d	13,22 ± 0,04c				
SOJA	30,59 ± 0,48a	1,31 ± 0,20ab	6,90 ± 1,06b	2,80 ± 0,11c	14,79 ± 0,56d				
SOJA+sorbitol 1:1	42,11 ± 3,54c	1,66 ± 0,08b	8,37 ± 0,42bc	2,28 ± 0,39ab	11,51 ± 1,98b				
SOJA+sorbitol 2:1	37,26 ± 2,30bc	2,34 ± 0,15c	10,49 ± 0,69d	2,49 ± 0,13b	11,13 ± 0,57b				
SOJA+glicerol 1:1	31,97 ± 5,63ab	1,69 ± 0,09a	5,96 ± 0,34a	2,15 ± 0,10a	7,79 ± 0,35a				
SOJA+glicerol 2:1	27,93 ± 6,06a	1,56 ± 0,13a	5,49 ± 0,43a	2,52 ± 0,22bc	8,32 ± 0,72a				
Recubiertas tras congelar									
Sin envuelta	26,91 ± 0,65a	1,76 ± 0,06c	7,54 ± 0,26c	3,03 ± 0,01f	12,97 ± 0,02bc				
Glaseado	48,34 ± 9,76c	2,93 ± 0,27d	13,21 ± 1,65e	2,48 ± 0,02d	14,91 ± 2,16c				
SOJA	39,33 ± 1,93bc	1,03 ± 0,06a	5,71 ± 0,33b	2,20 ± 0,18c	12,19 ± 1,00b				
SOJA+sorbitol 1:1	40,61 ± 9,82bc	1,38 ± 0,16b	9,36 ± 1,06d	2,73 ± 0,18e	18,49 ± 1,23e				
SOJA+sorbitol 2:1	36,84 ± 7,84ab	1,83 ± 0,06c	8,59 ± 0,28cd	2,74 ± 0,11e	12,91 ± 0,52bc				
SOJA+glicerol 1:1	43,69 ± 5,60bc	0,92 ± 0,08a	4,99 ± 0,34a	1,51 ± 0,17a	7,51 ± 0,74a				
SOJA+glicerol 2:1	41,33 ± 8,35bc	1,35 ± 0,22b	5,88 ± 0,96b	1,95 ± 0,25b	9,49 ± 1,09a				
A	**	ns	ns	ns	ns				
B	ns	***	***	***	***				

A: aplicación del recubrimiento antes de congelar versus después de congelar. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)

B: recubrimiento con sorbitol versus recubrimiento con glicerol; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

SRATB: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

(1): mMol hidropéroxidos/kg lípidos

(2): meq de cumene/kg lípidos

(4): mg de malondialdehído/kg carne; (5): mg de malondialdehído/kg lípidos

mientras que las muestras sin envuelta obtuvieron los contenidos inferiores (26,91 milimoles).

Los valores medios de *peróxidos* en las muestras RAC (*Tabla 6.6*) fluctuaron entre 1,56 y 2,34 meq de cumene por kg de carne, siendo para las muestras sin envuelta de 2,16 meq de cumene por kg de carne. Las muestras sin envuelta y SOJA+sorbitol 2:1 presentaron los valores significativamente mayores, mientras que las muestras con SOJA+glicerol en ambas proporciones presentaron los contenidos significativamente menores. Una tendencia similar se observó al expresar los valores respecto al contenido en grasa, los contenidos oscilaron entre 5,49 y 10,49 meq de cumene por kg de lípidos (9,49 meq en las sin envuelta), siendo de nuevo las muestras recubiertas con SOJA+glicerol 1:1 y SOJA+glicerol 2:1 las que presentaron los menores valores ($p<0,05$). Los filetes RDC (*Tabla 6.6*) presentaron cantidades entre 0,92 y 2,93 meq de cumene por kg de carne y entre 4,99 y 13,21 meq de cumene por kg de lípidos, siendo los valores sin envuelta de 2,22 y 9,52 meq de cumene por kg lípidos. En ambos casos, los filetes glaseados presentaron los mayores contenidos de peróxidos ($p<0,05$), mientras que los envueltos con SOJA+glicerol 1:1 presentaron los menores valores ($p<0,05$), conjuntamente con las muestras SOJA expresados en meq de cumene por kg de carne.

Los valores medios de *SRATB* en las muestras RAC (*Tabla 6.6*) oscilaron entre 2,15 y 2,80 mg de malondialdehído por kg de carne, siendo el valor significativamente mayor en los filetes control (3,00 mg) en comparación con los filetes envueltos, cualesquiera que fuera su formulación. Al expresar los datos de oxidación en relación con el contenido graso se obtuvieron valores de entre 7,79 y 14,79 mg de malondialdehído por kg de

lípidos. En este caso, los mayores contenidos de SRATB se encontraron en los filetes sin envuelta (13,22 mg) y en los recubiertos con SOJA (14,79 mg) ($p < 0,05$) y los menores en los recubiertos con SOJA+glicerol 1:1 (7,79 mg) y SOJA+glicerol 2:1 (8,32 mg) ($p < 0,05$).

En las muestras RDC, los valores de SRATB (Tabla 6.6) se encontraron en un rango entre 1,51 y 2,48 mg de malondialdehído por kg de carne. Las muestras sin envuelta presentaron cantidades significativamente superiores (3,03 mg), en comparación con los filetes glaseados o envueltos con SOJA independientemente del tipo de plastificante o proporción utilizada. Por su parte, las muestras SOJA+glicerol 1:1 obtuvieron los valores más bajos de SRATB en relación al resto de muestras recubiertas o no ($p < 0,05$). Al expresar los resultados en función del contenido graso, se obtuvieron contenidos entre 7,51 y 18,49 mg de malondialdehído por kg de lípidos. De nuevo, los valores son significativamente inferiores en las muestras recubiertas con SOJA+glicerol 1:1 y SOJA+glicerol 2:1. Sin embargo en este caso, las muestras con los mayores contenidos fueron las recubiertas con SOJA+sorbitol 1:1 (18,49 mg), siendo significativamente superiores incluso a los obtenidos por las muestras sin envuelta (12,97 mg) o glaseadas (14,91 mg).

Los valores de SRATB encontrados en el presente estudio para las distintas envueltas de SOJA serían superiores a los descritos por Ambardekar (2007) en filetes de salmón rosado recubiertos con concentrado proteico de soja y glicerol (4,7% proteína/1,8% plastificante) almacenados en congelación durante 3 meses (0,72 mg malondialdehído/kg carne). Esta diferencia podría deberse a que han estado en congelación un mes menos y al distinto contenido lipídico de los pescados. Por otro lado, si referimos la oxidación de los filetes

recubiertos en función de la oxidación de los filetes sin envuelta, obtendríamos que en el trabajo de Ambardekar (2007) los filetes con concentrado proteico de soja y glicerol presentarían un 27,01% menos de oxidación respecto a los sin envuelta, mientras que en el presente estudio esta reducción podría llegar hasta un 28,83% en las muestras RAC y 49,83% en las RDC (sobre carne). Sathivel (2005) también obtuvo resultados similares de SRATB en salmón rosado tras tres meses en congelación, habiendo utilizado diversas envueltas proteicas, entre ellas recubrimientos a partir de concentrado proteico de soja (1,4 mg de malondialdehído/kg carne). En ese estudio las reducciones serían de un 57,57% para las envueltas de soja e hidrolizados de fletán, y de un 45,45% para las envueltas de ovoalbúmina. Sin embargo, de nuevo habría que tener en cuenta que la duración del trabajo de Sathivel (2005) es de tres meses, un mes menos que el presente estudio, lo que supondría un 25% menos de tiempo de conservación. Finalmente, Kilinceker *et al.* (2009) también han descrito una reducción de los niveles de oxidación lipídica en filetes de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) recubiertos con diversas proteínas, gomas y harinas, y almacenados en congelación durante siete meses, observando los menores valores de SRATB al utilizar envueltas elaboradas con una mezcla de caseínas.

Los valores de los distintos *índices de oxidación* indican que la aplicación de envueltas de SOJA es efectiva a la hora de reducir la oxidación lipídica en el salmón congelado, especialmente las formulaciones con glicerol, proporcionando una mejor protección frente a la misma que el glaseado.

La reducción de la oxidación lipídica observada puede explicarse por dos propiedades fundamentales de las envueltas de SOJA: en primer lugar, las

envueltas pueden funcionar como barrera al oxígeno como sucede con las películas proteicas (McHugh & Krochta, 1994b; Maté & Krochta, 1996; Osés *et al.*, 2009), y especialmente las de soja (Gennadios *et al.*, 1993c), pudiendo retrasar así la oxidación lipídica. Concretamente, se ha sugerido que envueltas con aislado proteico de soja controlarían la oxidación lipídica en productos cárnicos precocinados (Park *et al.*, 2002). En segundo lugar, estas envueltas presentan actividad antioxidante debida principalmente a los compuestos polifenólicos de la soja y a las propiedades antioxidantes de sus proteínas. Como se comentó en la introducción, los compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante en la soja son las isoflavonas, los isómeros del ácido clorogénico y el ácido ferúlico, entre otros (Pratt & Birat, 1979; Athika Devi *et al.*, 2009). Se ha constatado que las proteínas de soja presentan actividad antioxidante de los lípidos de los alimentos (Elias *et al.*, 2008).

Al comparar los dos momentos de aplicación, únicamente se observan diferencias en el contenido de dienos conjugados, siendo inferiores los valores para los filetes RAC ($p < 0,01$). Sin embargo, no hay diferencias en el valor de peróxidos ni en el de SRATB. Así pues, al contrario de lo que sucedía en los capítulos anteriores con las envueltas de CPS y OVO, parece ser que el momento de aplicación no tiene un gran efecto sobre la oxidación lipídica cuando se utilizan recubrimientos elaborados con SOJA.

Sin embargo, en relación al tipo de plastificante utilizado en la elaboración de los recubrimientos, se observaron diferencias significativas en los valores de *peróxidos* y *SRATB*, tanto expresados sobre carne ($p < 0,001$) o sobre materia grasa ($p < 0,001$). Las envueltas con glicerol en su formulación

obtuvieron valores significativamente inferiores tanto de *peróxidos* como de *SRATB* ($p < 0,001$), cualesquiera que fuera la expresión de los resultados.

Como ya se comentó en el *Capítulo 4*, los menores valores de oxidación observados en las envueltas con glicerol parecen chocar con los estudios realizados en películas independientes de proteínas de origen lácteo (McHugh & Krochta, 1994b; Chick & Ustunol, 1998; Sothorvit & Krochta, 2000), en los cuales, las películas con sorbitol presentaron una menor permeabilidad al oxígeno que las preparadas con glicerol. No obstante, es preciso tener en cuenta que al aplicar los recubrimientos líquidos sobre un alimento se pueden producir modificaciones sus propiedades. En las películas secas, el glicerol es un plastificante más efectivo a la hora de mejorar las propiedades mecánicas (Sothorvit & Krochta, 2001; Dangaran & Tomasula, 2006), no cristaliza con el tiempo como el sorbitol (Osés *et al.*, 2008) y se encuentra en estado líquido en condiciones ambientales estándar, por lo podría presentar una mayor eficiencia a la hora de interferir en las distintas uniones entre las cadenas proteicas (en comparación con el sorbitol), mejorando la exposición de los grupos antioxidantes de los aminoácidos de las proteínas de soja. Algo parecido podría suceder con las envueltas en el pescado congelado.

Observando conjuntamente los resultados de la utilización de las proteínas de lactosuero, ovoalbúmina y soja en la elaboración de envueltas para la conservación del salmón congelado, se detecta en los tres casos, en mayor o menor medida, una mayor efectividad en el descenso de la oxidación cuando se emplea como plastificante glicerol en vez de sorbitol.

Por otro lado, la utilización de distintas proporciones de los plastificantes no parece ejercer un gran impacto en la capacidad antioxidante de los recubrimientos de SOJA, a pesar de que se ha constatado para diversos plastificantes, incluidos el sorbitol y el glicerol, que un aumento de la cantidad de plastificante utilizada incrementa la permeabilidad al oxígeno en películas proteicas (Sothorvit & Krochta, 2000; Osés *et al.*, 2008). Así pues, aunque cabría esperar una mayor protección por parte de las envueltas con un menor contenido en plastificante (proporciones 2:1), esta diferencia no se ve reflejada en los datos. Posiblemente, con proporciones 2:1 de plastificante, las envueltas serían menos permeables al oxígeno aunque quizás no tan consistentes, mientras que las proporciones 1:1 serían más permeables pero constituirían una barrera física más consistente.

En último lugar, al comparar los resultados de los distintos índices de oxidación lipídica obtenidos con los recubrimientos con CPS (*Capítulo 4*) y OVO (*Capítulo 5*), observamos que los valores de *dienos conjugados* son similares en los tres tipos de envueltas.

Considerando en conjunto los resultados de todos los filetes recubiertos con SOJA, tanto RAC como RDC, las reducciones medias en los valores de *peróxidos* y de *SRATB* con respecto a las muestras sin envuelta (15% y 12,77% respectivamente) fueron inferiores a las obtenidas con CPS u OVO (*Capítulo 5*). Estos resultados sugerirían un estado de oxidación lipídica más avanzado en los filetes recubiertos con SOJA tras los cuatro meses de almacenamiento en congelación, en comparación con aquellos filetes en los que se ha utilizado CPS u OVO como recubrimiento, en las condiciones aquí testadas. Sin embargo, se observó que las muestras plastificadas con glicerol

en ambas proporciones provocaron reducciones tanto en los valores de *peróxidos* como en los de *SRATB* similares a los observados en el caso de la utilización de CPS u OVO.

Finalmente, analizando por separado los distintos tipos de envueltas observamos que en las envueltas con OVO, la envuelta más eficaz desde el punto de vista de la protección frente a la oxidación lipídica fue la SOJA+glicerol 1:1 RDC, cuya utilización supondría una reducción de los valores de *SRATB* del 42,1% respecto a los filetes sin envuelta.

Capítulo 7 Efecto del tratamiento térmico o con ultrasonidos con o sin transglutaminasa sobre recubrimientos elaborados con concentrado y aislado proteicos de lactosuero (CPS y APS) aplicados a filetes de salmón del Atlántico congelados

7.1. Características del salmón empleado como materia prima

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los distintos parámetros químicos y físico-químicos de la carne de salmón utilizada como materia prima en este estudio, se muestran en la *Tabla 7.1*. Se incluye la *composición química*, los valores de *pH* y *color* CIELab y los *índices de oxidación lipídica*.

Tabla 7.1. Caracterización fisicoquímica del salmón utilizado como materia prima (media \pm desviación estándar).

Composición	
Extracto seco (g/100 g carne)	35,45 \pm 0,70
Lípidos (g/100 g carne)	13,21 \pm 4,02
Cenizas (g/100 g carne)	1,00 \pm 0,02
pH	
	6,18 \pm 0,02
Color	
L*	44,26 \pm 1,45
a*	13,70 \pm 0,55
b*	12,60 \pm 0,54
Blancura	41,59 \pm 1,10
Índices de oxidación lipídica	
Dienos conjugados (mMol hidroperóxidos/kg lípidos)	39,01 \pm 1,84
Peróxidos (meq cumene/kg carne)	0,78 \pm 0,37
Peróxidos (meq cumene/kg lípidos)	5,07 \pm 1,01
Valor SRATB (mg MDA/kg carne)	0,24 \pm 0,09
Valor SRATB (mg MDA/kg lípidos)	1,67 \pm 0,24

SRATB: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

MDA: malondialdehído

La composición química descrita en este capítulo para el salmón del Atlántico se ajusta, en rasgos generales, con la descrita por Shearer *et al.* (1994) y presenta una elevada similitud con la explicada para el salmón fresco empleado en el *Capítulo 5 (apartado 5.1)*, tanto en los valores de *composición*, *pH* y *parámetros de color*, como en los valores relativos a los *índices de oxidación lipídica*. Así pues, para la discusión de estos resultados se remite a la realizada en el capítulo anteriormente citado en aras de evitar la repetición.

7.2. Rendimientos, pérdidas por goteo y cocinado.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *rendimiento*, *rendimiento tras descongelar*, las *pérdidas por goteo al descongelar*, las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, las *pérdidas por cocinado* y los valores de *pH* de los filetes de salmón tras el almacenamiento, se muestran en la *Tabla 7.2*. En ésta, también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además la utilización de concentrado o aislado proteico de lactosuero. Todos los parámetros, a excepción del *pH*, vienen expresados en porcentaje (%).

La aplicación de envueltas proteicas de CPS y APS sometidas a diversos tratamientos aumenta significativamente el *rendimiento* de los filetes en comparación con los salmones sin envuelta, al igual que se ha visto en las envueltas de CPS, OVO y SOJA en los *Capítulos 4, 5 y 6 (apartados 4.2, 5.2, 6.2)*. Los incrementos en los *rendimientos* medios son del 2,16-3,72% para las muestras CPS y del 1,17-3,22% para las muestras APS, observándose los mayores incrementos en las muestras calentadas con o sin TG, tanto para las

Tabla 7.2. Rendimiento, rendimiento al descongelar, pérdidas por goteo al descongelar y tras almacenamiento en refrigeración, pérdidas por cocinado y pH tras la descongelación (media \pm desviación estándar) de muestras recubiertas con CPS o APS sometidos diversos tratamientos, tras 4 meses de almacenamiento en congelación a -10 °C.

Muestras	Rendimiento (%)	Rendimiento tras descongelar (%)	Pérdidas por goteo al descongelar (%)	Pérdidas por goteo tras refrigeración (%)	Pérdidas por cocinado (%)	pH
Concentrado proteico de suero						
Sin envuelta	99,46 \pm 0,14a	94,91 \pm 1,36a	4,58 \pm 1,24ac	15,50 \pm 2,57a	10,71 \pm 0,53b	6,31 \pm 0,03a
Calentadas	102,79 \pm 0,39c	98,60 \pm 0,51b	4,08 \pm 0,46ab	15,66 \pm 0,79a	8,55 \pm 2,00ab	6,33 \pm 0,04a
Calentadas+TG	103,18 \pm 0,66c	99,60 \pm 0,56b	3,47 \pm 1,05a	15,07 \pm 5,14a	6,73 \pm 1,56a	6,39 \pm 0,04b
Ultrasonificadas	101,62 \pm 0,35b	95,61 \pm 0,91a	5,92 \pm 1,00c	14,99 \pm 0,65a	6,61 \pm 0,44a	6,33 \pm 0,01a
Ultrasonificadas+TG	101,86 \pm 0,61b	96,11 \pm 0,24a	5,64 \pm 0,49bc	13,49 \pm 3,49a	6,91 \pm 0,58a	6,34 \pm 0,01ab
Aislado proteico de suero						
Sin envuelta	99,46 \pm 0,14a	94,91 \pm 1,36a	4,58 \pm 1,24a	15,50 \pm 2,57a	10,71 \pm 0,53b	6,31 \pm 0,03a
Calentadas	102,68 \pm 0,68d	97,07 \pm 1,19bc	5,46 \pm 0,54a	13,78 \pm 1,94a	8,93 \pm 0,69a	6,32 \pm 0,06a
Calentadas+TG	102,68 \pm 0,57d	97,78 \pm 0,37c	4,77 \pm 0,77a	14,60 \pm 0,84a	8,58 \pm 0,44a	6,38 \pm 0,03a
Ultrasonificadas	101,67 \pm 0,32c	94,25 \pm 0,69a	7,30 \pm 0,46b	13,93 \pm 1,40a	8,14 \pm 1,48a	6,35 \pm 0,04a
Ultrasonificadas+TG	100,63 \pm 0,54b	95,52 \pm 1,26ab	5,07 \pm 1,05a	13,27 \pm 1,56a	8,73 \pm 0,39a	6,32 \pm 0,05a
A	ns	ns	ns	ns	**	ns

A: empleo de concentrado proteico de suero vs aislado; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \ge 0,05)
a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)
Tratamientos: calentamiento (80 °C/30 min.); ultrasonificación (50%/30 min.); adición de transglutaminasa (TG: 10 unidades/g proteína)

envueltas CPS como para las APS. Además, al aplicarse recubrimientos ultrasonicados con o sin TG, se obtienen menores incrementos del *rendimiento* que con los recubrimientos calentados ($p < 0,05$). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas entre el empleo de CPS o APS. Los incrementos descritos coinciden en general con los observados en el *Capítulo 4 (apartado 4.3)*, para envueltas de CPS aplicadas antes de la congelación (2,75-4,25%). El aumento del rendimiento de los filetes congelados se debe a la fijación satisfactoria de las envueltas sobre los filetes de pescado, lo que provoca un aumento de peso y por tanto del rendimiento. Las envueltas sometidas a calentamiento con o sin adición de transglutaminasa (TG) parecen adherirse mejor a las piezas de pescado que cuando se emplean ultrasonidos, lo que daría lugar a mayores rendimientos y recubrimientos de mayor grosor. El empleo de TG no afecta al rendimiento tanto en las envueltas calentadas como en las sonicadas salvo en las muestras envueltas con APS ultrasonicadas en las que causa un descenso del rendimiento.

Los *rendimientos tras descongelar* de las muestras con envueltas de CPS o APS calentadas con o sin TG son significativamente superiores al resto tanto en los filetes sin envuelta como en los ultrasonicados. Además, las muestras tratadas con ultrasonidos no fueron significativamente diferentes de las que no tenían envuelta. Por tanto, parece que con las envueltas tratadas térmicamente se evita de manera más eficaz la pérdida de humedad o bien, la envuelta queda mejor adherida que con las ultrasonicadas. Es posible que las envueltas calentadas funcionen mejor como barreras frente al vapor de agua que las envueltas ultrasonicadas (con o sin TG), evitando así una mayor pérdida de agua durante el almacenamiento en congelación. Finalmente, el

empleo de TG no afecta al rendimiento al descongelar tanto en las envueltas calentadas como en las sonicadas.

Como ya se comentó en la introducción, tanto el carácter inherentemente hidrofílico de las proteínas como la adición de plastificante, hacen que las películas de base proteica supongan pobres barreras al vapor de agua. Así pues, para mejorar las propiedades barrera de los films pueden emplearse diversos tratamientos como el calentamiento (Pérez-Gago *et al.*, 1999), la ultrasonicación (Banerjee *et al.*, 1996) o la adición de enzimas de acción “cross-linking” (Stuchell & Krochta, 1994; Lim *et al.*, 1998; Yildirim & Hettiarachchy, 1998). A la vista de los resultados del presente estudio, aunque el efecto puede que no sea el mismo en películas que en recubrimientos, el calentamiento sería el método más efectivo de entre los anteriores, a la hora de evitar la pérdida de humedad por parte de los filetes. Al mismo tiempo, este efecto podría estar relacionado con la mejor adhesión observada por parte de las muestras calentadas a la hora de analizar los *rendimientos*.

Las *pérdidas por goteo al descongelar* oscilaron entre 3,47 y 5,92% para las CPS y entre 4,77 y 7,30% para las APS, siendo para las muestras sin envuelta del 4,58%. Tanto en el caso de las envueltas CPS como en las APS, los filetes recubiertos con envueltas ultrasonicadas sin TG presentaron las pérdidas significativamente mayores.

Respecto a las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, no se observan diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los distintos tratamientos ni para las envueltas con CPS ni para las APS. Las

pérdidas se situaron en un rango de 13,49-15,66% para las CPS y 13,27-14,60% para las APS, siendo del 15,50% para las muestras sin envuelta.

Las *pérdidas por cocinado* en las muestras sin envuelta (10,71%) son significativamente mayores que en el resto de muestras envueltas sin que existan diferencias significativas entre uno u otro tratamiento. En este caso, a diferencia de lo que sucedió en los capítulos anteriores con CPS, OVO y SOJA, sí parece que la porción de envuelta que ha quedado sobre el pescado tras la descongelación ha protegido de las pérdidas durante el cocinado de las muestras. Al comparar la utilización de CPS o APS en la elaboración de las envueltas, se observó que el empleo de CPS daba lugar a pérdidas significativamente menores ($p < 0,01$).

Tras el almacenamiento en congelación, se observa un aumento del pH, en comparación con el inicial en fresco (6,18), tanto en las muestras sin envuelta (6,31) como en las muestras con envueltas proteicas tratadas (6,33-6,39 para las CPS, 6,32-6,38 para las APS). La aplicación de un tratamiento u otro parece no afectar significativamente al pH de los filetes, aunque las muestras recubiertas con envueltas calentadas y con TG presentan valores superiores al resto tanto en las envueltas de CPS (6,39) como de APS (6,38), aunque únicamente fueron significativos en el caso de las CPS.

7.3. Extracto seco, lípidos y cenizas

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *extracto seco*, *extracto seco magro*, *contenido en grasa* y *contenido en cenizas* de los filetes de salmón tras el almacenamiento en congelación y *del extracto seco tras cocinado*, se muestran en la *Tabla 7.3*. En ésta, también se indican

Tabla 7.3. Extracto seco, extracto seco magro, contenidos en lípidos y cenizas de los filetes de salmón recubiertos con CPS o APS sometidos diversos tratamientos tras 4 meses de almacenamiento en congelación y extracto seco tras cocinado (g/100g pescado; media \pm desviación estándar).

Muestras	Descongeladas			Cocinadas	
	Extracto seco	Contenido lipídico	Extracto seco magro	Cenizas	Extracto seco tras cocinado
Concentrado proteico de suero					
Sin envuelta	40,17 \pm 1,16c	20,09 \pm 3,76a	20,08 \pm 4,29a	1,08 \pm 0,03a	41,82 \pm 2,01b
Calentadas	37,82 \pm 0,21a	19,16 \pm 1,66a	18,66 \pm 1,86a	1,08 \pm 0,03a	39,71 \pm 0,91a
Calentadas+TG	38,06 \pm 0,43a	21,59 \pm 1,13a	16,48 \pm 1,19a	1,06 \pm 0,03a	39,12 \pm 1,04a
Ultrasonificadas	39,35 \pm 0,26bc	20,70 \pm 0,60a	18,65 \pm 0,38a	1,05 \pm 0,03a	40,32 \pm 0,59ab
Ultrasonificadas+TG	38,84 \pm 0,42ab	20,40 \pm 1,29a	18,44 \pm 1,63a	1,04 \pm 0,05a	40,23 \pm 0,25ab
Aislado proteico de suero					
Sin envuelta	40,17 \pm 1,16a	20,09 \pm 3,76a	20,08 \pm 4,29a	1,08 \pm 0,03b	41,82 \pm 2,01a
Calentadas	40,40 \pm 0,72a	20,87 \pm 0,92ab	19,52 \pm 1,58a	1,02 \pm 0,01a	40,57 \pm 0,86a
Calentadas+TG	40,88 \pm 0,10a	23,42 \pm 0,45b	17,46 \pm 0,55a	1,02 \pm 0,01a	38,99 \pm 2,71a
Ultrasonificadas	40,18 \pm 0,83a	21,08 \pm 1,20ab	19,10 \pm 0,52a	1,00 \pm 0,04a	39,69 \pm 1,04a
Ultrasonificadas+TG	40,38 \pm 1,03a	20,50 \pm 0,17ab	19,89 \pm 1,17a	0,98 \pm 0,05a	40,38 \pm 0,43a

A: empleo de concentrado proteico de suero vs aislado; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

Tratamientos: calentamiento (80 °C/30 min.); ultrasonificación (50%/30 min.); adición de transglutaminasa (TG: 10 unidades/g proteína)

los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además la utilización de concentrado o aislado proteico de lactosuero. Los valores del *extracto seco*, lípidos, *extracto seco magro*, *extracto seco tras cocinado* y *cenizas* vienen expresados en g/100g de carne.

El *contenido lipídico* medio de los filetes osciló entre un 19,16 y 23,42%, porcentajes similares a los descritos en el *Capítulo 4 (apartado 4.5)*. De nuevo, las diferencias observadas en la composición de los filetes pueden explicarse como resultado de la variabilidad inter- e intraindividual de los salmones (Refsgaard *et al.*, 1998a, Morkore *et al.*, 2001) y no como consecuencia del tipo o tratamiento de los recubrimientos.

El contenido medio de *extracto seco* de los filetes con CPS osciló entre 37,82 y 39,35% y el de las muestras con APS entre 40,18 y 40,88%. Las muestras sin envuelta presentaron contenidos significativamente mayores de *extracto seco* (40,17%) respecto a las muestras con envuelta de CPS calentadas o sonicadas, lo que podría indicar que el uso de los recubrimientos de CPS protege a los filetes frente a pérdidas de humedad durante el almacenamiento. Por otra parte, las muestras CPS calentadas, con o sin adición de TG, mostraron valores significativamente menores que las sonicadas. Una posible explicación a este fenómeno sería la mejor adhesión de las envueltas calentadas sobre la superficie de los filetes. Esta hipótesis se vería respaldada por los datos obtenidos de *rendimiento (Tabla 7.2)*, puesto que las envueltas calentadas presentaron un mayor rendimiento debido probablemente a una mejor adhesión de estas envueltas a los filetes. También es posible, como se señaló anteriormente, que las envueltas calentadas

funcionen mejor como barreras frente al vapor de agua que las envueltas ultrasonicadas (con o sin TG). Sin embargo, en las muestras recubiertas con APS no hubo diferencias significativas en el *extracto seco* de los filetes descongelados.

Una vez más, a causa de que las diferencias en el *contenido graso* existentes entre los filetes utilizados para cada tipo de recubrimiento provocan variaciones en los valores de extracto seco, se calculó el contenido en *extracto seco magro* de las muestras. El contenido medio en *extracto seco magro* de las muestras osciló entre 16,48-20,08%, lo que significaría valores de humedad de la materia magra de un rango entre 79,92-83,52%. No se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados ni en el caso de los recubrimientos con CPS ni en los de APS ($p \geq 0,05$), aunque el extracto seco magro fue siempre inferior, aunque no significativamente, en las muestras recubiertas que en las que carecían de envuelta.

En relación al contenido mineral, los filetes CPS presentaron contenidos en *cenizas* similares, con valores medios que variaron entre 1,04-1,08%, lo que significa que estas envueltas no modificarían el contenido mineral de los filetes de salmón durante su almacenamiento en congelación ni tras su descongelación. Sin embargo, los filetes recubiertos con APS mostraron contenidos de *cenizas* (0,98-1,02%) significativamente inferiores a los descritos para las muestras sin envuelta (1,08%), lo que podría relacionarse con la permanencia de la envuelta de APS en muestras descongeladas y el menor contenido mineral del APS en comparación con el CPS.

Respecto a la utilización de CPS o APS en la elaboración de los recubrimientos, se observaron contenidos significativamente superiores de *extracto seco* y menores de *cenizas* al utilizarse APS ($p < 0,001$). Sin embargo, las diferencias respecto al *extracto seco* desaparecieron al calcularlo en función del contenido magro (*extracto seco magro*). Las discrepancias observadas respecto al contenido de cenizas entre CPS y APS podrían explicarse por las diferencias en la composición de ambos. Como ya se comentó en la introducción, los APS presentan un mayor contenido proteico y menor contenido de grasa, lactosa y minerales que los CPS (Banerjee & Chen, 1995; Morr & Ha, 1993). Como se ha descrito en Material y Métodos (*Capítulo 3*), el CPS utilizado en el presente estudio presenta un contenido de cenizas superior al del APS, lo que podría explicar el mayor contenido en *cenizas* de los filetes recubiertos con CPS, partiendo de la base que parte de las envueltas queden en los filetes después de la descongelación.

En relación a los contenidos en *extracto seco* de las muestras *tras el cocinado*, sólo los filetes con CPS presentan diferencias significativas, mostrando las muestras calentadas, con o sin adición de TG, valores significativamente menores que las muestras sin envuelta, lo que supondría unos mayores contenidos de humedad en esos filetes tras el cocinado. Este efecto ya se observó en el *extracto seco* y podría explicarse por una mejor adhesión de las películas al ser calentadas y también, a la mejor protección ofrecida por los recubrimientos calentados frente a pérdidas de humedad durante el almacenamiento en congelación y durante el cocinado. En las muestras con APS, aunque no se observaron diferencias significativas, las muestras recubiertas mostraron un menor valor de *extracto seco* que las muestras sin envuelta. Estos resultados, tanto en CPS como en APS, podrían

relacionarse con las *pérdidas por cocinado*, las cuales fueron inferiores en las muestras envueltas, tanto calentadas como sonicadas, con o sin TG, en comparación con los filetes sin envuelta. Así pues, en relación al *extracto seco tras cocinado* no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de calentamiento o sonicación ni efecto de la adición de TG.

7.4. Parámetros de color.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes las coordenadas de color CIELab y blancura (whiteness) de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en congelación, una vez descongelados y tras su cocinado, se muestran en la *Tabla 7.4*. En ésta, también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además la utilización de concentrado o aislado proteico de lactosuero.

Los filetes *congelados* tras el almacenamiento con o sin envuelta, presentan un aumento de la coordenada de luminosidad (L^*) en comparación con el fresco (*Tabla 7.1*), fenómeno ya descrito en el *Capítulo 4 (apartado 4.4)* para las envueltas de CPS. Los filetes congelados con las diferentes envueltas muestran un menor valor en las coordenadas L^* , a^* y b^* que los filetes *congelados* sin envuelta, aunque con diferencias significativas sólo en algunas muestras recubiertas con CPS y en todas las envueltas con APS en los parámetros a^* y b^* . El color de las envueltas adheridas a los filetes pudo causar estos resultados. En el *Capítulo 4*, las muestras congeladas recubiertas con CPS+glicerol 2:1 antes de la congelación igualmente mostraron un menor valor de L^* y a^* en relación al pescado congelado sin envuelta. Es importante

Tabla 7.4. Parámetros de color de los filetes recubiertos con CPS o APS sometidos a diversos tratamientos antes de su congelación, tras 4 meses de almacenamiento a -10 °C. Valores de las muestras congeladas, descongeladas y cocinadas (media ± desviación estándar).

Muestras	L*	a*	b*	Blancura
Congeladas				
<i>Concentrado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	58,79 ± 4,90b	16,25 ± 1,91b	13,22 ± 1,31a	53,77 ± 5,33a
Calentadas	54,89 ± 1,59ab	14,03 ± 2,45ab	11,62 ± 2,63a	51,30 ± 2,82a
Calentadas+TG	53,72 ± 1,97a	15,25 ± 1,18ab	12,64 ± 1,28a	49,65 ± 2,46a
Ultrasonicadas	54,98 ± 1,44ab	13,32 ± 0,51a	10,86 ± 0,56a	51,80 ± 1,35a
Ultrasonicadas+TG	54,09 ± 1,65ab	14,34 ± 0,98ab	11,71 ± 0,80a	50,49 ± 1,99a
<i>Aislado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	58,79 ± 4,90b	16,25 ± 1,91b	13,22 ± 1,31b	53,77 ± 5,33a
Calentadas	56,91 ± 0,91ab	12,01 ± 0,51a	9,83 ± 0,32a	54,20 ± 0,69a
Calentadas+TG	55,66 ± 0,66ab	12,64 ± 1,48a	10,48 ± 1,42a	52,69 ± 1,13a
Ultrasonicadas	54,26 ± 2,07a	12,07 ± 0,51a	10,03 ± 0,53a	51,64 ± 2,05a
Ultrasonicadas+TG	55,85 ± 0,99ab	12,65 ± 0,29a	10,73 ± 0,57a	52,84 ± 1,12a
A	ns	***	**	*
Descongeladas				
<i>Concentrado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	42,44 ± 2,51a	17,30 ± 1,89b	18,76 ± 4,28b	36,97 ± 4,05a
Calentadas	46,52 ± 0,69c	12,73 ± 0,63a	10,61 ± 1,06a	44,01 ± 0,93b
Calentadas+TG	45,82 ± 0,46bc	12,09 ± 0,35a	10,22 ± 0,30a	43,56 ± 0,44b
Ultrasonicadas	44,46 ± 1,02ac	12,76 ± 0,23a	12,65 ± 0,36a	41,62 ± 1,09b
Ultrasonicadas+TG	43,92 ± 0,59ab	12,85 ± 0,44a	12,16 ± 0,63a	41,19 ± 0,51b
<i>Aislado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	42,44 ± 2,51a	17,30 ± 1,89c	18,76 ± 4,28b	36,97 ± 4,05a
Calentadas	51,51 ± 0,12b	12,41 ± 0,60b	12,80 ± 0,87a	48,33 ± 0,47b
Calentadas+TG	50,60 ± 0,62b	12,42 ± 0,26b	12,79 ± 0,39a	47,48 ± 0,43b
Ultrasonicadas	49,95 ± 1,04b	14,21 ± 0,65a	14,64 ± 0,73a	45,95 ± 1,33b
Ultrasonicadas+TG	50,13 ± 0,43b	12,85 ± 0,47ab	13,34 ± 0,49a	46,80 ± 0,63b
A	***	ns	***	***
Cocinadas				
<i>Concentrado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	69,63 ± 1,19a	15,02 ± 0,69a	17,36 ± 1,85a	61,92 ± 1,99a
Calentadas	73,84 ± 1,13b	13,40 ± 1,23bc	14,90 ± 1,12ab	67,04 ± 1,89c
Calentadas+TG	74,07 ± 1,19b	12,84 ± 0,85b	14,63 ± 1,42b	67,57 ± 1,91c
Ultrasonicadas	71,13 ± 1,95a	14,44 ± 0,85ac	17,11 ± 1,16a	63,45 ± 2,05ab
Ultrasonicadas+TG	73,49 ± 0,46b	13,15 ± 0,32bc	15,60 ± 1,06ab	66,54 ± 0,92bc
<i>Aislado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	69,63 ± 1,19a	15,02 ± 0,69b	17,36 ± 1,85b	61,92 ± 1,99a
Calentadas	74,07 ± 1,33b	10,92 ± 0,74a	14,31 ± 0,17ba	68,43 ± 1,25b
Calentadas+TG	74,86 ± 0,72b	10,82 ± 1,09a	14,19 ± 0,47a	69,16 ± 0,95b
Ultrasonicadas	75,95 ± 0,27b	10,25 ± 0,79a	13,40 ± 0,51a	70,62 ± 0,56b
Ultrasonicadas+TG	74,39 ± 1,78b	11,12 ± 0,24a	13,24 ± 0,11a	69,10 ± 1,60b
A	**	***	***	***

A: empleo de concentrado proteico de suero vs aislado; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

Tratamientos: calentamiento (80 °C/30 min.); ultrasonificación (50%/30 min.); adición de transglutaminasa

(TG: 10 unidades/g proteína)

destacar que no se observa influencia clara del tratamiento (calentamiento o ultrasonidos) ni de la adición de TG en el color de las muestras congeladas.

A diferencia de los pescados con envuelta de los capítulos anteriores (4, 5 y 6), los pescados descongelados procedentes de muestras con envueltas calentadas o sonicadas presentan unos parámetros de color parecidos al del pescado fresco (*Tabla 7.1*), sobre todo las envueltas con CPS sonicadas.

Tanto en los filetes con CPS como en los de APS, las muestras *descongeladas* sin envuelta presentaron valores de L^* y blancura menores y de a^* y b^* significativamente superiores que los descritos para los filetes con envuelta, cualesquiera que fuera su tratamiento. Este resultado coincide con lo observado en el *Capítulo 4* para la formulación CPS+glicerol 2:1 en muestras recubiertas antes de la congelación. De manera similar que en el congelado, no se observa influencia significativa del tratamiento (calentamiento o ultrasonidos) ni de la adición de TG en el color de las muestras *descongeladas*, tanto con CPS como con APS, aunque hay una tendencia a que las muestras con envueltas ultrasonicadas tengan valores de L^* y blancura inferiores y a^* y b^* mayores que las muestras con recubrimientos calentados.

En los filetes *cocinados*, no se observa influencia destacable del tratamiento (calentamiento o ultrasonidos) ni de la adición de TG en el color de las muestras cocinadas recubiertas con APS. En los filetes con recubrimientos CPS, sólo es destacable un menor valor de L^* y de blancura y mayor de b^* en las muestras ultrasonicadas sin TG en relación al resto de muestras tratadas, no habiendo influencia clara en el resto de parámetros de color ni del tipo de tratamiento ni de la adición de TG. En relación a las

muestras cocinadas procedentes de muestras sin envuelta, tanto el calentamiento como la ultrasonicación de los recubrimientos proteicos origina un mayor valor de L^* y blancura y menor de a^* y b^* en los pescados cocinados.

El tipo de producto proteico empleado (CPS o APS) en la elaboración de la envuelta afecta al color de los filetes. Los filetes *congelados* correspondientes a las muestras con CPS presentaron valores significativamente superiores de a^* ($p < 0,001$) y b^* ($p < 0,01$) que las APS, por lo que la variación de color en los filetes *congelados* en relación al color del pescado congelado sin recubrimiento es menor cuando empleamos CPS en la preparación de las envueltas. Tras la *descongelación* de los filetes, aquellos con APS presentaron mayores valores de L^* , blancura y b^* ($p < 0,001$) en relación con los de CPS. Así pues, también en los *descongelados*, los filetes con CPS presentan una menor variación del color con respecto al pescado descongelado sin envuelta. Finalmente, tras el *cocinado* los filetes con CPS presentan valores significativamente menores de L^* ($p < 0,01$) y blancura ($p < 0,001$) y mayores de a^* y b^* ($p < 0,001$).

7.5. Índices de oxidación.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los indicadores de oxidación obtenidos por el valor del índice valor de *peróxidos* y el valor de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (*SRATB*) se muestran en la *Tabla 7.5*. También se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos,

Tabla 7.5. Indicadores de la oxidación lipídica (media \pm desviación estándar) de los filetes de pescado recubiertos con CPS o APS sometidos diversos tratamientos, tras 4 meses de almacenamiento en congelación a -10°C .

Muestras	Valor de peróxidos			Valor de SRATB
	(2)	(3)	(4)	
Concentrado proteico de suero				
Sin envuelta	3,75 \pm 0,82a	18,63 \pm 1,29b	2,91 \pm 0,72b	14,40 \pm 0,91c
Calentadas	2,85 \pm 0,31a	14,85 \pm 0,86ab	1,78 \pm 0,27a	9,24 \pm 0,62b
Calentadas+TG	2,82 \pm 0,69a	13,03 \pm 2,95a	1,65 \pm 0,26a	7,62 \pm 1,12a
Ultrasonificadas	2,89 \pm 0,57a	13,95 \pm 2,75a	1,58 \pm 0,06a	7,64 \pm 0,26a
Ultrasonificadas+TG	3,13 \pm 0,53a	15,38 \pm 2,79ab	1,58 \pm 0,07a	7,75 \pm 0,66a
Aislado proteico de suero				
Sin envuelta	3,75 \pm 0,82a	18,63 \pm 1,29a	2,91 \pm 0,72b	14,40 \pm 0,91b
Calentadas	3,18 \pm 0,24a	15,26 \pm 1,73a	1,96 \pm 0,03a	9,39 \pm 0,52a
Calentadas+TG	3,52 \pm 0,86a	15,05 \pm 3,79a	2,00 \pm 0,38a	8,57 \pm 1,75a
Ultrasonificadas	3,25 \pm 0,53a	15,38 \pm 2,09a	1,76 \pm 0,14a	8,36 \pm 0,42a
Ultrasonificadas+TG	3,24 \pm 0,54a	15,83 \pm 2,67a	1,88 \pm 0,25a	9,17 \pm 1,25a
	ns	ns	**	*

A: empleo de concentrado proteico de suero vs aislado; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo ($p \geq 0,05$)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

SRATB: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

(2): meq de cumene/kg carne; (3): meq de cumene/kg lípidos

(4): mg de malondialdehído/kg carne; (5): mg de malondialdehído/kg lípidos

Tratamientos: calentamiento ($80^{\circ}\text{C}/30$ min.); ultrasonificación ($50\%/30$ min.); adición de transglutaminasa

(TG: 10 unidades/g proteína)

contrastando además la utilización de concentrado o aislado proteico de lactosuero. Los *peróxidos* vienen expresados en miliequivalentes de cumene por kg de carne o de lípidos y los compuestos secundarios (*SRATB*) en mg de malondialdehído por kg de carne o de lípidos.

Los valores medios de *peróxidos* en las muestras con CPS (*Tabla 7.5*) fluctuaron entre 2,82 y 3,13 meq de cumene por kg de carne, no encontrándose diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las distintas muestras. Al expresar los datos respecto al contenido en grasa los valores oscilaron entre 13,03 y 15,38 meq de cumene por kg de lípidos, siendo las muestras con las envueltas calentadas+TG y las ultrasonicadas las que presentaron menores contenidos ($p < 0,05$) respecto al resto de muestras. Por su parte, los filetes con APS (*Tabla 7.5*) presentaron valores entre 3,18 y 3,52 meq de cumene por kg de carne y entre 15,05 y 15,83 meq de cumene por kg de lípidos, tampoco observándose diferencias significativas entre las muestras con envuelta. Comparando los filetes con recubrimientos con los filetes sin envuelta, los valores de *peróxidos* de estos últimos (3,75 meq de cumene por kg de carne y 18,63 meq de cumene por kg de lípidos, respectivamente) fueron superiores a los de los salmones con cobertura. En el caso de las envueltas con CPS, los filetes sin envuelta presentaron diferencias significativas con algunos de los que tenían recubrimiento cuando se expresaron en meq de cumene por kg de lípidos. Sin embargo al utilizar APS, aunque los filetes sin envuelta obtuvieron un mayor contenido de *peróxidos*, no hubo diferencias significativas. Stuchell & Krochta (1995) tampoco obtuvieron reducciones significativas en los niveles de *peróxidos* en el salmón envuelto al utilizar una solución calentada de aislado de proteínas de lactosuero sin más añadidos, tras 77 días de congelación, en comparación con sus muestras control sin envuelta.

Los valores de *peróxidos* aquí obtenidos son superiores a los descritos para las envueltas de CPS en el *Capítulo 4 (apartado 4.5)*, lo cual se puede deber a la mayor temperatura de conservación empleada (-10 °C). Esto implicaría el desarrollo de una mayor rancidez al ralentizar menos la autooxidación lipídica.

En relación a los *productos de oxidación secundarios*, los resultados indican que los filetes recubiertos con CPS o APS, para cualquiera de los tratamientos testados, presentan una menor oxidación que las muestras sin recubrimiento.

Los contenidos medios de *SRATB* en las muestras con CPS (*Tabla 7.5*) oscilaron entre 1,58 y 1,78 mg de malondialdehído por kg de carne, siendo el valor significativamente mayor en los filetes sin envuelta (2,91 mg) en comparación con los filetes envueltos, cualesquiera que fuera su tratamiento. La misma tendencia se observó al expresar los datos de oxidación en relación con el contenido graso, obteniéndose contenidos de entre 7,62 y 9,24 mg de malondialdehído por kg de lípidos en las muestras envueltas. De nuevo, los valores de *SRATB* son superiores ($p < 0,05$) en las muestras sin envuelta (14,40 mg) en comparación con los recubiertos con CPS.

En las muestras con APS, los valores de *SRATB* (*Tabla 7.5*) se encontraron en un rango entre 1,76 y 2,00 mg de malondialdehído por kg de carne. De nuevo, las muestras sin envuelta presentaron un contenido (2,91 mg) significativamente mayor en comparación con los filetes envueltos, independientemente del tipo de tratamiento utilizado. Como en el caso anterior, la tendencia se repite al expresar los resultados en función del

contenido graso, obteniendo valores entre 8,36 y 9,39 mg de malondialdehído por kg de lípidos en las muestras recubiertas. De nuevo, las cantidades son significativamente mayores en las muestras sin envuelta (14,40 mg).

En vista de los resultados anteriormente descritos, al aplicar recubrimientos elaborados con CPS y APS con los dos tipos de tratamiento (calentamiento o ultrasonidos), tuvo lugar una reducción en la oxidación lipídica durante el almacenamiento en congelación, en comparación con las muestras sin recubrimiento. No hay estudios sobre mejoras en la oxidación de los alimentos por acción de ultrasonidos en recubrimientos proteicos. El único estudio que hay es sobre películas y relacionado con sus propiedades mecánicas. Así, Banerjee *et al.* (1996) obtuvieron películas con mejores propiedades mecánicas al ultrasonificar las disoluciones proteicas, al mejorar este tratamiento las interacciones moleculares de la red proteica de las películas.

En relación a las diferencias entre ambos tratamientos, se puede observar que no hay diferencias en la reducción del valor de peróxidos entre el calentamiento y los ultrasonidos aplicados (80 °C 30 minutos y 50% de potencia 30 minutos, respectivamente). Sin embargo, en los valores de SRATB, la reducción es mayor cuando se aplicó ultrasonidos que con el tratamiento térmico en las muestras sin transglutaminasa, observándose diferencias significativas en las envueltas de CPS cuando se expresaron mg de malondialdehído por kg de lípidos entre las muestras calentadas y las sonicadas.

En relación al efecto de la adición de transglutaminasa tras el calentamiento y la ultrasonificación, sólo se redujeron los valores de SRATB en las envueltas sometidas a tratamiento térmico, observándose diferencias significativas en el recubrimiento con CPS.

Otros estudios, pero en películas independientes de base proteica, señalaron, que al añadir transglutaminasa, se incrementa la fuerza tensil, se mejora la tracción de las películas y disminuye la solubilidad (Gennadios *et al.*, 2004). Concretamente Mahmoud & Savello (1992, 1993) y Truong *et al.* (2004) describieron variaciones en las propiedades de películas de proteínas de lactosuero, debidas fundamentalmente al entrecruzamiento covalente resultante de la acción de la transglutaminasa. Es posible que la acción de la enzima modifique la estructura del recubrimiento, haciéndolo más impermeable al oxígeno que cuando no se emplea. También es posible que induzca cambios en la estructura proteica, de forma que se expongan más grupos antioxidantes de los aminoácidos que reducen la alteración de los lípidos. En las muestras con envueltas tratadas con ultrasonidos, la transglutaminasa no tiene un efecto favorable en la reducción de la autooxidación, siendo incluso los valores algo superiores, aunque no significativamente, respecto a las que se recubrieron con recubrimientos sometidos únicamente a la acción de los ultrasonidos. Esta diferencia en el comportamiento entre las muestras con envueltas tratadas térmicamente y las sometidas a ultrasonidos se podría deber a las diferentes modificaciones estructurales de las proteínas que provocan estos tratamientos y que han sido observadas por otros autores (Gülseren *et al.*, 2007). Los cambios inducidos por los ultrasonidos no parecen ser los adecuados para permitir una acción

detectable de la transglutaminasa en las muestras de pescado analizadas, tal con sí sucede cuando se aplica calor en la preparación de las envueltas.

Comparando los valores de peróxidos y SRATB entre CPS y APS, se observaron mayores valores de SRATB obtenidos en las muestras con APS en comparación con las CPS con diferencias significativas ($p < 0,01$ y $p < 0,05$), cuando se expresan los valores por kg de carne y de grasa respectivamente. Posiblemente estas diferencia se deban a las distintas composiciones de ambos productos, que pueden influenciar en gran medida las propiedades barrera de las películas elaboradas a base de proteínas de lactosuero (Hong & Krochta, 2006). En nuestro caso puede que esto suceda en las envueltas, dando lugar a diferentes resultados a la hora de desnaturalizar y formar nuevas uniones en la matriz del polímero con la aplicación de los distintos tratamientos. La lactosa presente en el CPS actúa como plastificante pudiendo influenciar en gran medida las propiedades barrera y mecánicas de las películas elaboradas a base de proteínas de lactosuero (Hong & Krochta, 2006) y en el caso de los recubrimientos deje pasar menos oxígeno. Además es posible que la mayor cantidad de lactosa en los CPS favorezca la reacción de Maillard con las altas temperaturas provocadas por los fenómenos de cavitación durante la sonicación, incrementándose la formación de sustancias antioxidantes como han señalado Hiller & Lorenzen (2010) en dispersiones calentadas de proteínas de suero.

Capítulo 8 Efecto de la ultrasonificación sobre recubrimientos elaborados con concentrado y aislado proteicos de lactosuero (CPS y APS) aplicados a filetes de salmón del Atlántico congelados

8.1. Características del salmón empleado como materia prima

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los distintos parámetros químicos y físico-químicos de la carne de salmón utilizada como materia prima en este estudio, se muestran en la *Tabla 8.1*. Se incluye la *composición química*, los valores de *pH* y *color* CIELab y los *índices de oxidación lipídica*.

Tabla 8.1. Caracterización fisicoquímica del salmón utilizado como materia prima (media \pm desviación estándar).

Composición	
Extracto seco (g/100 g carne)	37,93 \pm 1,70
Lípidos (g/100 g carne)	17,07 \pm 1,33
Cenizas (g/100 g carne)	1,15 \pm 0,17
pH	
	6,12 \pm 0,03
Color	
L*	45,37 \pm 1,65
a*	19,49 \pm 1,26
b*	18,10 \pm 1,51
Blancura	41,95 \pm 1,71
Índices de oxidación lipídica	
Dienos conjugados (mMol hidroperóxidos/kg lípidos)	34,27 \pm 12,09
Peróxidos (meq cumene/kg carne)	1,84 \pm 0,81
Peróxidos (meq cumene/kg lípidos)	10,67 \pm 4,24
Valor SRATB (mg MDA/kg carne)	0,29 \pm 0,13
Valor SRATB (mg MDA/kg lípidos)	1,73 \pm 0,67

SRATB: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

MDA: malondialdehído

La composición química descrita en este capítulo para el salmón del Atlántico concuerda, en rasgos generales, con las descritas en los capítulos anteriores, especialmente con la mostrada en los *Capítulos 4 y 6* (*apartados 4.1 y 6.1*). No obstante, el contenido lipídico en este capítulo (17,07%) fue ligeramente menor al encontrado en los *Capítulos 4 y 6* (19,26-18,82% respectivamente) y superior al señalado en el *Capítulo 5* (*apartado 5.1*) donde se registró un contenido del 13,5%. También los *parámetros de color* a^* y b^* presentan valores ligeramente superiores a los descritos en el *Capítulo 5* e inferiores a la de los *Capítulos 4 y 6*. Por lo tanto, esta variación puede explicarse por el distinto contenido lipídico encontrado en el presente capítulo (17,07%), observándose una clara relación del contenido lipídico con a^* y b^* , de manera que un mayor contenido graso de la carne se relaciona con valores superiores de a^* y b^* (Skrede & Wold, 2008). Finalmente, es preciso destacar el elevado valor de *peróxidos* expresado sobre el contenido graso (10,67 meq cumene/kg lípidos) en comparación al encontrado en el salmón inicial de los otros capítulos.

8.2. Rendimientos, pérdidas por goteo y cocinado.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *rendimiento*, *rendimiento tras descongelar*, las *pérdidas por goteo al descongelar*, las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, las *pérdidas por cocinado* y los valores de *pH* de los filetes de salmón tras el almacenamiento se muestran en la *Tabla 8.2*. En ésta también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además la utilización de

Tabla 8.2 Rendimiento, rendimiento al descongelar, pérdidas por goteo al descongelar y tras almacenamiento en refrigeración, pérdidas por cocinado y pH tras la descongelación (media \pm desviación estándar) de muestras recubiertas con CPS o APS ultrasonificados a distintos tiempos (1, 15 y 60 minutos), tras 4 meses de almacenamiento en congelación a -10 °C.

Muestras	Rendimiento (%)	Rendimiento (%) tras descongelar (%)	Pérdidas por goteo al descongelar (%)	Pérdidas por goteo tras refrigeración (%)	Pérdidas por cocinado (%)	pH
Concentrado proteico de suero						
Sin envuelta	99,63 \pm 0,03a	96,42 \pm 0,09a	3,23 \pm 0,12a	14,25 \pm 1,19a	12,96 \pm 0,56b	6,19 \pm 0,02a
Sin tratar	101,56 \pm 0,48bc	95,64 \pm 1,11a	5,82 \pm 1,37b	15,62 \pm 3,20a	10,82 \pm 0,82a	6,24 \pm 0,03b
Sonicada 1 min	101,22 \pm 0,65bc	96,16 \pm 0,28a	4,99 \pm 0,33b	15,76 \pm 2,85a	11,27 \pm 0,89ab	6,26 \pm 0,02b
Sonicada 15 min	101,83 \pm 0,27c	95,67 \pm 0,57a	6,04 \pm 0,81b	15,20 \pm 0,67a	10,13 \pm 0,74a	6,26 \pm 0,02b
Sonicada 60 min	100,85 \pm 0,35b	95,66 \pm 0,50a	5,15 \pm 0,21b	14,76 \pm 2,02a	10,02 \pm 1,85a	6,25 \pm 0,01b
Aislado proteico de suero						
Sin envuelta	99,63 \pm 0,03a	96,42 \pm 0,09a	3,23 \pm 0,12a	14,25 \pm 1,19ab	12,96 \pm 0,56b	6,19 \pm 0,02c
Sin tratar	101,29 \pm 0,47b	96,58 \pm 0,59a	4,64 \pm 0,38b	15,39 \pm 2,22ab	9,23 \pm 1,11a	6,18 \pm 0,01bc
Sonicada 1 min	101,75 \pm 0,91b	96,33 \pm 1,39a	5,34 \pm 0,52bc	14,59 \pm 2,09ab	10,49 \pm 0,75a	6,16 \pm 0,01b
Sonicada 15 min	101,45 \pm 0,09b	95,77 \pm 0,66a	5,60 \pm 0,67c	15,92 \pm 0,54b	9,74 \pm 0,39a	6,12 \pm 0,01a
Sonicada 60 min	100,96 \pm 0,52b	96,27 \pm 0,09a	4,64 \pm 0,42b	12,96 \pm 0,24a	9,57 \pm 0,94a	6,11 \pm 0,01a
A	ns	ns	ns	ns	ns	***

A: empleo de concentrado proteico de suero vs aislado; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \ge 0,05)
a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

concentrado o aislado proteico de lactosuero. Todos los parámetros, a excepción del pH, vienen expresados en porcentaje (%).

Una vez más, la aplicación de envueltas proteicas, en este caso de CPS y APS sonicadas o no, aumenta significativamente el *rendimiento* de los filetes en comparación con los sin envuelta. Los incrementos en los *rendimientos* medios son del 1,22-2,21% para las muestras CPS y del 1,33-2,13% para las muestras APS. Como ya se ha planteado anteriormente, el aumento del rendimiento de los filetes congelados se debería a la fijación satisfactoria de las envueltas sobre los filetes de pescado, lo que provoca un aumento de peso y por tanto del rendimiento.

El incremento de *rendimiento* en las envueltas CPS sin tratar (sin sonicar) respecto a las sin envuelta fue del 1,93%. Este incremento es inferior al observado en los *Capítulos 4 y 7* para pescados con envueltas con CPS calentados donde se obtuvieron siempre valores superiores al 2,75%. También en los recubrimientos con APS, las envueltas calentadas (*Capítulo 7*) presentan un rendimiento superior (3,22%) que las no calentadas (1,66%). Por tanto, la desnaturalización causada por el calentamiento mejora la adhesión de las envueltas.

Respecto al efecto de la sonicación, los *rendimientos* de las muestras sonicadas no presentan diferencias significativas con las muestras con envueltas sin tratar, es decir sin sonicar. Por lo tanto podría decirse que la sonicación no afecta a la adhesión de las envueltas al pescado.

El tiempo de ultrasonicación tampoco incrementó significativamente los *rendimientos*, observándose incluso un descenso significativo en las

muestras CPS al aumentar de 15 a 60 minutos el tiempo de sonicación. Este descenso del rendimiento podría relacionarse con una reducción de la viscosidad que prolongados tiempos de ultrasonicación produce en las soluciones proteicas (Chandrapala *et al.*, 2011), lo cual reduciría la adhesión del recubrimiento.

Los *rendimientos tras descongelar* no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) ni entre las muestras con o sin envuelta, ni entre la utilización de los distintos tiempos de ultrasonicación tanto en las envueltas con CPS o APS. Por tanto, parece que la mayor parte de las envueltas, tanto sonicadas como sin tratar, se pierden durante la descongelación. Ya en el capítulo anterior (*Capítulo 7, apartado 7.3*) se había observado que las muestras con envueltas ultrasonicadas (50 %/30 minutos) presentaban rendimientos similares tras descongelar que las muestras sin envuelta, mientras que las calentadas presentaban rendimientos significativamente mayores. Por lo tanto, parecía que con las envueltas tratadas térmicamente se evitaba mejor la pérdida de humedad o quedaba la envuelta mejor adherida que con las ultrasonicadas. De nuevo en el presente capítulo se observa que ni el tratamiento con ultrasonicación de las envueltas, ni el tiempo de aplicación del mismo influyen en los rendimientos obtenidos tras la descongelación.

Las *pérdidas por goteo al descongelar* medias oscilaron entre 4,99 y 6,04% para las CPS y 4,64 y 5,60% para las APS, siendo para las muestras sin envuelta del 3,23%. Tanto en el caso de las envueltas CPS como en las APS, los filetes recubiertos con envueltas ultrasonicadas o no tratadas presentaron pérdidas significativamente mayores ($p < 0,05$) a las sin envuelta, debido a la pérdida de gran parte de las envueltas durante la descongelación.

Respecto a las *pérdidas por goteo tras almacenamiento en refrigeración*, no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos para las envueltas con CPS. Sin embargo, en las muestras con APS cabe destacar las menores pérdidas en el caso de las envueltas ultrasonicadas 60 minutos, con diferencias significativas ($p < 0,05$) en relación a las sonicadas 15 minutos. Las pérdidas se situaron en un rango de 14,76-15,76% para las CPS y 12,96-15,92% para las APS.

Las *pérdidas por cocinado* en los filetes sin envuelta (12,96%) son significativamente mayores que en el resto de muestras envueltas, sin que existan diferencias significativas entre los distintos tiempos de ultrasonicación. Estos resultados podrían indicar la persistencia de parte de las envueltas tras la descongelación, las cuales protegerían la superficie del pescado durante el cocinado. Al comparar las *pérdidas por cocinado* entre envueltas CPS y APS no se observaron diferencias significativas.

Tras el almacenamiento en congelación se observa un aumento significativo del pH en comparación con el inicial en fresco (6,12) tanto en las muestras CPS como en las APS, a excepción de las muestras con APS ultrasonicadas 15 y 60 minutos, las cuales mantienen un pH próximo al inicial. Las muestras CPS sonicadas presentan un pH mayor que las que no tienen envuelta mientras que en las muestras APS sonicadas sucede lo contrario.

8.3. Extracto seco, lípidos y cenizas

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes al *extracto seco*, *extracto seco magro*, *contenido en lípidos* y *contenido en cenizas* de los filetes de salmón tras el almacenamiento en congelación y el

extracto seco tras cocinado, se muestran en la *Tabla 8.3*. En ésta también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además la utilización de concentrado o aislado proteico de lactosuero. Los valores del *extracto seco*, *extracto seco magro*, *extracto seco tras cocinado*, *lípidos* y *cenizas* vienen expresados en g/100 g de carne.

El *contenido lipídico* medio de los filetes osciló entre un 17,56 y 21,79%. Los porcentajes son similares a los descritos en el *Capítulo 4* y *7* (*apartados 4.3* y *7.3*). Sólo se observaron diferencias significativas al emplear APS en la formulación de los recubrimientos, aunque puede explicarse como resultado de la variabilidad inter- e intraindividual de los salmones y no como consecuencia del almacenamiento en congelación. También probablemente por esos motivos, las muestras recubiertas con APS fueron diferentes significativamente ($p < 0,01$) que las que tenían CPS.

El contenido medio de *extracto seco* de los filetes con CPS osciló entre 36,99 y 38,86% y el de las muestras con APS entre 39,19 y 40,44%. En el primer caso, no se encontraron diferencias significativas entre la aplicación de envuelta o no, o el empleo de un tiempo u otro de ultrasonicación sobre las envueltas. Sin embargo, en los filetes con APS el contenido en *extracto seco* fue significativamente superior en las muestras sonicadas 15 minutos en relación a las muestras sin envuelta. Además, se observaron contenidos significativamente superiores de *extracto seco* al utilizarse APS ($p < 0,01$), lo cual se atribuyó al diferente contenido lipídico de las muestras. Así pues, estas diferencias desaparecieron al calcularlo en función del contenido magro (*extracto seco magro*).

Tabla 8.3 Extracto seco, extracto seco magro, contenido en lípidos y cenizas y extracto seco tras cocinado (g/100 g pescado; media \pm desviación estándar) de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en congelación con recubrimientos de CPS o APS ultrasonificados a distintos tiempos (1, 15 y 60 minutos)

Muestras	Descongeladas			Cocinadas	
	Extracto seco	Contenido lipídico	Extracto seco magro	Cenizas	Extracto seco tras cocinado
Concentrado proteico de suero					
Sin envuelta	38,47 \pm 0,07a	19,15 \pm 0,31a	19,32 \pm 0,29a	1,10 \pm 0,03a	41,27 \pm 1,91a
Sin tratar	36,99 \pm 1,49a	17,56 \pm 1,70a	19,44 \pm 1,25a	1,07 \pm 0,07a	38,20 \pm 0,69a
Sonicada 1 min	38,42 \pm 1,64a	18,05 \pm 0,36a	20,37 \pm 1,58ab	1,09 \pm 0,04a	39,10 \pm 1,03a
Sonicada 15 min	38,86 \pm 0,85a	16,67 \pm 1,13a	22,19 \pm 1,31b	1,12 \pm 0,04a	38,64 \pm 2,19a
Sonicada 60 min	37,59 \pm 1,07a	18,31 \pm 2,79a	19,28 \pm 2,06a	1,14 \pm 0,04a	39,60 \pm 2,98a
Aislado proteico de suero					
Sin envuelta	38,47 \pm 0,07a	19,15 \pm 0,31ab	19,32 \pm 0,29a	1,10 \pm 0,03a	41,27 \pm 1,91a
Sin tratar	39,89 \pm 0,70ab	21,79 \pm 0,45c	18,09 \pm 0,30a	1,04 \pm 0,06a	40,01 \pm 0,72a
Sonicada 1 min	39,31 \pm 1,67ab	18,07 \pm 1,39a	21,24 \pm 2,14a	1,05 \pm 0,07a	39,98 \pm 0,72a
Sonicada 15 min	40,44 \pm 0,93b	20,78 \pm 0,36bc	19,66 \pm 0,67a	1,04 \pm 0,04a	41,05 \pm 0,89a
Sonicada 60 min	39,19 \pm 0,99ab	18,56 \pm 2,36ab	20,63 \pm 3,24a	1,05 \pm 0,03a	40,52 \pm 0,47a
	**	**	ns	**	*
A					

A: empleo de concentrado proteico de suero vs aislado; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p \geq 0,05)
a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

El contenido medio en *extracto seco magro* de las muestras osciló entre 18,09 y 22,19%. Sólo los filetes recubiertos con CPS ultrasonicado durante 15 minutos presentan valores significativamente superiores a la mayoría de los filetes recubiertos con CPS tratado o sin tratar. Sin embargo, en las muestras envueltas con APS no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados. Aunque, en general, sí se observa que las muestras envueltas presentan unos valores de extracto seco magro superior a las no recubiertas lo que puede indicar que una pequeña parte de envuelta queda en el pescado descongelado. En vista de los resultados, también se puede señalar que las envueltas proteicas sonicadas no parecen proteger contra la pérdida de humedad. Finalmente, no se observan diferencias al comparar el empleo de CPS con el de APS respecto al extracto seco magro ($p \geq 0,05$).

En relación al contenido mineral, los filetes con CPS presentaron contenidos en *cenizas* similares entre sí y con los sin envuelta ($p \geq 0,05$), con valores medios que variaron entre 1,07 y 1,14%, lo que significa que estas envueltas no modifican el contenido mineral de los filetes de salmón durante su almacenamiento en congelación ni tras su descongelación. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las muestras sin envuelta y las recubiertas con APS sonicadas o no. Sin embargo, los filetes recubiertos con APS mostraron contenidos de *cenizas* inferiores a los descritos para las muestras con CPS ($p < 0,01$). Fenómeno posiblemente causado, como se señaló en el capítulo anterior, por el mayor contenido mineral del CPS en comparación con el APS observado en nuestro estudio (ver *Capítulo 3: material y métodos*) y en otros trabajos (Banerjee & Chen, 1995; Morr & Ha, 1993).

En relación a los contenidos en *extracto seco* de las muestras *tras el cocinado*, ni los filetes con CPS, ni con APS presentaron diferencias significativas. Sin embargo, los valores fueron inferiores, aunque no significativamente, en las muestras que fueron envueltas, lo cual podría indicar una cierta protección de los recubrimientos frente a pérdidas de humedad durante el cocinado, tal y como se señaló en el capítulo anterior. Pero esta protección es independiente del sonicado o del tiempo de sonicación, ya que los resultados son similares en las muestras con recubrimiento sin tratar. Finalmente, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el empleo de CPS o APS en las envueltas, siendo mayor el extracto seco tras cocinado en las muestras donde se empleó APS.

8.4. Parámetros de color.

Los valores medios (\pm desviación estándar) correspondientes las coordenadas de color CIELab y blancura (whiteness) de los filetes de salmón tras 4 meses de almacenamiento en *congelación*, una vez *descongelados* y tras su *cocinado* se muestran en la *Tabla 8.4*. En ésta también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros, al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además la utilización de concentrado o aislado proteico de lactosuero.

Los filetes *congelados* tras el almacenamiento con o sin envuelta presentan un descenso de las coordenadas a^* y b^* y un aumento de la luminosidad (L^*) en comparación con el fresco (*Tabla 8.1*), fenómeno ya descrito y explicado en capítulos anteriores. La aplicación de las envueltas

Tabla 8.4. Parámetros de color de los filetes con recubrimientos de CPS o APS ultrasonificados a distintos tiempos (1, 15 y 60 minutos), tras 4 meses de almacenamiento a -10 °C. Valores de las muestras congeladas, descongeladas y cocinadas (media ± desviación estándar).

Muestras	L*	a*	b*	Blancura
Congeladas				
<i>Concentrado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	50,82 ± 4,00a	14,56 ± 0,50c	13,77 ± 1,15c	46,85 ± 3,32a
Sin tratar	49,70 ± 0,94a	11,29 ± 0,74ab	9,45 ± 0,72a	47,59 ± 1,15a
Sonicadas 1 min	49,62 ± 0,79a	11,77 ± 0,55b	9,59 ± 0,57ab	47,38 ± 0,95a
Sonicadas 15 min	52,01 ± 2,56a	11,49 ± 0,51ab	10,82 ± 0,76b	49,47 ± 2,26a
Sonicadas 60 min	51,55 ± 1,05a	10,70 ± 0,37a	8,62 ± 0,12a	49,64 ± 0,94a
<i>Aislado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	50,82 ± 4,00a	14,56 ± 0,50b	13,77 ± 1,15b	46,85 ± 3,32a
Sin tratar	51,21 ± 2,61a	10,23 ± 0,72a	8,24 ± 0,66a	49,47 ± 2,72ab
Sonicadas 1 min	50,14 ± 0,62a	10,19 ± 0,57a	7,95 ± 0,25a	48,49 ± 0,63ab
Sonicadas 15 min	52,74 ± 0,38a	8,83 ± 1,13a	7,27 ± 0,92a	51,36 ± 0,10b
Sonicadas 60 min	51,87 ± 0,57a	10,07 ± 1,65a	8,40 ± 1,99a	50,08 ± 0,69ab
A	ns	***	***	ns
Descongeladas				
<i>Concentrado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	45,93 ± 0,80a	17,46 ± 0,68b	19,51 ± 1,12b	39,92 ± 1,09a
Sin tratar	49,85 ± 0,28b	16,28 ± 0,42a	15,06 ± 1,10a	45,16 ± 0,68b
Sonicadas 1 min	48,59 ± 0,96b	16,54 ± 0,43ab	15,03 ± 0,23a	43,94 ± 0,97b
Sonicadas 15 min	48,77 ± 0,82b	16,10 ± 0,77a	16,30 ± 0,96a	43,88 ± 1,07b
Sonicadas 60 min	48,58 ± 0,43b	16,80 ± 0,37ab	15,44 ± 0,20a	43,75 ± 0,56b
<i>Aislado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	45,93 ± 0,80a	17,46 ± 0,68c	19,51 ± 1,12b	39,92 ± 1,09a
Sin tratar	46,83 ± 0,79ab	15,82 ± 0,19b	14,68 ± 0,34a	42,62 ± 0,85b
Sonicadas 1 min	47,46 ± 0,82bc	14,76 ± 0,52a	14,29 ± 0,86a	43,59 ± 1,12b
Sonicadas 15 min	48,13 ± 0,55c	15,12 ± 0,47ab	14,70 ± 0,37a	44,01 ± 0,68b
Sonicadas 60 min	47,34 ± 0,25bc	15,62 ± 0,73ab	15,04 ± 0,63a	43,04 ± 0,45b
A	***	***	*	*
Cocinadas				
<i>Concentrado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	70,07 ± 0,50a	17,04 ± 1,84c	18,71 ± 0,70b	60,78 ± 1,13a
Sin tratar	71,44 ± 0,41b	16,39 ± 1,35bc	16,73 ± 0,74a	63,06 ± 1,16b
Sonicadas 1 min	72,15 ± 0,38b	15,55 ± 0,52ac	16,60 ± 0,67a	64,04 ± 0,80bc
Sonicadas 15 min	73,56 ± 0,23c	13,88 ± 0,91a	15,24 ± 0,78a	66,47 ± 0,78d
Sonicadas 60 min	73,49 ± 1,33c	14,63 ± 0,97ab	15,61 ± 1,20a	65,93 ± 1,95cd
<i>Aislado proteico de suero</i>				
Sin envuelta	70,07 ± 0,50a	17,04 ± 1,84b	18,71 ± 0,70c	60,78 ± 1,13a
Sin tratar	70,48 ± 2,81a	13,26 ± 1,49a	16,27 ± 1,05b	63,72 ± 2,30b
Sonicadas 1 min	73,64 ± 1,22b	12,71 ± 0,81a	14,40 ± 0,81a	67,37 ± 1,05c
Sonicadas 15 min	73,46 ± 1,14b	12,38 ± 0,30a	14,90 ± 0,65ab	67,14 ± 1,02c
Sonicadas 60 min	72,75 ± 0,86ab	13,56 ± 0,91a	13,88 ± 0,98a	66,53 ± 0,94c
A	ns	***	*	ns

A: empleo de concentrado proteico de suero vs aislado; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)

a,b,c,d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

provoca un descenso en las coordenadas a^* y b^* en comparación con los filetes *congelados* sin envuelta, tanto en las muestras con CPS como en las APS ($p < 0,05$). La aplicación de envueltas ultrasonicadas o no, provoca una variación del color de los filetes, causada probablemente por la propia coloración blanquecina de las envueltas independientemente del tiempo de ultrasonicación aplicado. Así pues, ni la aplicación de ultrasonidos ni, por ello, el tiempo de sonicación influye de una manera clara en el color de los filetes congelados.

Los filetes de salmón *descongelados* tras el periodo de almacenamiento en congelación, tanto con CPS como con APS, presentan mayores valores de luminosidad (L^*) y blancura, y menores valores de las coordenadas a^* y b^* en comparación con los valores del pescado *fresco* (Tabla 8.1). Como ya se ha comentado a lo largo del presente estudio, esto podría deberse a la degradación de pigmentos carotenoides debido a su oxidación durante la congelación y descongelación, a la pérdida de pigmentos en el exudado de descongelación o a la desnaturalización proteica producida durante el almacenamiento, la cual afectaría a su textura y a las propiedades ópticas de los filetes (Andersen & Steinsholt, 1992; Refsgaard *et al.*, 1998b; Sheehan *et al.*, 1998; Einen *et al.*, 2002).

De nuevo, la aplicación de envueltas proteicas causa un aumento de L^* y blancura y un descenso de a^* y b^* de los filetes *descongelados* como se observó en el capítulo anterior (Capítulo 7) en muestras con envueltas CPS o APS sonicadas. En general, el tratamiento de ultrasonidos para la elaboración de los recubrimientos no influye en el color de los filetes descongelados en relación a las muestras con envueltas sin tratar, es decir sin ultrasonicar.

Los filetes *cocinados*, con envueltas de CPS y APS, presentaron valores de luminosidad y blancura significativamente mayores que los descongelados. Las muestras cocinadas procedentes de filetes envueltos mostraron un mayor valor de L^* y blancura y menor de a^* y b^* que las muestras cocinadas sin envuelta. El empleo de la sonicación, a diferencia de lo que se observó en pescados congelados y descongelados, sí influyó de una manera significativa en las coordenadas de color. Así, en la coordenada L^* , las muestras de pescados con envueltas sonicadas presentaron un mayor valor que las de envueltas sin tratar (con diferencias significativas con las tratadas 15 y 60 minutos en el caso de CPS y con las tratadas 1 y 15 minutos en APS). Las muestras sonicadas de CPS presentaron un menor valor de a^* que las sin envuelta con diferencias significativas con la de 15 minutos de tratamiento. En la coordenada b^* fueron las muestras APS (las tratadas 1 y 60 minutos) las que mostraron diferencias significativas con los filetes sin tratar, presentando las muestras sonicadas menores valores. Finalmente en la blancura, las muestras CPS y APS sonicadas tuvieron mayores valores que las recubiertas sin tratar (con diferencias significativas con las tratadas 15 y 60 minutos en el caso de CPS y con todas las tratadas en APS). Todos estos cambios de color podrían relacionarse con cambios estructurales producidos por los ultrasonidos en las proteínas del lactosuero.

El tipo de producto proteico empleado (CPS o APS) en la elaboración de la envuelta afecta al color de los filetes. Los filetes *congelados* correspondientes a las muestras con CPS presentaron valores significativamente superiores de a^* y b^* ($p < 0,001$) que las APS, lo cual también se describió en el *Capítulo 7 (apartado 7.4)*. Tras la *descongelación* de los filetes, las muestras con APS presentaron valores significativamente

inferiores en todos los parámetros estudiados, especialmente en L^* y a^* ($p < 0,001$) en relación con los de CPS. Este resultado contrasta con lo observado en el capítulo anterior. Finalmente, tras el *cocinado* los filetes con CPS presentan valores significativamente mayores de a^* ($p < 0,001$) y b^* ($p < 0,05$) que los de APS. Estas diferencias entre CPS y APS también se observaron en los pescados cocinados del capítulo anterior. Por lo tanto, al utilizar CPS en la elaboración de las envueltas se obtendrían menores modificaciones en la coloración de los filetes del salmón.

8.5. Índices de oxidación.

Los contenidos medios (\pm desviación estándar) correspondientes a los indicadores de oxidación obtenidos por el valor de *peróxidos* y el valor de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (*SRATB*) se muestran en la *Tabla 8.5*. En ésta también se indican los niveles de significación para los distintos parámetros al comparar estadísticamente los datos obtenidos, contrastando además la utilización de concentrado o aislado proteico de lactosuero. Los *peróxidos* vienen expresados en miliequivalentes de cumene por kg de carne o de lípidos y los compuestos secundarios (*SRATB*) en mg de malondialdehído por kg de carne o de lípidos.

Los valores medios de *peróxidos* en las muestras con CPS (*Tabla 8.5*) fluctuaron entre 1,24 y 1,61 meq de cumene por kg de carne y entre 6,72 y 9,10 meq de cumene por kg de lípidos, encontrándose en ambos casos diferencias significativas entre las muestras sin envuelta (3,15 meq) y las recubiertas. Sin embargo, no se observaron diferencias ($p \geq 0,05$) entre los distintos tiempos de ultrasonificación aplicados a las envueltas.

Tabla 8.5. Indicadores de la oxidación lipídica (media ± desviación estándar) de los filetes de pescado recubiertos con CPS o APS sometidos diversos tratamientos, tras 4 meses de almacenamiento en congelación a -10 °C.

Muestras	Valor de peróxidos			Valor de SRATB	
	(2)	(3)	(4)	(4)	(5)
<i>Concentrado proteico de suero</i>					
Sin envuelta	3,15 ± 0,34b	16,46 ± 2,04b	1,99 ± 0,13c	10,39 ± 0,84c	
Sin tratar	1,61 ± 0,28a	9,10 ± 0,75a	1,62 ± 0,08b	9,29 ± 0,67bc	
Sonicada 1 min	1,28 ± 0,08a	7,08 ± 0,51a	1,57 ± 0,07b	8,72 ± 0,51ab	
Sonicada 15 min	1,24 ± 0,27a	7,40 ± 1,08a	1,31 ± 0,05a	7,91 ± 0,79a	
Sonicada 60 min	1,26 ± 0,45a	6,72 ± 1,59a	1,25 ± 0,25a	6,80 ± 0,87a	
<i>Aislado proteico de suero</i>					
Sin envuelta	3,15 ± 0,34b	16,46 ± 2,04b	1,99 ± 0,13c	10,39 ± 0,84c	
Sin tratar	2,82 ± 0,36ab	17,77 ± 0,78b	1,90 ± 0,08c	8,72 ± 0,24b	
Sonicada 1 min	2,75 ± 0,38a	13,57 ± 1,42a	1,38 ± 0,02ab	7,66 ± 0,50ab	
Sonicada 15 min	2,79 ± 0,57ab	12,95 ± 2,05a	1,49 ± 0,04b	7,16 ± 0,33a	
Sonicada 60 min	2,64 ± 0,40a	13,51 ± 1,12a	1,31 ± 0,02a	7,14 ± 0,91a	
	***	***	ns	ns	ns

A: empleo de concentrado proteico de suero vs aislado; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns: no significativo (p≥0,05)

a, b, c, d: medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes (p<0,05)

SRATB: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

(2): meq de cumene/kg carne; (3): meq de cumene/kg lípidos

(4): mg de malondialdehído/kg carne; (5): mg de malondialdehído/kg lípidos

Por otro lado, los valores de *peróxidos* los filetes con APS (*Tabla 8.5*) oscilaron entre 2,64 y 2,82 meq de cumene por kg de carne, siendo las muestras con las envueltas ultrasonicadas 1 y 60 minutos las que presentaron los menores valores ($p < 0,05$). Sin embargo, al expresar los resultados en meq de cumene por kg de lípidos (entre 12,95 y 17,77), se encontraron valores significativamente menores en los filetes con envueltas ultrasonicadas en comparación con los filetes sin envuelta y los recubiertos sin ultrasonicar. Así pues, tanto en las muestras con CPS como con APS, los filetes con los valores más próximos a los filetes sin envuelta fueron los recubiertos sin tratar. A la vista de estos resultados, la utilización de envueltas de CPS o APS ultrasonicadas a distintos tiempos reduce la formación de peróxidos en el salmón almacenado en congelación. Esto coincide con los resultados del *Capítulo 7 (apartado 7.5)*, en los que la aplicación de envueltas ultrasonicadas 30 minutos también disminuyó la formación de peróxidos durante el almacenamiento en congelación en condiciones iguales a las aquí descritas (4 meses/ $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

En relación a los *productos de oxidación secundarios*, los resultados indican que los filetes recubiertos con CPS o APS para cualquiera de los tiempos de ultrasonicación testados presentan una menor oxidación que las muestras sin recubrimiento, observándose los menores valores en las muestras recubiertas con envueltas ultrasonicadas 15 y 60 minutos.

Los valores medios de *SRATB* en las muestras con CPS (*Tabla 8.5*) oscilaron entre 1,25 y 1,62 mg de malondialdehído por kg de carne, siendo el valor significativamente mayor en los filetes sin envuelta (1,99 mg) en comparación con los filetes envueltos. Además, las muestras con envueltas

ultrasonificadas durante 15 y 60 minutos dieron lugar a valores de *SRATB* significativamente inferiores al resto. La misma tendencia se observó al expresar los datos de oxidación en relación con el contenido graso, obteniéndose valores de entre 6,80 y 9,29 mg de malondialdehído por kg de lípidos en las muestras recubiertas. De nuevo, los contenidos de *SRATB* son superiores ($p < 0,05$) en las muestras sin envuelta (10,39 mg) en comparación con los recubiertos con CPS ultrasonificados o no. En relación a los distintos tiempos de ultrasonificación empleados, las muestras ultrasonificadas durante 15 y 60 minutos obtuvieron los menores valores de *SRATB*.

En las muestras con APS, los contenidos de *SRATB* (Tabla 8.5) se encontraron en un rango entre 1,31 y 1,90 mg de malondialdehído por kg de carne. Las muestras sin envuelta presentaron los valores mayores (1,99 mg) en comparación con los filetes con envueltas tratadas por sonicación ($p < 0,05$), independientemente del tiempo de tratamiento utilizado. Como en el caso anterior, la tendencia se repite al expresar los resultados en función del contenido graso, obteniendo valores entre 7,14 y 8,72 mg de malondialdehído por kg de lípidos. De nuevo, los contenidos son mayores en las muestras sin envuelta (10,39 mg), con diferencias significativas en relación al resto. Al igual que con las de CPS, en las envueltas con APS, los tratamientos de ultrasonificación de 15 y 60 minutos obtuvieron los menores valores de *SRATB* expresados sobre materia grasa en comparación al resto.

A la vista de los resultados anteriormente descritos, la utilización de proteínas séricas sin tratar como recubrimiento disminuye la oxidación lipídica, lo cual puede deberse a las propiedades antioxidantes de estas proteínas (Tong *et al.*, 2000). En los resultados se puede ver que las muestras

sin tratar presentaron un valor significativamente menor que las sin envuelta en los peróxidos (en CPS) y en las SRATB (en CPS y APS). Además, el tratamiento de ultrasonicación aplicado afectó de manera positiva a las propiedades de las envueltas, dando lugar a una reducción significativa de los niveles de oxidación en el salmón tras su almacenamiento en congelación. Comparando con las muestras sin tratar, el tratamiento de ultrasonicación aplicado a las envueltas con CPS redujo significativamente los valores de SRATB, mientras que en el caso de las envueltas con APS, la aplicación de cualquier tratamiento de ultrasonicación provocó una disminución de la oxidación de las muestras tanto en el valor de peróxidos como en SRATB.

Según diversos estudios, la sonicación produce una reducción del contenido de tioles libres de las proteínas, probablemente debido a que favorecen los entrecruzamientos entre las mismas y la formación de agregados (Taylor & Richardson, 1980; Gülseren *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha constatado que los ultrasonidos de alta intensidad incrementan la solubilidad de las proteínas de lactosuero cambiando la estructura y conformación de las proteínas, lo que permite la exposición de las partes hidrófilas de los aminoácidos, encerrados en las proteínas nativas (Jambrak *et al.*, 2008; Kresic *et al.*, 2008). También se ha observado un incremento en la hidrofiliidad de películas independientes elaboradas a partir de soluciones proteicas tratadas por ultrasonidos, sugiriendo de nuevo una elevada exposición y por tanto disponibilidad de grupos hidrofílicos (Marcuzzo *et al.*, 2010). Como ya se comentó en la introducción, se ha demostrado la capacidad antioxidante de ciertos aminoácidos hidrofílicos, como la cisteína y la tirosina, presentes en las proteínas del lactosuero (Elias *et al.*, 2005). Así pues, el descenso de la oxidación lipídica observado en filetes de salmón recubiertos con soluciones

de CPS tratadas por ultrasonidos podría atribuirse a cambios producidos en la estructura proteica, los cuales expondrían una mayor cantidad de aminoácidos antioxidantes que protegerían al pescado contra el deterioro oxidativo. Este efecto antioxidante de los ultrasonidos se ha observado en nuestro estudio tanto en recubrimientos de CPS como de APS.

También se ha señalado que la sonicación puede favorecer la oxidación. Se sabe que la sonolisis del agua forma radicales libres y peróxidos, los cuales juegan un papel importante en los cambios estructurales de proteínas en soluciones sonicadas (Marchioni *et al.*, 2009). Sin embargo, Ashokkumar *et al.* (2008) encontraron que la generación de radicales libres depende muy intensamente de la frecuencia de ultrasonidos aplicada, siendo la cantidad de estos radicales generada a baja frecuencia (20 kHz) mínima en comparación a los tratamientos de alta frecuencia (358 y 1062 kHz), como los que emplearon Marchioni *et al.* (2009).

En relación al efecto del tiempo de ultrasonicación, el descenso de los niveles de oxidación (tanto en los valores de peróxidos como en SRATB) fue significativamente mayor cuando la solución proteica se trató con ultrasonidos durante 15 y 60 minutos, aunque el tratamiento de menor duración (1 minuto) también causó una disminución en esos valores. Según Marchioni *et al.* (2009) el comportamiento de las proteínas frente a la ultrasonicación parece depender del tipo de estructura secundaria dominante en ellas. Sin embargo, los estudios sobre la influencia del tiempo de sonicación en los cambios estructurales y funcionales de las proteínas son contradictorios. Por un lado, Marcuzzo *et al.* (2010) no encontraron diferencias en las propiedades moleculares del gluten en relación con la duración del tratamiento de ultrasonicación. Sin embargo,

en concentrados de proteínas de lactosuero reconstituidos, Chandrapala *et al.* (2011) describieron cierta influencia del tiempo de sonicación en la entalpía, viscosidad e hidrofobicidad de superficie, principalmente cuando estas proteínas se comparan antes y después de 5 minutos de tratamiento con ultrasonidos.

Finalmente, al comparar la utilización de CPS y APS en la elaboración de recubrimientos, observamos que los filetes recubiertos con APS presentaron valores significativamente superiores de peróxidos en comparación con los de CPS ($p < 0,001$), tanto al expresar los resultados sobre carne como sobre lípidos. Sin embargo, en los contenidos de SRATB, no se observaron diferencias significativas entre la utilización de CPS y APS. En el *Capítulo 7*, sí se observaron diferencias en los valores de SRATB expresados los resultados sobre carne. Las diferencias entre CPS y APS, como se señaló en ese capítulo, probablemente se deban a las distintas composiciones de ambos productos, principalmente el distinto contenido de lactosa.

Capítulo 9 Análisis sensorial

9.1. Análisis sensorial de muestras de salmón recubiertas con CPS+glicerol sometido a tratamiento térmico.

Las muestras de salmón atlántico recubiertas con envueltas elaboradas con CPS (en concreto con CPS+glicerol 1:1) se sometieron a diversas pruebas sensoriales con el fin de examinar sensorialmente el producto recubierto y determinar la posible existencia de diferencias significativas entre las muestras recubiertas y muestras glaseadas o sin envuelta. Los resultados obtenidos mediante cada prueba del análisis sensorial fueron los que se describen a continuación.

9.1.1. Prueba triangular

Las puntuaciones medias (\pm desviación estándar) obtenidas en el transcurso de la prueba triangular por parte del panel de cata se muestran en la Tabla 9.1.

En vista de los resultados del análisis organoléptico realizado para los atributos evaluados en las muestras (color, olor, consistencia, sabor y textura), puede afirmarse con un intervalo de confianza del 99% y del 95% que no existen diferencias significativas entre las muestras comparadas, en este caso entre muestras descongeladas recubiertas con CPS+glicerol 1:1 y las que no tienen envuelta.

Tabla 9.1. Respuestas obtenidas para los distintos parámetros sensoriales analizados (aspecto general, color, olor, textura, sabor y grado de liberación de agua) tras la prueba triangular realizada para muestras de salmón recubiertas con CPS+glicerol 1:1 descongeladas y muestras sin envuelta.

Atributo evaluado	Evaluación respuestas		Valoración	
	Nº correctas	Nº incorrectas	Nivel significación	Diferencias significativas
Color	2	5	0,01 0.05	NO
Consistencia	1	6	0,01 0.05	NO
Olor	0	7	0,01 0.05	NO
Sabor	2	5	0,01 0.05	NO
Textura	2	5	0,01 0.05	NO

9.1.2. Prueba de comparación por parejas:

Las puntuaciones medias (\pm desviación estándar) obtenidas en el transcurso de la prueba de comparación por parejas por parte del panel de cata se muestran en la Tabla 9.2.

Para el análisis estadístico de los resultados se tuvo en cuenta la aplicación del modelo bilateral, estableciendo si existen diferencias significativas detectadas por los jueces entre las muestras evaluadas.

En vista de los resultados del análisis organoléptico realizado para los atributos evaluados en las muestras (aspecto general, color, olor, sabor y textura) puede afirmarse con un intervalo de confianza del 99% y del 95% que no existen diferencias significativas entre las muestras comparadas, en este caso entre muestras descongeladas recubiertas con CPS+glicerol 1:1 y muestras glaseadas.

Tabla 9.2. Respuestas obtenidas para las cuestiones planteadas respecto a los distintos parámetros sensoriales estudiados (aspecto general, color, olor, sabor y textura) tras la prueba de comparación por parejas realizada para muestras de salmón recubiertas con CPS+glicerol 1:1 descongeladas y muestras glaseadas.

Atributo evaluado	Pregunta formulada	Nº respuestas por opción			Valoración	
		muestra "M1"	muestra "M2"	No existen diferencias	Nivel significación	Diferencias significativas
Aspecto general	¿Cuál de estas dos muestras presenta un aspecto más agradable/característico?	1	1	5	0,01	NO
Color	¿Cuál de estas dos muestras presenta un color más agradable/característico?	0	1	6	0,01	NO
	¿Cuál de estas dos muestras presenta un olor más agradable/característico?	2	1	4	0,01	NO
Sabor	¿Cuál de estas dos muestras presenta un sabor más agradable/característico?	4	1	2	0,01	NO
	¿Cuál de estas dos muestras presenta un textura más agradable/característico?	1	1	5	0,01	NO

La muestra M1 se corresponde con la muestra de salmón glaseada

La muestra M2 se corresponde con la muestra de salmón CPS+glicerol 1:1

Así pues ninguna de las pruebas sensoriales discriminantes realizadas (comparación por parejas y prueba triangular) mostraron la existencia de diferencias significativas entre las muestras recubiertas con CPS+glicerol 1:1 y las no envuelta o glaseadas.

9.1.3. Prueba de aceptación mediante la utilización de una escala específica empleando una muestra de referencia

Las puntuaciones medias (\pm desviación estándar) obtenidas durante el transcurso de la prueba sensorial con escala específica por parte del panel de cata se muestran en la Tabla 9.3.

Tabla 9.3. Puntuaciones obtenidas (media \pm desviación estándar) para los distintos parámetros sensoriales estudiados (aspecto general, color, olor, consistencia, sabor y textura) tras la prueba de aceptación con escala específica realizada para muestras de salmón recubiertas con CPS+glicerol 1:1 descongeladas y cocinadas (cocidas y fritas).

Atributo evaluado	Congelado	Descongelado	Cocinado	
			Cocido	Frito
Aspecto general	2,4 \pm 0,5	2,3 \pm 0,5	2,6 \pm 0,5	2,9 \pm 0,3
Color	2,7 \pm 0,5	2,4 \pm 0,4	2,6 \pm 0,5	3,0 \pm 0,0
Olor	2,7 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	2,6 \pm 0,5	2,6 \pm 0,5
Consistencia		2,6 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	2,5 \pm 0,5
Sabor			2,3 \pm 0,6	2,2 \pm 0,7
Textura			2,5 \pm 0,6	2,4 \pm 0,7

De los resultados obtenidos en el examen sensorial del *producto congelado* cabe destacar los siguientes aspectos:

- Tras la evaluación de la muestra el panel de catadores ha definido el aspecto general como “*agradable y específico del producto*”, no detectando además desviaciones con respecto a la muestra de referencia.

- El color de la muestra ha sido definido como “*muy agradable y específico del producto*”, no detectando desviaciones significativas con respecto a la muestra de referencia.
- Finalmente, el olor ha sido definido “*muy agradable y específico del producto*”, no detectando desviaciones significativas con respecto a la muestra de referencia.

De los resultados obtenidos en el examen sensorial del *producto descongelado*, cabe destacar los siguientes aspectos:

- Tras la evaluación de la muestra el panel de catadores ha definido el aspecto general como “*ligeramente agradable y específico del producto*” destacando, parte del panel, la presencia en algunas piezas de restos de cubierta en la superficie.
- El color de la muestra ha sido definido como “*ligeramente agradable y específico del producto*”, detectándose piezas con un tono más blanquecino y opaco que la muestra de referencia.
- Finalmente, el olor ha sido definido como “*muy agradable y específico del producto*”, no detectando desviaciones significativas con respecto a la muestra de referencia.
- La consistencia ha sido definida como “*firme y elástica*”, no detectando diferencias significativas con respecto a la muestra de referencia.

De los resultados obtenidos en el examen sensorial del producto descongelado y sometido a un proceso de cocción (*producto cocido*), destacan los siguientes aspectos:

- Aunque, tras la evaluación de la muestra, el panel de catadores ha definido el aspecto general como “*agradable y específico del producto*” cabe destacar que parte del mismo señala la presencia en algunas piezas de restos de cubierta en la superficie.
- Aunque el color de la muestra, tras su evaluación sensorial, ha sido definido como “*agradable y específico del producto*”, parte del panel de catadores ha detectado piezas con un tono más blanquecino y opaco que la muestra de referencia.
- El olor, tras la evaluación directa de la muestra, ha sido definido como “*muy agradable y específico del producto*”, no detectando desviaciones significativas con respecto a la muestra de referencia.
- La consistencia ha sido definida como “*firme y elástica*”, no encontrando diferencias significativas con respecto a la muestra de referencia.
- El sabor, tras la evaluación directa de la muestra, ha sido definido “*ligeramente agradable y específico del producto*”. El 50% del panel ha destacado la presencia de sabores impropios del producto (no definidos) y un regusto ligeramente astringente en la muestra evaluada con respecto a la muestra de referencia.
- Tras la evaluación directa de la textura, el panel de catadores la ha definido como “*ligeramente agradable y específica del producto*”, señalándola como ligeramente más seca que la muestra de referencia.

De los resultados obtenidos en el examen sensorial del producto sometido a un proceso de fritura (*producto frito*), destacan los siguientes aspectos:

- Aunque, tras la evaluación de la muestra, el panel de catadores ha definido el aspecto general como “*agradable y específico del producto*” no detectando diferencias significativas con respecto a la muestra de referencia.
- El color de la muestra, tras su evaluación sensorial, ha sido definido como “*agradable y específico del producto*”, no detectando diferencias significativas con respecto a la muestra de referencia.
- El olor, tras la evaluación directa de la muestra, ha sido definido como “*muy agradable y específico del producto*”, no detectando desviaciones significativas con respecto a la muestra de referencia.
- La consistencia ha sido definida como “*ligeramente firme y elástica*”.
- El sabor, tras la evaluación directa de la muestra, ha sido definido “*ligeramente agradable y específico del producto*”. El 62,5% del panel ha destacado la presencia de sabores impropios del producto (no definidos) y un regusto ligeramente astringente en la muestra evaluada con respecto a la muestra de referencia.
- Tras la evaluación directa de la textura, el panel de catadores la ha definido como “*ligeramente agradable y específica del producto*”, definiendo la muestra ligeramente más seca que la muestra de referencia.

A la vista de estos resultados podría concluirse que el *salmón congelado* no presenta desviaciones apreciables en el aspecto, color y olor, en base a la evaluación sensorial directa de las muestras con recubrimientos de CPS+glicerol 1:1, con respecto a las muestras de referencia (sin envuelta). En relación al *salmón descongelado*, tanto la consistencia como el olor de las muestras recubiertas, no presentan diferencias apreciables respecto a las

muestras de referencia. Sin embargo, en referencia al aspecto y el color de las muestras con envuelta, la evaluación sensorial indicó la presencia de restos del recubrimiento en su superficie, aunque su presencia no tuvo un efecto negativo a la hora de la valoración de estos parámetros. Esta misma tendencia se observó en el *salmón cocido*, donde el aspecto general, el color, el olor, la consistencia, el sabor y la textura no presentan desviaciones apreciables respecto a la muestra de referencia, aunque de nuevo se indica la presencia de restos de las envueltas en la superficie de las muestras. Finalmente el *salmón frito* tampoco presentó desviaciones apreciables respecto a la muestra de referencia en todos los parámetros testados (aspecto general, color, olor, consistencia, sabor y textura). Sin embargo, es preciso mencionar que tanto en el *salmón cocido* como en el *frito*, una parte de los catadores detectaron la presencia de sabores impropios del producto (no definidos) y un regusto ligeramente astringente en la muestra evaluada, señalándola también como ligeramente más seca, con respecto a la muestra de referencia.

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de restos de las envueltas en la superficie de las muestras descongeladas ya fue señalada en el Capítulo 4. Así mismo, la presencia de sabores impropios del producto y el regusto ligeramente astringente señalado por parte del panel sensorial en las muestras cocinadas (cocidas o fritas) podría explicarse por la presencia de estos restos de envuelta proteica, los cuales al ser sometidos a un proceso de cocinado vinculado a la aplicación de elevadas temperaturas podrían desarrollar ciertos olores y sabores por acción del calor sobre las proteínas.

9.1.4. Prueba de Aceptación

Las puntuaciones medias (\pm desviación estándar) obtenidas durante el transcurso de la prueba de aceptación por parte del panel de cata se muestran en la Tabla 9.4.

Tabla 9.4. Puntuaciones obtenidas (media \pm desviación estándar) para los distintos parámetros sensoriales estudiados (aspecto general, color, olor, textura, sabor y grado de liberación de agua) tras la prueba de aceptación realizada para muestras de salmón recubiertas con CPS+glicerol 1:1 descongeladas y cocinadas (cocidas y a la plancha).

Atributo evaluado	Descongelado	Cocinado	
		Cocido	A la plancha
Aspecto general	4,4 \pm 0,4	4,4 \pm 0,4	4,5 \pm 0,4
Color	4,5 \pm 0,4	4,3 \pm 0,7	4,4 \pm 0,4
Olor	3,6 \pm 0,8	4,6 \pm 0,4	4,4 \pm 0,5
Textura	3,6 \pm 0,5	4,3 \pm 0,2	4,4 \pm 0,3
Sabor		4,2 \pm 0,6	4,1 \pm 0,6
Grado de liberación de agua	3,8 \pm 0,2		

De los resultados obtenidos en el examen sensorial del *producto descongelado*, destacan los siguientes aspectos:

- Tras la evaluación visual de la muestra el panel de catadores ha definido el aspecto general como “*agradable*” y el color como “*muy agradable*”. Además, algunos catadores han observado cierta liberación de agua que ha sido definida como “*ligera*”.
- Tras la evaluación directa de la muestra, el panel de catadores ha definido el olor y la textura de la carne como “*agradable*”.
- Así mismo, aunque tras la realización del análisis sensorial de la muestra el panel de catadores ha definido el producto de forma general

como “*agradable*”, es preciso mencionar que algunos catadores han observado la presencia de restos de película en la superficie del producto, los cuales han sido definidos como “*ni agradables ni desagradables*”, así como una ligera pérdida de elasticidad de la carne (grado de recuperación tras someterla a la aplicación de ligera presión).

De los resultados obtenidos en el examen sensorial del *producto cocido*, destacan los siguientes aspectos:

- Tras la evaluación visual de la muestra el panel de catadores ha definido el aspecto general y el color de las piezas como “*agradable*”.
- Tras la evaluación directa de la muestra, el panel de catadores ha definido el olor como “*muy agradable*” y el sabor y la textura como “*agradable*”.
- Aunque tras la realización del análisis sensorial de la muestra el panel de catadores ha definido el sabor como “*agradable*”, destaca que algunos catadores lo han valorado como “*poco intenso*”.
- Finalmente, el panel de catadores ha definido el producto de forma general como “*agradable*”. Sin embargo, es preciso destacar que algunos catadores han observado la presencia de restos de cubierta en la superficie del producto, los cuales han sido definidos como “*ni agradables ni desagradables*”.

De los resultados obtenidos en el examen sensorial *del producto “a la plancha”*, se destacan los siguientes aspectos:

-
- Tras la evaluación visual de la muestra el panel de catadores ha definido el aspecto general como “*muy agradable*” y el color como “*agradable*”.
 - Tras la evaluación directa de la muestra, el panel de catadores ha definido el olor, el sabor y la textura como “*agradable*”.
 - Si bien el panel de catadores ha definido el sabor como “*agradable*”, cabe destacar que algunos catadores lo han valorado como “*ligeramente específico del producto*”.
 - Para concluir, el panel de catadores ha definido el producto de forma general como “*agradable*”, aunque cabe mencionar que algunos catadores han observado la presencia de restos de cubierta en la superficie del producto, los cuales han sido definidos como “*ni agradables ni desagradables*”.

Teniendo en cuenta estos resultados, el *salmón congelado recubierto (CPS+glicerol 1:1)* podría definirse como *agradable* en base a sus características sensoriales, siendo su color la característica más valorada como *muy agradable*, a pesar de que ciertos catadores observaron la presencia de restos del recubrimiento proteico en su superficie; por tanto, su presencia no tuvo un efecto negativo a la hora de la valoración de este parámetro. De manera similar, el *salmón cocinado* podría considerarse *agradable*, siendo su olor la característica más apreciada por los catadores, definida como *muy agradable*. De nuevo, la detección de restos del recubrimiento proteico en su superficie por parte del panel no afectaría su valoración, siendo considerada como *ni agradable ni desagradable*. En el caso del *salmón a la “plancha”* la consideración global sería también de *agradable*, presentando su aspecto general la mejor valoración como *muy agradable*. Como en los casos

anteriores la presencia de restos de envuelta proteica no afectaría negativamente a su valoración.

Para finalizar, cabe destacar que a pesar de las diferencias observadas a nivel analítico entre las muestras sin envuelta, las glaseadas y las recubiertas con CPS+glicerol 1:1 en el Capítulo 4, éstas no parecen ser suficientemente marcadas para ser percibidas en un análisis sensorial. Posiblemente la naturaleza de la propia materia prima, el salmón atlántico, el cual posee unas fuertes características sensoriales, dificulten la percepción de variaciones en las mismas. También el nivel de autooxidación lipídica que mostraron las muestras sin recubrimiento no fue lo suficientemente elevado como para ser detectado sensorialmente. Es posible que con períodos más largos de conservación en congelación o empleando temperaturas de conservación más elevadas se podrían haber apreciado más diferencias. En cualquier caso, se puede decir que el recubrimiento no afectó negativamente a las características sensoriales del producto.

9.2. Análisis sensorial de muestras de salmón recubiertas con CPS o APS+glicerol sometidas a tratamiento de ultrasonicación

Las muestras de salmón atlántico recubiertas con envueltas elaboradas con APS o CPS (+glicerol 2:1 ambas) sometidas a distintos tratamientos de ultrasonicación (15 y 60 minutos, respectivamente), se estudiaron mediante una *prueba de aceptación de consumidores* con el fin de examinar sensorialmente el producto recubierto y determinar la posible relación entre los resultados del análisis sensorial y los obtenidos en la evaluación analítica de parámetros como los rendimientos, el color o los índices de oxidación, de manera que se pudiera establecer si las diferencias observadas analíticamente también se reflejaban a nivel de consumidor. Los resultados obtenidos mediante cada prueba del análisis sensorial, realizado por un panel de consumidores no entrenados, se describen a continuación.

Las puntuaciones medias (\pm desviación estándar) obtenidas durante el transcurso de la prueba de aceptación por parte del panel de consumidores se muestran en la Tabla 9.5 y representadas en la Figura 9.1.

Tabla 9.5. Puntuaciones obtenidas (media \pm desviación estándar) para el global y los distintos parámetros sensoriales estudiados (color, olor, sabor y textura) tras la prueba de aceptación con consumidores realizada para muestras descongeladas de salmón recubiertas con APS+glicerol 2:1 sonicado 15 minutos, con CPS+glicerol 2:1 sonicado 60 minutos, glaseadas y sin envuelta.

Atributos	Sin envuelta	Glaseado	APS 15'	CPS 60'
color	5,26 \pm 1,81	5,26 \pm 1,68	5,35 \pm 1,80	5,48 \pm 1,44
olor	5,22 \pm 1,76	5,48 \pm 1,47	5,39 \pm 1,67	5,43 \pm 1,31
sabor	5,65 \pm 2,01	5,96 \pm 1,46	6,04 \pm 1,94	5,52 \pm 1,95
textura	6,13 \pm 1,58	6,61 \pm 1,27	5,91 \pm 1,53	6,17 \pm 1,47
global	5,57 \pm 1,80	6,13 \pm 1,55	5,91 \pm 1,62	5,78 \pm 1,57

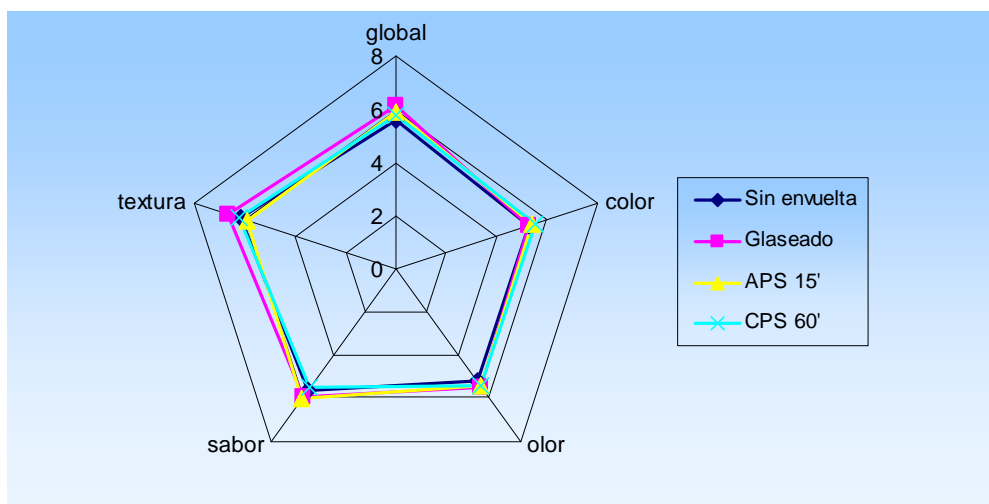


Figura 9.1. Representación de las puntuaciones obtenidas durante la prueba de aceptación con consumidores.

En vista de las puntuaciones obtenidas durante la prueba, las muestras sin envuelta son las que obtuvieron las menores puntuaciones en parámetros como el color o el olor, obteniendo también la menor puntuación global. Por su parte, las muestras glaseadas mostraron las mejores puntuaciones en el olor, textura y global, aunque obtuvo una de las menores puntuaciones en relación al color. Respecto al sabor, las muestras con envueltas de APS ultrasonizadas durante 15 minutos (APS 15') mostraron la mayor puntuación. Por otro lado, las muestras con envueltas de CPS ultrasonizadas durante 60 minutos (CPS 60') obtuvieron la mayor puntuación en relación al color. Sin embargo hay que tener en cuenta que, en vista de las desviaciones y el posterior análisis estadístico, no existen diferencias significativas entre las muestras, tal como se muestra en la Tabla 9.6, en la que se recogen los valores de p obtenidos en el análisis estadístico de los resultados.

Tabla 9.6. Valores de p y significancia obtenidos en el análisis estadístico por parejas realizado mediante el test de Wilcoxon, comparando las muestras sin envuelta y las glaseadas entre sí y con el resto de muestras.

p-value	Glaseado	APS 15'	CPS 60'
<i>Sin envuelta</i>			
global	0,172(ns)	0,339(ns)	0,649(ns)
color	0,876(ns)	0,726(ns)	0,561(ns)
olor	0,413(ns)	0,564(ns)	0,493(ns)
sabor	0,678(ns)	0,386(ns)	0,655(ns)
textura	0,151(ns)	0,653(ns)	0,946(ns)
	Sin envuelta	APS 15'	CPS 60'
<i>Glaseado</i>			
global	0,172(ns)	0,586(ns)	0,237(ns)
color	0,876(ns)	0,651(ns)	0,568(ns)
olor	0,413(ns)	0,805(ns)	0,837(ns)
sabor	0,678(ns)	0,683(ns)	0,359(ns)
textura	0,151(ns)	0,054(ns)	0,176(ns)

ns: no significativo ($p \geq 0,05$)

En vista del análisis estadístico, se podría afirmar que la utilización de cualquiera de las envueltas ultrasonificadas no afectó de manera significativa a las propiedades sensoriales del salmón cocinado (en microondas) tanto glaseado como sin ningún tipo de recubrimiento. De nuevo, como ya se observara anteriormente con el análisis sensorial de muestras con recubrimientos de CPS+glicerol 1:1 sometido a tratamiento térmico, las diferencias analíticas encontradas entre las diversas muestras no se vieron reflejadas en el análisis sensorial. Esto pudo deberse a las fuertes características organolépticas del salmón atlántico, las cuales dificultarían la percepción de variaciones en las mismas, o bien a que las variaciones detectadas en los análisis químicos y físico-químicos no son suficientemente acentuadas para poder ser detectadas sensorialmente. En cualquier caso, y tal como se concluyó en el análisis sensorial de los recubrimientos calentados, las envueltas estudiadas no modificaron negativamente a los parámetros sensoriales del pescado.

Capítulo 10 Conclusions

With regard to the effects of different protein coating formulations and application moments on frozen Atlantic salmon quality parameters

1. The applications of whey protein concentrate, purified ovalbumin and soy protein concentrate as edible coatings increases the yield of the fillets and protects them from lipid oxidation during four months of frozen storage. All the protein coatings provide better protection against oxidation than glazing.
2. The effect of the moment at which the coating is applied (before or after freezing) is different depending on the type of protein. The best results are obtained with the application of whey protein concentrate coatings after freezing and with the application of ovalbumin before freezing. The quality parameters are not affected by the moment of application in soy protein coatings.
3. The protein+glycerol coatings are more suitable for the protection of frozen Atlantic salmon in relation to lipid oxidation than the sorbitol ones. No clear effects of the concentration of plasticizer (sorbitol or glycerol) in most quality parameters are found.
4. Whey protein concentrate+glycerol 1:1 coating is one of the best for frozen Atlantic salmon lipid protection. The sensory properties of salmon fillets are not modified negatively by the use of this coating.

With regard to the effects of whey protein coatings subjected to different treatments on frozen Atlantic salmon quality parameters

1. All treated whey coatings studied (heat, heat+transglutaminase, ultrasound and ultrasound+transglutaminase) increase the yield and decrease the lipid oxidation of salmon fillets comparing with uncoated ones. Both ultrasound and heat+transglutaminase treatments are the most protective ones from an oxidative point of view. Particularly, heat+transglutaminase coatings also obtain higher yields and thaw yields, as well as lower drip losses in thawing, comparing with ultrasound-treated coatings.
2. The ultrasound-treated coatings, significantly delays the lipid oxidation of salmon fillets in comparison with uncoated samples, those coated with untreated proteins and those coated with heat-treated whey concentrate proteins. The duration of the ultrasound treatment affects some protective characteristics of coatings. The use of ultrasound solutions for 15 and 60 minutes decreases the lipid oxidation of fish fillets more than the shortest ultrasound treatment (1 minute).
3. The addition of transglutaminase reduces the lipid oxidation in heat-treated whey protein concentrate coated fish. However, no significant effects on lipid oxidation are observed when the enzyme is added to heat-treated whey protein isolate coatings or ultrasound-treated whey coatings. In general, the yields of the samples protected by ultrasound or heat-treated coatings are not influenced by the addition of transglutaminase.
4. The sensory properties of salmon fillets are not negatively affected by the use of ultrasonicated whey coatings.

Capítulo 11 Bibliografía

Abbas, K.A., Mohamed, A., Jamilah, B., Ebrahimian, M. 2008. A review on correlations between fish freshness and pH during cold storage. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 4(4): 416-421.

Ackman, R., Ratnayake, W. 1990. Chemical and analytical aspects of assuring an effective supply of omega-3 fatty acids to the consumer. En: *Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease*. Eds. Lees R., Karel M. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, USA. p. 215-233.

Asociación Española de Normalización y Racionalización (AENOR) 2010. Análisis sensorial. 2ª edición. AENOR, Madrid, España.

Aidos, I., Lourenco, A., Vander-Padt, A., Luten, J.B., Boom, R.M. 2002. Stability of crude herring oil produced from fresh byproducts: Influence of temperature during storage. *Journal of Food Science*. 67: 3314-3320.

Ajinomoto manual, Activa® WM: Ajinomoto Co's Transglutaminase Activa Modification of Physical properties of Protein. <http://meat-nmore.info/test/englisch/activa/back/back01.htm>. Febrero 2009.

Akitha Devi, M.K., Gondi, M., Giridhar, S.P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A. 2009. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry*. 114: 771-776.

Aksnes, A., Gjerde, B., Roald, S.O. 1986. Biological, chemical, and organoleptical change during maturation of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 53: 7-20.

Alcántara, C.R. Krochta, J.M. 1996. Mechanical properties of whey protein-isolate-coated freeze-dried chicken white meat dice. En: Book of Abstracts, 1996 IFT Annual Meeting, New Orleans, LA. Chicago, IL: Institute of Food Technologists. p. 179.

Alcántara, C.R., Rumsey, T.R., Krochta, J.M. 1998. Drying rate effect on the properties of whey protein films. *Journal of Food Processing Engineering*. 21: 387-405.

Alexandrescu, A.T., Evans, P.A., Pitkeathly, M., Baum, J., Dobson, C.M. 1993. Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of α -Lactalbumin: A Two-Dimensional NMR Study. *Biochemistry*. 32: 1707–1718.

Ali, Y., Ghorpade, V.M., Hanna, M.A. 1997. Properties of thermally-treated wheat gluten films. *Industrial Crops Production*. 6: 177-184.

Allen, J.C., Wrieden, W.L. 1982. Influence of milk-proteins on lipid oxidation in aqueous emulsion. 1. Casein, whey-protein and alpha-lactalbumin. *Journal of Dairy Research*. 49(2): 239-248.

Ambardekar, A. 2007. Effects of edible coatings on the moisture content and lipid oxidation of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during three months of frozen storage. *Asian Fisheries Science*. 20(4): 395-407.

Andersen, H.J., Bertelsen, G., Christophersen, A.G., Ohlen, A., Skibsted, L.H. 1990. Development of rancidity in salmonid steaks during retail display. A comparison of practical storage life of wild salmon and farmed rainbow trout. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*. 191: 119-122.

Andersen, U.B., Steinsholt, K. 1992. Deep frozen salmon: Differences in quality after storage at different temperatures following different storage periods. *Norwegian Journal of Agricultural Science*. 6: 211-215.

Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., Motoki, M. 1989. Purificación and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*. 53(10): 2613-2617.

Anonimous. 1967. Edible packaging offers pluses for frozen meat, poultry. *Quick Frozen Foods*. 29 (9): 165–167, 213–214.

AOAC. 1995. *Oficial Methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, D.C.

Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S., Yamamoto, N., 1997. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. *Food Chemistry*. 60(4): 593-604.

Arvanitoyannis, I.S., Nakayama, A., Aiba, S. 1998. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*. 37: 371-382.

Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilkuh, K., Versteeg, C. 2008. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9: 155-160.

Aubourg, S., Piñeiro, C., Gallardo, J., Barros-Velázquez, J. 2005. Evolution of biochemical changes related to the quality loss in farmed turbot (*Psetta maxima*) during chilled storage. *Food Chemistry*, 90: 445-452.

Avena-Bustillos, R., Krochta, J.M. 1993. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. *Journal of Food Science*. 58: 904-907.

Bak, L.S., Jacobsen L., Jorgensen, S.S. 1999. Characterisation of qualitative changes in frozen, unpeeled cold-water shrimp (*Pandalus borealis*) by static headspace gas chromatography and multivariate data analysis. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 208(1): 10-16.

Baker, R.A., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. 1994. Edible coatings and films for processed foods. En: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Eds. Krochta J.M., Baldwin E. A., Nisperos-Carriedo M.O. Lancaster, Basel: Technomic Publishing. p. 89-104.

Baldwin E.A., Nispero-Carriedo, M.O., Baker, R.A. 1995. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *Horticultural Science*. 30: 35-40.

Baldwin, E.A., Nisperos, M.O., Chen, X., Hagenmaier, R.D. 1996. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*. 9: 151-163.

Banerjee, R., Chen, H. 1995. Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*. 78: 1673-1683.

Banerjee, R., Chen, H., Wu, J. 1996. Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. *Journal of Food Science*. 61: 824-828.

Banker, G.S. 1966. Film coating theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Science*. 55: 81-89.

Behrend, O., Schubert, H. 2001. Influence of hydrostatic pressure and gas content on continuous ultrasound emulsification. *Ultrasound Sonochemistry*. 8: 271-276.

Bell, J.G., McEvoy, J., Webster, J.L., McGhee, F., Millar, R.M., Sargent, J.R. 1998. Flesh lipid and carotenoid composition of Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 46.:119-127.

Ben-Gigirey, B., De Sousa, J.M.V.B., Villa, T.G., Barros-Velázquez, J. 1999. Chemical changes and visual appearance of Albacore tuna as related to frozen storage. *Journal of Food Science*. 64(1): 20-24.

Benedito, J., Bon, J., Sanjuan, N., Frau, M. 1995. Utilización de ultrasonidos en la industria alimentaria. I. Conceptos fundamentales. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. XIV(9): 79-83.

Benedito, J., Bon, J., Sanjuan, N., Frau, M. 1996. Utilización de ultrasonidos en la industria alimentaria. II. Aplicaciones. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. XV(1): 113-120.

Berberat, A., Wissgott, U. 1993 (28 septiembre). Process for preparing a multi-component food product including a protective barrier. *Patente U.S.A.* 5,248,512.

Bilinski, E., Jonas, R.E.E., Lau, Y.C., Gibbard, G. 1977. Treatments before storage affecting thaw drip formation in Pacific salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 34: 1431-1434.

Bjerkeng, B. 2000. Carotenoid pigmentation of salmonid fishes-recent progress. En: *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Eds. Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M.A., Civera-Cerecedo R. Mérida, Yucatán. p. 71-89.

Bjerkeng, B., Johnsen, G. 1995. Frozen storage quality of Rainbow trout as affected by oxygen, illumination, and fillet pigment. *Journal of Food Science*. 60(2): 284-287.

Bjerkeng, B., Storebakken, T., Liaaen-Jensen, S. 1992. Pigmentation of Rainbow trout from start feeding to sexual maturation. *Aquaculture*. 108: 333-346.

Blanc, J.M., Choubert, G. 1993. Genetic variation of flesh color in pan-size rainbow trout fed astaxanthin. *Journal of Applied Aquaculture*. 2: 115-123.

Bolin, H.R. 1976. Texture and crystallization control in raisins. *Journal of Food Science*. 41: 1316-1319.

Bolin, H.R., Huxsoll, C.C. 1991. Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *Journal of Food Science*. 56: 416-418.

Borsarelli, C. D., Mercadante, A. Z. 2010. Thermal and photochemical degradation of carotenoids. En J. T. Landrum (Ed.), *Carotenoids. Physical, chemical and biological functions and properties* (pp. 229-253). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Bourtoom, T. 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*. 15(3): 167-180.

Bourtoom, T. 2009. Edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal*. 16(1):1-9.

Brandenburg, A.H., Weller, C.L., Testin, R.F. 1993. Edible films and coatings from soy proteins. *Journal of Food Science*. 58: 1086-1089.

Brownlow, S., Morais-Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C., Sawyer, L. 1997. Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. *Structure*. 5(4): 481-495.

Cervato, G., Cazzola, R., Cestaro, B. 1999. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal Food Science and Nutrition*. 50: 291-296.

Chambi, H., Grosso, C. 2006. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*. 39: 458-466.

Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. 2010. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18: 951-957.

Charalambous, G. 1993. *Shelf Life Studies of Foods and Beverages*. Elsevier Science Publisher, New York, USA.

Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(3): 574-578.

Chick, J., Ustunol, Z. 1998. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*. 63: 1024-1027.

Chick, J., Ustunol, Z. 1998. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*. 63: 1024-1027.

Cho, S., Rhee, C. 2002. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *Food Science and Technology*. 35: 151-157.

Christiansen, R, Struksnaes, G., Estermann, R., Torrisen, O.J. 1995. Assessment of flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar L*. *Aquaculture Research*. 26: 311-321.

Christophersen, A.G., Bertelsen G., Andersen, H.J., Knuthsen, P., Skibsted, L.H. 1992. Storage life of frozen salmonoids Effect of light and packaging conditions on carotenoid oxidation and lipid oxidation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 194(2): 115-119.

CIE 1976. Official Recommendations of the International Commission on Illumination, 465 Colorimetry. Publication CIE No. 15 (E-1.3.1). Commission International de 466 l'Eclairage, Paris, France.

Cisneros-Zevallos, L., Saltveit, M.E., Krochta, J.M. 1997. Hygroscopic coatings control surface white discoloration of peeled (minimally processed) carrots during storage. *Journal of Food Science*. 62(2):363-366, 398.

Clark. T.H., Faustman, C., Chan, W.K.M., Furr, H.C., Riesen, J.W. 1999. Canthaxanthin as an antioxidant in a liposomemodel system and in minced patties from rainbow trout. *Food and Chemical Toxicology*. 64: 982-986.

Codex Alimentarius 1999. Codex Guidelines for the Sensory Evaluation of Fish and Shellfish in Laboratories. CAC-GL 31 (Vol. 9). World Health Organization – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Contreras-Medellin, R., Labuza T.P., 1981. Prediction of moisture protection requirements for foods. *Cereal Food World*, 26:335-343.

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.L., Guilbert, S. 1998. Packaging films based on myofibrillar proteins: Fabrication, properties and applications. *Nahrung/Food*. 42: 260-263.

Cutter, C.N., Sumner, S.S. 2002. Application of edible coatings in muscle foods . En: *Protein-Based Films and Coatings*. Ed. Gennadios A. CRC , Boca Raton, FL. p. 467-480.

Dangaran, K.L., Krochta, J.M. 2007. Preventing the loss of tensile, barrier and appearance properties caused by plasticiser crystallisation in whey protein films. *International Journal of Food Science and Technology*. 42(9): 1094-1100.

Dangaran, K.L., Tomasula, P.M. 2006. Predicting biopolymer film function using plasticizer efficiency ratings. *IFT 2006 Ann. Meeting Book of Abstracts*. 054C-06.

Dávalos, A., Miguel M., Bartolomé, B., López-Fandino, R. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*. 67: 1939-1944.

De Jong, G.A.H., Wijngaards, G., Boumans, H., Koppelman, S.J., Helsing, M. 2001. Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and *Streptovorticillium mobaraense*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(7): 3389-3393.

De Man, J.M. 1999. *Principles of Food Chemistry*. Aspen publishers Maryland, USA.

Debeaufort, F., Martín-Polo, M., Voilley, A. 1993. Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *Journal of Food Science*. 58(2): 426-429.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo J.-A., Voilley, A. 1998. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38(4): 299-311.

Debeaufort, F., Voilley, A., Guilbert, S. 2002. *En L'eau dans les Aliments*. Eds. Le Meste M., Lorient D., Simatos D. Tec & Doc, Paris, France.

Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R., Verrez-Bagnis, V. 2006. Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46: 409-421.

Di Pierro, P., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L., Masi, P., Porta, R. 2005. Solubility and permeability properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Food Biotechnology*. 19: 37-49.

Diab, T., Biliaderis, G.C., Gerasopoulos, D., Sfakiotakis, E. 2001. Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 988-1000.

Dickinson, E. 1997. Enzymatic crosslinking as a tool for colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends in Food Science and Technology*. 8(10): 334-339.

Dickinson, E., Yamamoto, Y. 1996. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1371-1377.

Directiva 06/52/CE. 2006. Directiva 06/52/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de Julio de 2006 por la que se modifica la Directiva 95/2/CE relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes y la Directiva 94/35/CE relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 26.07.2006.

Directiva 95/2/CE. 1995. Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 18.03.1995

Dolatowski, Z.J., Stadnik, J., Stasiak, D. 2007. Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 6: 89-99.

Donhowe, I.G., Fennema, O. 1994. Edible films and coatings: Characteristics, formation, definitions and testing methods. En: Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. Lancaster. Basel: Technomic Publishing. p. 1-21.

Duan, J., Cherian G., Zhao, Y. 2010. Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. Food Chemistry. 119(2): 524-532.

Durnford, E., Shahidi, F. 1998. Flavour of fish meat. En: Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods. 2nd Edition. Ed. Shahida, F. Blackie Academic & Professional, London, UK. p. 131-152.

Earle, R.D., Snyder, C. E. 1966 (7 junio). Method of preparing frozen seafood. Patente U.S.A. 3,255,021.

Einen, O., Guerin, T., Fjæra, S.O., Skjervold, P.O. 2002. Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon. Aquaculture. 212: 129-140.

Einen, O., Skrede, G. 1998. Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed high-energy diets. Aquaculture Nutrition. 4: 99-108.

Elías, R.J., McClements, D.J., Decker, E.A. 2005. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 10248-10253.

Elias, R.J., Kellerby, S.S., Decker, E.A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 48: 430-441.

Erickson, M. 1997. Lipid oxidation: flavor and nutritional quality deterioration in frozen foods. En: Quality in Frozen Food. Eds. Erickson M., Hung Y.C. Chapman and Hall, New York, USA. p. 141-173.

Erikson, U., Sigholt, T., Seland, A. 1997. Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 149(3-4): 243-252.

Eymard, S. 2003. Mise en Évidence et Suivi de L'oxydation des Lipides au Cours de la 481 Conservation et de la Transformation du Chinchard (*Trachurus trachurus*): choix des 482 procédés. PhD Thesis. Ecole polytechnique. Université de Nantes. France. Thèses & 483 rapports en ligne, <http://www.ifremer.fr/docelec/>. Octobre 2010.

Eymard, S., Genot, C. 2003. A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. European Journal of Lipid Science and Technology. 105(9): 497-501.

Fan, W.J., Sun, J.X., Chen, Y.C. 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry. 115: 66-70.

FAO (Food and Agriculture Organization) 1977. La congelación en las Pesquerías: Documento Técnico Sobre la Pesca N° 167. Roma, Italia.

FAO (Food and Agriculture Organization), 2010. States of World Fisheries and Aquaculture. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm>. Junio 2011.

Fellows, P.J., 2000. Food Processing Technology: Principles and Practice. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

Fennema OR. 1996. Food chemistry. Third edition. Ed. Dekker M. New York, USA. p.1067.

Fennema, O.R. 1993. Química de los Alimentos. Segunda edición. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Flick, G.J., Gi-Pyo, H., Knobl, G.M. 1992. Lipid oxidation of seafood during storage. En: Lipid Oxidation in Food. Ed. St. Angelo A.J. American Chemical Society, Washington, D.C., USA. p. 183-207.

Flint, E.B., Suslick, K.S. 1991. The Temperature of Cavitation. *Science*. 253: 1397-1399.

Floris, R., Bondar, I., Weinbreck, F., Alting, A.C. 2008. Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. *International Dairy Journal*. 18: 566-573.

Foegeding, E., Luck, P. 2002. Whey protein products. En: Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition. Eds. Caballero B., Trugo L., Finglas P. Academic Press, New York, USA. p.1957-1960.

Frankel, E., 1993. In search for better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in foods lipids. *Trends in Foods Science Technology*. 4: 220-225.

Fukase, H., Ohdaira, E., Masuzawa, N., Ide, M. 1994. Effect of ultrasound in soybean protein extraction. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes and Review Papers*. 33(5B): 3088-3090.

Galani, D., Apenten, R.K.O. 1999. Heat-induced denaturation and aggregation of beta-lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. *International Journal of Food Science and Technology*. 34: 467-476.

García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. 1998. Starch-based coatings: effect on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 411-420.

García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. 2000. Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*. 52: 118-124.

Geeves, M.A., Holmes, K.C. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annual Review of Biochemistry*. 68: 687-728.

Gennadios, A. 2004. Edible films and coatings from proteins. En: *Proteins in Food Processing*. Ed. Yada R.Y. Woodhead Publishers, Cambridge, UK. p. 442.

Gennadios, A., Brandenburg, A.H., Weller, C.L., Testin, R.F. 1993b. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1835-1839.

Gennadios, A., Ghorpade, V.M., Weller, C.L., Hanna, M.A. 1996b. Heat curing of soy protein films. *International Journal of the American Society of Agricultural and Biological Engineers*. 39: 575-579.

Gennadios, A., Handa, A., Froning, G.W., Weller, C.L., Hanna, M.A. 1998. Physical properties of egg white-dialdehyde starch films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 1297-1302.

Gennadios, A., Hanna M. A., Kurth, L.B. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A Review. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 30(4): 337-350.

Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L., Krochta, J. M. 1994. Edible coating and films based on protein. En: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Eds. Krochta J.M., Balwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O. Technomic Publishing, Lancaster, PA. p. 201-277.

Gennadios, A., Park, S., Ju, Z., Hettiarachchy, N. 2002. Formation and properties of fish miofibrillar protein films and coatings. En: Protein-Based Films and Coatings. Ed.. Gennadios A. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 123-137.

Gennadios, A., Weller, C.L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*. 44(10):63-69.

Gennadios, A., Weller, C.L. 1991. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. *Cereal Foods World*. 36: 1004-1009.

Gennadios, A., Weller, C.L., Hanna, M.A., Froning, G.W. 1996a. Mechanical and barrier properties of egg albumen films, *Journal of Food Science*. 61: 585-589.

Gennadios, A., Weller, C.L., Testin, R.F. 1993a. Property modification of edible wheat, gluten-based films. *American Society of Agricultural Engineering*. 36(2): 465-470.

Gennadios, A., Weller, C.L., Testin, R.F. 1993c. Temperature effect on oxygen permeability of edible protein-based films. *Journal of Food Science*. 58: 212-214, 219.

Genot, C., Meynier, A., Riaublanc, A., Chobert, J. M. 2003. Protein alterations due to lipid oxidation in multiphase systems. En: *Lipid Oxidation Pathways*. Ed. Kamal-Eldin A. Champaign: AOACS Press pub. Champaign, IL, USA. p.265-292.

Giese, J. 1995. Measuring physical properties of foods. *Food Technology*. Special report. February: 54-63.

Glicksman, M. 1969. *Gum Technology in the Food Industry*. Academic Press. New York, USA.

Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C. 2007. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. 105: 511-520.

Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.L., Guilbert, S. 1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*. 29: 39-50.

Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.L. 1992. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*. 57: 190-199.

Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.L. 1993. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*. 58: 206-211.

Gontard, N., Marchesseau, S., Cuq, J.L., Guilbert, S. 1995. Water vapour permeability of edible bilayer films of wheat gluten and lipids. *International Journal of Food Science and Technology*. 30: 49-56.

Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B., Guilbert, S. 1996. Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1064-1069.

Grant, L.A., Burns, J. 1994. Application of coatings . En: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Eds. Krochta J.M., Baldwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O. Technomic Publishing, Lancaster, PA. p. 189-200.

Gray, J.I., Gomaa, E. A., Buckley, D.J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43: 111–123.

Guilbert, S. 1986. Technology and application of edible protective films. En: Food Packaging and Preservation. Ed. Mathlouthi M. Elsevier Applied Science, New York, USA. p.371.

Guilbert, S., Biquet, B. 1989. Les films et enrobages comestibles. En: L'emballage des Denrées Alimentaires de Grande Consommation. Eds. Bureau G., Multon J.J. Technique et Documentation, Lavoisier, Apria, Paris, France. p.320-359.

Guilbert, S., Biquet, B. 1995. Edible films and coatings. En: Food packaging technology. Eds. Bureau G., Multon J.L. VCH Publishers, Inc, New York, USA. p. 315-353.

Guilbert, S., Gontard, N. 1995. Edible and biodegradable food packaging. En: Foods and Packaging Materials-Chemical Interactions. Eds. Ackermann P., Jägerstad M., Ohlsson T. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. p. 159-168.

Guilbert, S., Gontard, N., Gorris L.G.M. 1996. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 29: 10-17.

Guilbert, S., Graille, J. 1994. Biomatériaux et molécules fonctionnelles. En: Valorisations Non-Alimentaires des Grandes Productions Agricoles. Les colloques 71. Ed. Gueguen J. INRA Editions, Paris, France. p. 195-206.

Gülseren, I., Güzey, D., Bruce, B.D., Weiss, J. 2007. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14: 173-183.

Güzey, D., Gulseren, I., Bruce, B.D, Weiss, J. 2006. Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*. 20(5): 669-677.

Hamilton, M.C., Hites, R.A., Schwager, S.J, Foran, J.A., Knuth, B.A., Carpenter, D.O. 2005. Lipid composition and contaminants in farmed and wild salmon. *Environmental Science Technology*. 39(22): 8622-8629.

Hamilton, R.J. 1999. The chemistry of rancidity in foods. En: *Rancidity in Foods*. Eds. Allen J.C., Hamilton J.H. Aspen Publishers Inc., Maryland, USA. p. 1-21.

Handa, A., Gennadios, A., Froning, G.W., Kuroda, N., Hanna, M.A. 1999. Tensile, solubility and electrophoretic properties of egg white films as affected by surface sulfhydryl groups. *Food Science*. 64(1): 82-85.

Hanson, S.W.F., Olley, J. 1963. Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*. 89: 101-102.

Hardenburg, R.E. 1967. Wax and Related Coatings for Horticultural Products. A bibliography. Ed. United States Department of Agricultural. Agricultural Research Service Publication, USA. p. 51-15.

Harris, P., Tall, J. 1999. Rancidity in fish. En: *Rancidity in Foods*. Eds. Allen J.C., Hamilton J.H. Aspen Publishers Inc., Maryland, USA. p. 256-272.

Harte, R., Gray, J.I. 1987. The Influence of packaging on product quality. En: *Food Product-Package Compatibility*. Eds. Gray J.I., Harte B.R., Miltz J. Technomics Publishing Company, Lancaster, PA. p. 17-29.

Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K., Kumagai, H., Feng, Y., Takahashi, K. 1998. Antioxidant activity of soluble elastin peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2167-2170.

Haugaard, V.K., Udsen, A.M., Mortensen, G., Hoegh, L., Petersen, K., Monahan, F. 2001. Potential Food Applications of Biobased Materials. An EU-Concerted Action Project. *Starch-Stärke*. 53: 189-200.

Hemre, G.I., Sandnes, K. 1999. Effect of dietary lipid level on muscle composition in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*. 5: 9-16.

Hermann, K. 1977. *Alimentos Congelados. Tecnología y Comercialización*. Editorial Acribia. España.

Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine*. 19(3): 271-280.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(3): 588-593.

Hiller, B., Lorenzen, P.C. 2010. Functional properties of milk proteins as affected by *Maillard* reaction induced oligomerisation. *Food Research International*. 43: 1155-1166.

Hirasa, K. 1991. *Moisture Loss and Lipid Oxidation in Frozen Fish: Effect of a Casein-Acetylated Monoglyceride Edible Coating*. M.S. thesis, University of California- Davis, Davis, CA, USA.

Hong, S.I., Krochta, J.M. 2006. Oxygen barrier performance of whey protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering*. 77: 739-745.

Honikel, K.O., Hamm, R. 1994. Measurement of waterholding capacity and juiciness. En: Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products. Advances in Meat Research Series. Vol. 9. Ed. Pearson A.M., Dutson T.R. Aspen publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, USA. p. 125-161.

Hultin, H.O. 1994. Oxidation of lipids in seafoods. En: Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality. Eds. Shahidi F., Botta J.R. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Scotland. p. 49-74.

Hunt, H.C. 1980. Meat color measurements. En Proceedings 33th Reciprocal Meat Conference. AMSA. p.41-46.

Hunt, M.C., Acton, J.C., Benedict, R.C., Calkins, C.R., Cornforth, D.P., Jeremiah, L.E., Olson, D.P., Salm, C.P., Savell, J.W., Shivas, S.D. 1991., Guidelines for meat color evaluation. Ed. American meat association. National live Stock and Meat Board, Chicago, USA. 44: 3-17.

Huss, H. 1988. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de Calidad. Colección FAO: Pesca N°29, . <http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s00.htm#Contents>. Marzo 2010.

Huss, H.H., Ben Embarek, P.K., Jeppesen, V.F. 1995. Control of biological hazards in cold smoked salmon production. Food Control. 6: 335-340.

Ijichi, K.E. 1978. Evaluation of an Alginate Coating During Frozen Storage of Red Snapper and Silver Salmon. M.S. thesis, University of California-Davis, Davis, CA, USA.

Iwami, K., Hattori, M., Ibuki, F. 1987. Prominent antioxidant effect of wheat gliadine on linoleate peroxidation in powder model systems at higher water activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 35: 628-631.

Jambrak, A.R., Mason, T.J., Lelas, V., Kresic, G. 2010. Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *Food Science and Technology*. 43: 254-262.

Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Kresic, G., Badanjak, M. 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*. 93(4): 386-393.

Jambrak, A.R., Mason, T.J., Lelas, V., Herceg, Z., Herceg, I.L.J. 2008. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*. 86(2): 281-287.

Jangchud, A., Chinnan, M.S. 1999. Peanut protein film as affected by drying temperature and pH of film-forming solution. *Journal of Food Science*. 64: 153-157.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology* (7th edition). New York: Springer.

Jayasooriya, S.D., Bhandari, B.R., Torley, P., D'Arcy, B.R. 2004. Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. *International Journal of Food Properties*. 7(2): 301-319.

Jeon, Y.I., Kamil, J.Y.V.A., Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 20: 5167-5178.

Jiang, S.T., Lee, T.C. 2004. Freezing seafood and seafood products: Principles and applications. En: *Handbook of frozen foods*. Eds. Hui Y.H., Cornillon P., Legaretta I.G., Lim M.H., Murrell K.D., Nip W.K. Marcel Dekker Inc., New York, USA. p. 245-294.

Johnson, E.A., Villa, T.G., Lewis, M.J. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture*. 20: 123-134.

Kamper, S.L., Fennema, O.N. 1984. Water vapor permeability of an edible fatty acid, bilayer films. *Journal of Food Science*. 49: 1482-1485.

Kanner, J. 1994. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*. 36: 169-189.

Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., Suzuki, E. 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 44252–44260.

Katikou, P., Hughes, S.I., Robb, D.H.F. 2001. Lipid distribution within Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Aquaculture*. 202: 89-99.

Keceli, T., Gordon, L.H. 2002. Ferric ions reduce the antioxidant activity of the phenolic fraction of virgin olive oil. *Journal of Food Science*. 67: 943-947.

Kester, J.J., Fennema, O. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*. 40: 47-59.

Khaoula, K., Cristina, P., Banon, S., Desobry, S., Hardy, J. 2004. Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44: 239-251.

Kilincceker, O., Dogan, I.S., Kucukoner, E. 2009. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT-Food Science and Technology*. 42: 868-873.

Kim, K.M., Marx, D.B., Weller, C.L., Hanna, M.A. 2003. Influence of sorghum wax, glycerin, and sorbitol on physical properties of soy protein isolate films. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 80(1): 71-76.

Kinsella, J.E., Shimp, J.L., Mai, J., Weihrauch, J. 1977. Fatty acid content and composition of freshwater finfish. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 54: 424-429.

Kinsella, J.E., Whitehead, D.M. 1989. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*. 33: 343-427.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D.U. 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 261-266.

Kokoszka, S., Debeaufort, F., Hambleton, A., Lenart, A., Voilley, A. 2010. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11(3): 503-510.

Kolakowska, A. 2003. Lipid oxidation in food systems. En: *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. Eds. Sikorski Z., Kolakoska A. CRC Press, London, UK. p. 133-165.

Kresic, G., Lelas, V., Jambrak, A.R., Herceg, Z., Brncic, S.R. 2008. Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*. 87(1): 64-73.

Krochta, J.M. 2002. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities. En: *Protein-Based Films and Coatings*. Ed. Gennadios A. CRC Press. Boca Raton, UK. p. 1-32.

Krochta, J.M., De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*. 51(2): 61-74.

Krochta, J.M., McHugh, T.H. 1996 (6 agosto). Water-insoluble protein-based edible barrier coatings and films. Patente U.S.A. 5,543,164.

Kunte, L.A., Gennadios, A., Cuppett, S.L., Hanna, M.A., Weller, C.L. 1997. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*. 74: 115-118.

Kuraishi, C., Yamazaki, K., Susa, Y. 2001. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Reviews International*. 17(2): 221-246.

Larré, C., Desserme, C., Barbot, J., Guéguen, J. 2000. Properties of deamidated gluten films enzymatically cross-linked. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 5444-5449.

Lavéty, J., Afolabi, O.A., Love, R.M. 1988. The connective tissues of fish. IX. Gaping in farmed species. *International Journal of Food Science and Technology*. 23: 23-30.

Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. 2002. Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers*. 48: 179-190.

Lee, H., Feng, H. 2011. Effect of power ultrasound on food quality. En: *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing Food Engineering Series*. Eds. Feng H., Gustavo V., Barbosa-Cánovas, Weiss J. CRC Press, Boca Raton, FL. p.559-582.

Lee, K.Y., Shim, J., Lee, H.G. 2004. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydrate Polymers*. 56: 251-254.

Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., Stadtman, E.R. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 93(26): 15036-15040.

Lieberman, E.R., Gilbert, S.G. 1973. Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture, and plasticizer content. *Journal of Polymer Science*. 41: 33-43.

Lim, L.T., Mine, Y., Britt, I.J., Tung, M.A. 2002. Formation and properties of egg white protein films and coatings. En: *Protein-Based Films and Coatings*. Ed. Gennadios A. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 233-252.

Lim, L.T., Mine, Y., Tung, M.A. 1998. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4022-4029.

Lim, L.T., Mine, Y., Tung, M.A. 1999. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature and glycerol content. *Journal of Food Science*. 64: 616-622.

Linden, G., Lorient, D. 1996. *Bioquímica Agroindustrial: Revalorización Alimentaria de la Producción Agrícola*. Editorial Acribia, Zaragoza. España.

Liu, C., Téllez-Garay, A., Castell-Pérez, E. 2004. Physical and mechanical properties of peanut protein films. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*. 37: 731-738.

Love, R.M. (1988). *The Food Fishes-Their Intrinsic Variation and Practical Implications*. Farrand Press, London, UK. p. 121-140.

Mackie, I.M. 1993. The effects of freezing on flesh proteins. *Food Reviews International*. 9: 575-610.

Mahmoud, R., Savello, P.A. 1992. Mechanical Properties of and water vapor transferability through whey protein films. *Journal of Dairy Science*. 75: 942–946.

Mahmoud, R., Savello, P.A. 1993. Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein. *Journal of Dairy Science*. 76: 29-35.

Marchioni, C., Riccardi, E., Spinelli, S., Dell’Unto, F., Grimaldi, P., Bedini, A., Giliberti, C., Giuliani, L., Palomba, R., & Congiu Castellano, A. (2009). Structural changes induced in protein by therapeutic ultrasounds. *Ultrasonics*, 49, 569-576.

Marcuzzo, E., Peressini, D., Debeaufort, F., Sensidoni, A. 2010. Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11(3): 451-457.

Marquie, C., Aymard, C., Cuq, J.L., Guilbert, S. 1995. Biodegradable packaging made from cottonseed flour: formation and improvement by chemical treatments with gossypol, formaldehyde, and glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 2762-2767.

MARM (Ministerio de Medioambiente y Medio Rural y Marino), 2011. Panel de consumo alimentario. Base de datos de consumo en hogares. <http://www.marm.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/resultado1.asp>. Junio 2011

Maruyama, N., Prak, K., Motoyama, S., Choi, S.K., Yagasaki, K., Ishimoto, M., Utsumi, S. 2004. Structure-physicochemical function relationships of soybean glycinin at subunit levels assessed by using mutant lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(26): 8197-8201.

Mason, T.J., Luche, J.L. 1996. Ultrasound as a new tool for synthetic chemists. En: Chemistry under extreme or non classical conditions. Eds. Van Eldik R., Hubbard C.D. John Wiley & Sons Inc. and Spektrum Akademischer Verlag. New York, USA. p. 317-380.

Maté, J.I., Krochta, J.M. 1996. Whey protein coating effect on the oxygen uptake of dry roasted peanuts. *Journal of Food Science*. 61(6): 1202-1210.

Matsumura, Y., Chanyongvorakul, Y., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T., Mori, T. 1996. Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of α -lactalbumin in the molten globule state. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1292: 69-76.

Matsumura, Y., Lee, D.S., Mori, T. 2000. Molecular weight distributions of alpha-lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. *Food Hydrocolloids*. 14(1): 49-59.

McClements, D.J. 1995. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science*. 6: 293-299.

McHugh, T.H., Aujard, J.-F., Krochta, J.M. 1994. Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties. *Journal of Food Science*. 59: 416-423.

McHugh, T.H., Krochta, J.M. 1994a. Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 71: 307-312.

McHugh, T.H., Krochta, J.M. 1994b. Sorbitol- vs. glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42(4): 841-845.

Mei, Y., Zhao, Y., Yang, J., Furr, H.C. 2002. Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots. *Journal of Food Science*. 67: 1964-1968.

Mellenthin, W.M., Chen, P.M., Borgic, D.M. 1982. In-line application of porous wax coating materials to reduce friction discoloration of 'Bartlett' and 'd'Anjou' pears. *HortScience*. 17: 215-217.

Menéndez, O., Rawel, H., Schwarzenbolz, U., Henle, T. 2006. Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high-pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(5): 1716-1721.

Miller, K.S., Chiang, M.T., Krochta, J.M. 1997. Heat curing of whey protein films. *Journal of Food Science*. 62: 1189-1193.

Miller, K.S., Upadhyaya, S.K., Krochta, J.M. 1998. Permeability of d-Limonene in Whey Protein Films. *Journal of Food Science*. 63(2): 244-247.

Mine, Y. 1992. Sulfhydryl groups changes in heat-induced soluble egg white aggregates in relation to molecular size. *Journal of Food Science*. 58: 254-255.

Mine, Y. 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science Technology*. 6: 225-232.

Monterrey-Quintero, E.S. 1998. Caracterização Físico-Química de Proteínas Miofibrilares e Elaboração de Biofilmes. Dissertação, Mestrado em Zootecnia, Sao Paulo, Brazil. p. 83. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v35n1/6912.pdf>. Dicembre 2010.

Morkore, T., Rorvik, K.A. 2001. Seasonal variations in growth, feed utilisation and product quality of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) transferred to seawater as 0+ smolts or 1+ smolts. *Aquaculture*. 199: 145-157.

Morkore, T., Vallet, J.L., Cardinal, M., Gómez-Guillén, M.C., Montero, R., Torrissen, O.J., Nortvedt, R., Sigurgisladottir, S., Thomassen, M.S. 2001. Fat content and fillet shape of Atlantic salmon: relevance for processing yield and quality of raw and smoked products. *Journal of Food Science*. 66: 1348-1354.

Morr, C.V., Ha, E.Y.W. 1993. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. 33: 431-476.

Motoki, M., Aso, H., Seguro, K., Nio, N. 1987. α_1 -casein film prepared using transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51: 993-996.

Motoki, M., Nio, N. 1983. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *Journal of Food Science*. 48: 561-566.

Motoki, M., Okiyama, A., Nonaka, M., Tanaka, H., Uchio, R., Matsuura, A., Ando, H., Umeda, K. 1990 (1 agosto). Novel transglutaminase. Ajinomoto Co. Inc. and Amano Pharmaceutical Co. Ltd., assignee. Patente. E P 0379606-A1.

Motoki, M., Seguro, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*. 9(5): 204-210.

Mulet, A., Benedito, J., Golas, Y., Carcel, J.A. 2002. Noninvasive ultrasonic measurements in the food industry. *Food Reviews International*. 18(2-3): 123-133.

Navarro, M.P. 1991. Valor Nutritivo del Pescado. II. Pescado Elaborado. *Revista Agroquímica y Tecnología Alimentaria*. 31(4): 459-472.

Negbenebor, C.A., Chen, T.C. 1985. Effect of ovalbumen on TBA values of corn minuted poultry meat. *Journal of Food Science*. 50: 270-271.

Nickell, D.C., Bromage, N.R. 1997. Problems of pigmentation: Lipids and maturation. Institute of Aquaculture, University of Stirling. FK9 4LA. p. 20.

Nio, N., Motoki, M., Takiami, K. 1986. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 115(2): 335-345.

Nisbet, A.D., Saundry, R.H., Moir, A.J.G., Fothergill, L.A., Fothergill, J.E. 1981. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *European Journal of Biochemistry*. 115: 335-345.

Nisperos-Carriedo, M.O. 1994. Edible coatings and films based on polysaccharides. En: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Eds. Krochta J.M., Balwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O.: Technomic Publishing, Lancaster, Basel. p. 305-330.

Nisperos-Carriedo, M.O., Shaw, P.E. 1990. Comparison of volatile flavour components in fresh and processed orange juices. *Journal of Agriculture Chemistry*. 38:1048-1052.

No, H.K., Storebakken, T. 1991. Color stability of rainbow trout fillets during frozen storage. *Journal of Food Science*. 56: 969-984.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992. *Enzyme Nomenclature*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. World wide web material prepared by G.P. Moss, Department of chemistry, University of London. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Junio 2009.

Novak, L. J. 1957 (30 abril). Food preservation. Patente U.S.A. 2,790,720.

Oh, J.H., Wang, B., Field, P.D., Aglan, H.A. 2004. Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *International Journal of Food Science & Technology*. 39: 287-294.

Ojagh, S.M., Núñez-Flores, R., López-Caballero, M.E., Montero, M.P., Gómez-Guillén, M.C. 2011. Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin-lignin film. *Food Chemistry*. 125: 595-606.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*. 120: 193-198.

Okamoto, S. 1978. Factors affecting protein film formation. *Cereal Foods World*. 23: 256-262.

Osés, J., Fabregat, M., Pedroza, R., Tomás, S., Cruz, A., Maté, J. 2009. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *Journal of Food Engineering*. 92(1): 56-62.

Osés, J., Fernández-Pan, I. 2008. Use of edible films based on whey protein isolate to protect foods rich in polyunsaturated fatty acids. *European Food Research and Technology*. 227(2): 623-628.

Ou, C.Y., Tsay, S.F., Lai, C.H., Weng, Y.M. 2001. Using gelatin-based antimicrobial edible coating to prolong shelf-life of tilapia fillets. *Journal of Food Quality*. 25(3): 213-222.

Ozbay G., Spencer K., Gill T.A. 2006. Investigation of protein denaturation and pigment fading in farmed steelhead (*Onchorhynchus mykiss*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 30: 208-230.

Park, H., Bun, J., Weller, C.L., Vergano, P.J., Testin, R.F. 1994. Water vapor permeability and mechanical properties of grain protein-bases films as affected by mixtures of polyethylene glycerol and glycerin plasticizers. *International Journal of the American Society of Agricultural and Biological Engineers*. 37: 1281-1285.

Park, H.J., Weller, C.L., Vergano, P.J., Testin, R.F. 1993. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. *Journal of Food Science*. 58(6): 1361-1364.

Park, S.K., Hettiarachchy, N.S., Ju, Z.Y., Gennadios, A. 2002. Formation and properties of soy protein films and coatings. En: *Protein-Based Films and Coatings*. Ed.. Gennadios A. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 123-137.

Park, P.J., Jung, W.K., Nam, K.S., Shahidi, F., Kim, S.K. 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 78: 651-656.

Parra, D.F., Tadini, C.C., Ponce, P., Lugão, A.B. 2004. Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*. 58: 475-481.

Partanen, R., Hakala, P., Sjoval, O., Kallio, H., Forssell, P. 2005. Effect of relative humidity on the oxidative stability of microencapsulated Sea Buckthorn seed oil. *Journal of Food Science*. 70: 37-43.

Pavlath, A.E., Orts, W. 2009. Edible films and coatings: why, what, and how. En: *Edible Films and Coatings for Food Applications* Eds. Embuscado M.E., Huber K.C. Springer Science and Business Media, LLC, New York, USA. p. 1-23.

Pegg, R. B. 2005. Measurement of primary lipid oxidation products. En: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. Vol. 1. Water, Proteins, Enzymes, Lipids and 310

Carbohydrates. Eds. Shoemaker D., Smith M., Sporns P. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA. p. 515-529.

Peña-Ramos, E.A., Xiong, Y.L. 2001. Antioxidative activity of whey protein Hydrolyzates in a liposomal system. *Journal of Dairy Science*. 84: 2577-2583.

Peña-Ramos, E.A., Xiong, Y.L. 2003. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Science*. 64: 259-263.

Pérez-Gago, M.B., Krochta J. M. 2005. Emulsion and bi-layer films. En: *Innovations in Food Packaging*. Ed. Han J.H. Academic Press, United Kingdom. p. 384-402.

Pérez-Gago, M.B., Nadaud, P., Krochta, J.M. 1999. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*. 64: 1034-1037.

Pérez-Gago, M.B., Rojas, C., Del Río, M.A. 2002. Effect of lipid type and amount of edible hydroxypropyl methylcellulose-lipid composite coatings used to protect postharvest quality of mandarins cv. Fortune. *Journal of Food Science*. 67(8): 2903-2910.

Petersen, K., Væggemose Nielsen, P. 1999. Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 10(2): 52-68.

Pike, I.H., Andorsdottir, G., Mundheim, H. 1990. El rol de la harina de pescado en dietas para salmónidos. IAFMM. Boletín Técnico N° 24 de la Asociación Internacional de Productores de Harina de Pescado. Potters Bar, Hertfordshire, U.K.

Pike, O.A. 2003. Fat characterization. En: *Food Analysis*. Ed. Nielsen S.S. Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York, USA. p. 227-246.

Polvi, S.M., Ackman, R.G. 1992. Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle lipids and their response to alternative dietary fatty acid sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1001-1007.

Povey, J. W., Mason, T. 1998. *Ultrasound in Food Processing*. Blackie Academic & Professional. London, UK.

Powrie, W.D., Nakai, S. 1986. The chemistry of eggs and egg products. En: *Egg Science and Technology*. Eds. Stadelman W.J., Cotterill O.J. Avi Publishing, Westport, CT. p. 97-139.

Pozo, R., Lavety, J., Love, R.M. 1988. The role of dietary Alfa-tocopherol (vitamin E) in stabilizing the canthaxanthin and lipids of rainbow muscle. *Aquaculture*. 73: 165-175.

Pratt, D.E., Birac, P.M. 1979. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *Journal of Food Science*. 44: 1720-1722.

Rayner, M., Ciolfi, V., Maves, B., Stedman, P. and Mittal, G. 2000. Development and application of soy-protein films to reduce fat intake in deep-fried foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 777-782.

Refsgaard, H.H.F., Brockhoff, P.B., Jensen, B. 1998a. Biological variation of lipid constituents and distribution of tocopherols and astaxanthin in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 808-812.

Refsgaard, H.H.F., Brockhoff, P.B., Jensen, B. 1998b. Sensory and chemical changes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3473-3479.

Regalado, C., Pérez-Pérez, C., Lara-Cortés, E., García-Almendárez, B.E. 2006. Whey protein based edible food packaging films and coatings. En: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Eds. Guevara-González R.G., Torres-Pacheco I. Research Signpost, Kerala, India. p. 237-261.

Renkema, J.M., Vliet, T.V. 2002. Heat-induced gel formation of soy proteins at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1569-1573.

Reutimann, E.J., Vadehra, D.V., Wedral, E.R. 1996 (22 octubre). Process of coating foods with a system for fluid retention and product thereof. Patente U.S.A. 5,567,453.

Rhim, J.W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C.L., Hanna, M.A., 1999a. Properties of ultraviolet irradiated protein films. *Lebensmittel-Wissenschaft Technology*. 32: 129-133.

Rhim, J.W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C.L., Hanna, M.A. 2000. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 4937-4941.

Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., Hanna, M.A. 2002. Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. *Industrial Crops and Products an Internacional Journal*. 15: 199-205.

Rhim, J.W., Lee, J.H., Ng, P.K.W. 2007. Mechanical and barrier properties of biodegradable-based films coated with polylactic acid. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*. 40: 232-238.

Rhim, J.W., Mohanty, K.A., Singh, S.P., Ng, P.K.W. 2006. Preparation and properties of biodegradable multilayer films based on soy protein isolate and poly(lactide). *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 45(9): 3059-3066.

Rhim, J.W., Shellhammer, T.H. 2005. Lipid-based edible films and coatings. En: Innovations in Food Packaging. Ed. Han J. Academic Press, United Kingdom. p. 362-383.

Rhim, J.W., Wu, Y., Weller, C.L., Schnepf, M. 1999b. Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. Journal of Food Science. 64: 149-152.

Riesz, P., Kondo, T. 1992. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. Free Radical Biological Medicine. 13: 247-270.

Roberts, R.T. 1993. High intensity ultrasonics in food processing. Chemistry & Industry. 15: 119-121.

Robertson, G.L. 1993. Food Packaging: Principles and Practice. Michael Dekker, New York, USA.

Roth, B., Johansen, S.J.S., Suontama, J., Kiessling, A., Leknes, O., Guldberg, B., Handeland, S. 2005. Seasonal variation in flesh quality, comparison between large and small Atlantic salmon (*Salmo salar*) transferred into seawater as 0+ or 1+smolts. Aquaculture. 250: 830-840.

Roth, B., Moeller, D., Veland, J.O., Imsland, A., Slinde, E. 2002. The effect of stunning methods on rigor mortis and texture properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Food Science. 67: 1462-1465.

Roy, S., Weller, C.L., Gennadios, A., Zeece, M.G., Testin, R.F. 1999. Physical and molecular properties of wheat gluten films cast from heated film-forming solutions. Journal of Food Science. 64: 57-60.

Ruff, N., FitzGerald, R.D., Cross, T.F., Teurtrie, G., Kerry, J.P. 2002. Slaughtering method and dietary α -tocoferyl acetate supplementation affect rigor mortis and fillet shelf-life of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Research*. 33: 703-714.

Sakamoto, H., Nonaka, M., Motoki, M. 1994. Calcium-independent transglutaminase derived from a microorganism: its characteristics and capability in protein crosslinking and gel formation. En: *Food Hydrocolloids: Structures, Properties, and Functions*. Eds. Nishinari K., Doi E. Plenum Press, New York, USA. p. 383-386.

Sathivel, S. 2005. Chitosan and protein coatings affect yield, moisture loss, and lipid oxidation of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Science*. 70(8): 455-459.

Sathivel, S., Huang J., Bechtel, P. J. 2008. Properties of pollock hydrolysates and its effect on lipid oxidation of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during four months frozen storage. *Journal of Food Biochemistry*. 32: 247-263.

Sathivel, S., Liu, Q., Huang J., Prinyawiwatkul, W. 2007. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*. 83: 366-373.

Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S. 1995. Isolation and analysis. En: *Carotenoids, Vol. 1A, Isolation and Analysis*. Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Birkhäuser, Basel. p. 81-108.

Schiedt, K., Leuenberger, F.J., Vecchi, M., Glinz, E. 1985. Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. *Pure and Applied Chemistry*. 57(5): 685-692.

Scrimgeour, C. 2005. Chemistry of fatty acids. En: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Ed. Shahidi F. Sixth Edition, Six Volume Set. p. 1-43.

Sharp, J.S., Becker, J.M., Hettich, R.L. 2004. Analysis of protein solvent accessible surfaces by photochemical oxidation and mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 76(3): 672-683.

Shearer, K.D., Asgard, T., Andorsdóttir, G., Aas, G.H. 1994. Whole body elemental and proximate composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during the life cycle. *Journal of Fish Biology*. 44: 785-797.

Sheehan, E.M., O'Connor, T.P., Sheehy, P.J.A., Buckley, D.J., FitzGerald, R. 1998. Stability of astaxanthin and canthaxanthin in raw and smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) during frozen storage. *Food Chemistry*. 63: 313-317.

Sheehan, J.,J. 1994. Bioconversion for Production of Renewable Transportation Fuels in the United States. *ACS Symposium Series*. 566: 1-53.

Shimada, K., Cheftel, J.C. 1998. Sulfhydryl group disulfide bond interchange during heat induced gelation of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37: 161-168.

Sigurgísladóttir, S., Ingvarsdóttir, H., Torrissen, O.J., Cardinal M, Hafsteinsson, H. 2000. Effects of freezing/thawing on the microstructure and the texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Research International*. 33:857-65.

Sikorski, Z.E., Scott, D.N., Buisson, D.H. 1984. The role of collagen in the quality and processing of fish. *CRC Critical Reviews Food Science Nutrition*. 20: 301-343.

Simeonidou, S., Govaris, A., Vareltzis, K. 1997. Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and Mediterranean hake (*Merluccius mediterraneus*). *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 204: 405-410.

Simopoulos, A. 1997. Nutritional aspects of fish. En: Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality. Eds. Luten J., Børrensen T., Oehlenschläger J. Elsevier, London, UK. p. 589-607.

Simpson, B.K., Gagné, N., Ashie, I.N.A., Noroozi, E. 1997. Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). Food Biotechnology. 11: 25-44.

Singh, R.K., Balange, A.K. 2005. Characteristics of pink perch (*Nemipterus japonicus*) surimi at frozen temperature. Journal of Food Processing and Preservation. 29(1): 75-83.

Skrede, G., Storebakken, T. 1986. Characteristics of color in raw, baked and smoked wild and pen-reared Atlantic salmon. Journal of Food Science. 51: 804-8.

Skrede, G., Wold, J.P. 2008. Color quality of salmon. En: Color Quality of Fresh and Processed Foods. Eds. Culver C.A., Wrolstad R.E. American Chemical Society, Washington, DC, USA. p. 242-253.

Soria, A.C., Villamiel, M. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity in foods: A review. Trends in Food Science and Technology. 21: 323-331.

Sothornvit, R., Krochta, J.M. 2000. Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(12): 6298-6302.

Sothornvit, R., Krochta, J.M. 2005. Plasticizers in edible films and coatings. En: Innovations in Food Packaging. Ed. Han J.H. Academic Press, United Kingdom. p. 403-433.

Sothornvit, R., Krochta, J.M.. 2001. Plasticizer effect on mechanical properties of betalactoglobulin films. Journal of Food Engineering. 50: 149-155.

Sothornvit, R., Reid, D. S., & Krochta, J. M. 2002. Plasticizer effect on the glass transition temperature of beta-lactoglobulin (β -Lg) films. Transactions of the ASAE. 45: 1479-1484.

Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Ruiz, H.A., Martins, J.T, Casariego, A., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. 2010. Effect of Chitosan-Based Coatings on the Shelf Life of Salmon (*Salmo salar*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58(21): 11456-11462.

Stadtman, E.R. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annual Review of Biochemistry. 62: 797-821.

Stein, P., Leslie, A., Finch, J., Turnell, W., Mclaughlin, P., Carrell, R. 1990. Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. Nature. 347: 99-102.

Stoloff, L.S., Punchocar, J.F., Crowther, H.E. 1948. Curb mackerel fillet rancidity. Food Industries. 20: 1130-1132.

Storebakken, T., Foss, P., Schiedt, K., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S., Manz U. 1987. Carotenoids in diets for salmonids. IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin. Aquaculture. 65: 279-292.

Storebakken, T., No, H.K. 1992. Pigmentation of rainbow trout. Aquaculture. 100: 209-229.

Stuchell, Y.M., Krochta, J.M. 1994. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. Journal of Food Science. 59: 1332-1337.

Stuchell, Y.M., Krochta, J.M. 1995. Edible coatings on frozen King salmon: effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. *Journal of Food Science*. 60: 28–31.

Subirade, M., Kelly, I., Gueguen, J., Pezolet, M. 1998. Molecular basis of film formation from a soybean protein: Comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 23: 241-249.

Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 11: 128-131.

Suslick, K.S. 1990. Sonochemistry. *Science*. 247: 1439-1445.

Sutton, J., Balfry, S., Higgs, D., Huang, C., Skura, B. 2006. Impact of iron-catalyzed dietary lipid peroxidation on growth performance, general health and flesh proximate and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) reared in seawater. *Aquaculture*. 257: 534-557.

Suzuki, T. 1981. Fish and Krill protein. *Processing Technology: Applied science*. Publishers. Ltd. London, UK.

Swain, S.N., Biswal, S.M., Nanda, P.K., Nayak, P.L. 2004. Biodegradable soy-based plastics: Opportunities and challenges. *Journal of Polymer Environment*. 12: 35-42.

Tang, C., Yang, X.Q., Chen, Z., Wu, H., Peng, Z.Y. 2005. Physicochemical and structural characteristics of sodium caseinate biopolymers induced by microbial transglutaminase. *Journal of Food Biochemistry*. 29: 402-421.

Tang, C.H., Wu, H., Chen, Z., Yang, X.Q. 2006. Formation and properties of glycinin-rich and β -conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase. *Food Research International*. 39: 87–97.

Tapia-Blácido, D., Sobral, P.J., Menegalli, F.C. 2005. Development and characterization of biofilms based on amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering*. 67: 215-223.

Taylor, M.J., Richardson, T. 1980. Antioxidant activity of skim milk: effect of sonication. *Journal of Dairy Science*. 63: 1938-1942.

Tharanathan, R.N. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*. 14(3): 71-78.

Tironi, V., LeBail, A., de Lamballerie, M. 2007. Effects of pressure-shift freezing and pressure-assisted thawing on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Journal of Food Science*. 72(7): 381–387.

Tomás, S.A., Cruz-Orea, A., Stolik, S., Pedroza-Islas R., Villagómez-Zavala, D. L., Gómez-Corona, C. 2004. Determination of the thermal diffusivity of edible films. *International Journal of Thermophysics*. 25: 611-620.

Tong, L.M., Sasaki, S., McClements, D.J., Decker, E.A. 2000. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 1473-1478.

Torres, J.A. 1994. Edible films and coatings from proteins. En: *Protein Functionality in Food Systems*. Eds. Hettiarachchy N.S., Ziegler G.R., Dekker M. IFT and Marcel Dekker Inc., New York, USA. p. 248-281.

- Torrissen, I.J., Naevdal, G. 1984. Pigmentation of salmonids—genetic variation in carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. 38(1): 59-66.
- Torrissen, O.J. 1995. Strategies for salmonid pigmentation. *Journal of Applied Ichthyology*. 11: 276-281.
- Torrissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K.D. 1989. Pigmentation of salmonids—Carotenoid deposition and metabolism. *CRC Critical Review Aquatic Science*. 1: 209-225.
- Toulmin, H.A. 1956a (14 agosto). Method of preserving shrimp Patente. U.S.A. 2,758,929.
- Toulmin, H.A. 1956b (14 agosto). Method of preserving shrimp. Patente U.S.A. 2,758,930.
- Truong, V.D., Clare, D.A., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E. 2004. Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1170-1176.
- Tsai, G.J., Lin, S.M., Jiang, S.T. 1996. Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish products. *Journal of Food Science*. 61(6): 1234-1238.
- Tsuge, N., Eikawa, Y., Nomura, Y., Yamamoto, M., Sugisawa, K. 1991. Antioxidant activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg-white albumin. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. 65: 1635-1641.
- Valenzuela, A. 2005. El Salmón: un banquete de salud. *Revista Chilena de Nutrición*. 32 (1): 8-17.

Verbeek, C.J.R., Van der Berg, L.E. 2010. Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*. 295(1): 10-21.

Viljanen, K., Kylli, P., Hubbermann, E. M., Schwarz, K., Heinonen, M. 2005. Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6): 2022-2027.

Villamiel, M., De Jong, P. 2000. Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(2): 472-478.

Wan, J., Mawson, R., Ashokkumar, M., Ronacher, K., Coventry, M.J., Roginski, H., Versteeg, K. 2005. Emerging processing technologies for functional foods. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 60: 167-169.

Wang, J.Y., Fujimoto, K., Miyazawa, T., Endo, Y. 1991. Antioxidative mechanisms of maize zein in powder model systems against methyl linoleate: effect of water activity and coexistence of antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39: 351-355.

Weiss, J., Kristbergsson, K., Kjartansson G.T. 2011. Engineering food ingredients with high-intensity ultrasound. En: *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing Food Engineering Series*. Eds. Feng H., Gustavo V., Barbosa-Cánovas, W.J. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 239-285.

Were, L., Hettiarachchy, N.S., Coleman, M. 1999. Properties of cysteine-added soy protein-wheat gluten films. *Journal of Food Science*. 64: 514-518.

Wong, Y.C., Herald, T.J., Hachmeister, K.A. 1996. Evaluation of mechanical and barrier properties of protein coatings on shell eggs. *Poultry Science*. 75: 417-422.

Wu, Y., Rhim, J.W., Weller, C.L., Lamouz, F., Cuppet, S., Schnepf, M. 2000. Moisture loss and lipid oxidation for precooked beef patties stored in edible coatings and films. *Journal of Food Science*. 65: 300-304.

Yang, L., Paulson, A.T. 2000. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*. 33(7): 563-570.

Yildirim, M., Hettiarachchy, N.S. 1997. Biopolymers produced by crosslinking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. *Journal of Food Science*. 62: 270-275.

Yildirim, M., Hettiarachchy, N.S. 1998. Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. *Journal of Food Science*. 63(2): 248-252.

Yildirim, M., Hettiarachchy, N.S., Kalapathy, U. 1996. Properties of biopolymers from crosslinking whey protein isolate and soybean 11S globulin. *Journal of Food Science*. 61: 1129-1164.

Zhang, J., Mungara, P., Jane, J. 2001. Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer*. 42: 2569-2578.

Zheng, L., Sun, D.W. 2006. Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes-a review. *Trends in Food Science and Technology*. 17: 16-23.

Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., Bol, J. 1995. Microbial transglutaminase-a review of its production and application in food processing. *Applied Microbial Biotechnology*. 44 : 277-282.