



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Evaluación del impacto de un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje letal para *Anisakis* en la vida útil de filetes de merluza.

Evaluation of the impact of a lethal PEF treatment for *Anisakis* on the shelf life of hake fillets.

Autor/es

Paloma Romera Aibar

Director/es

Ignacio Álvarez Lanzarote
Vanesa Abad Calabia

Facultad de Veterinaria

2023

ÍNDICE

1.	RESUMEN	3
2.	ABSTRACT	3
3.	INTRODUCCIÓN	4
3.1.	ANISAKIS spp.	4
3.1.1.	Distribución geográfica	5
3.1.2.	Problemática	6
3.1.3.	Métodos convencionales de inactivación de <i>Anisakis</i> spp.	7
3.2.	PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE	8
3.3.	PEF Y ANISAKIS	10
4.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	11
5.	METODOLOGÍA.....	12
5.1.	MATERIA PRIMA.....	12
5.2.	TRATAMIENTOS DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE	12
5.3.	ESTUDIO DEL IMPACTO DE LOS PEF SOBRE LA MICROBIOTA DEL PESCADO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN.....	14
5.4.	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN	16
5.4.1.	Pérdidas por goteo	17
5.4.2.	Humedad	17
5.4.3.	Capacidad de Retención de Agua (CRA).....	17
5.4.4.	Pérdidas por cocinado (Cook-loss)	17
5.5.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	18
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1.	APLICACIÓN PEF A ESCALA DE LABORATORIO	18
6.1.1.	Inactivación de <i>Anisakis</i> por PEF. Efecto del campo eléctrico y de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento.	18
6.1.2.	Evaluación de la microbiota de la merluza tratada por PEF a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.....	21

6.1.3. Evaluación de la calidad de la merluza tratada por PEF a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.....	23
6.2. APLICACIÓN PEF A ESCALA DE PLANTA PILOTO.....	27
6.2.1. Inactivación de <i>Anisakis</i> por PEF. Efecto del campo eléctrico y de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento.	27
6.2.2. Evaluación de la microbiota de la merluza tratada por PEF a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.....	29
6.2.3. Evaluación de la calidad de la merluza tratada por PEF a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.....	31
7. CONCLUSIONES	32
8. CONCLUSIONS	33
9. VALORACIÓN PERSONAL.....	34
10. BIBLIOGRAFÍA.....	34

1. RESUMEN

Las larvas de *Anisakis* son capaces de causar infecciones parasitarias en el ser humano debido al consumo de productos de la pesca parasitados y sometidos a tratamientos insuficientes para la inactivación del parásito. Estas dan lugar a síndromes intestinales entre otros síntomas además de posibles reacciones alérgicas. Se encuentran ampliamente distribuidas con tasas de parasitación del 100% en algunas especies y zonas de pesca como en la merluza capturada en el Atlántico Norte. Entre las estrategias que existen para la inactivación del parásito se encuentran los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF, del inglés Pulsed Electric Fields) una tecnología poco investigada de la que se desconoce su impacto sobre la vida útil en este producto.

Este trabajo se centra en la evaluación del impacto de diferentes tratamientos PEF capaces de inactivar *Anisakis* en la vida útil de los filetes de merluza envasados en atmósferas protectoras, así como la evaluación de la calidad durante su almacenamiento.

La aplicación de los PEF (4,5 kV/cm y 20 kJ/kg) que permitió una inactivación superior al 80% de los *Anisakis*, no afectó en el desarrollo de la microbiota presente en los filetes de merluza almacenados en refrigeración y atmósfera protectora. Tras la evaluación de diferentes parámetros de calidad durante la vida útil, se determinó que las muestras tratadas por PEF presentaban valores similares al producto fresco y en cualquier caso mejores que las congeladas. Los resultados obtenidos indican el potencial de los PEF como un nuevo sistema para destruir *Anisakis* en pescado sin afectar a su calidad.

2. ABSTRACT

Anisakis larvae are capable of causing parasitic infections in humans due to the consumption of parasitized fishery products and subjected to insufficient treatments for the inactivation of the parasite. These give rise to intestinal syndromes among other symptoms in addition to possible allergic reactions. They are widely distributed with parasitization rates of 100% in some species and fishing areas such as hake caught in the North Atlantic. Among the strategies that exist for the inactivation of the parasite are the Pulsed Electric Fields (PEF) a little researched technology whose impact on the shelf life in this product is unknown.

This work focuses on the evaluation of the impact of different PEF treatments capable of inactivating *Anisakis* on the shelf life of hake fillets packed in protective atmospheres, as well as the evaluation of quality during storage.

The application of the PEF (4,5 kV/cm and 20 kJ/kg), which allowed an inactivation of more than 80% of *Anisakis*, did not affect the development of the microbiota present in hake fillets stored in refrigeration and protective atmosphere. After the evaluation of different quality parameters during the shelf life, it was determined that the samples treated by PEF presented similar values

to the fresh product and in any case better than the frozen ones. The results obtained indicate the potential of PEF as a new system to destroy *Anisakis* in fish without affecting its quality.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANISAKIS spp.

Anisakis spp. es el género de parásitos nemátodos pertenecientes a la familia *Anisakidae* en el que se encuentra *Anisakis simplex*, la especie más importante debido a su implicación como agente causal de infestaciones en el ser humano. El consumo del parásito vivo causa una infección gastrointestinal denominada anisakiasis, además de posibles reacciones alérgicas. En cuanto a la morfología de los anisákitos, estos se caracterizan por un cuerpo vermiforme de sección redondeada, sin segmentación y acabados en extremos puntiagudos y estriados (Figura 3.1). Las larvas L3 de *A. simplex* son de color blanquecino o pardo en el caso de que se encuentren encapsuladas en el tejido muscular de los peces. Presentan una longitud variable de 18 a 36 milímetros y un diámetro de 0,24 a 0,6 milímetros. Dentro de su estructura se diferencia: cutícula exterior, hipodermis, sistemas musculares y los sistemas nervioso, excretor y digestivo. La cutícula está formada por tres regiones diferentes, donde la zona más superficial se basa en una capa de naturaleza lipídica. Tras esta región, se encuentra la formada por colágeno, queratina y en menor proporción polifenoloxidases y quinonas. Por último, la matriz de la cutícula compuesta por albúmina, proteínas fibrosas y pequeñas cantidades de glúcidos, lípidos y enzimas esterasas (Gago *et al.*, 2007).



Figura 3.1. Larvas de *A. simplex* L3 extraídas de ventrescas de merluza (*Merluccius merluccius*).

El ciclo biológico de los anisákitos ilustrado en la Figura 3.2., consta de cuatro estadios larvales y un estadio adulto. Los dos primeros estadios larvales, L1 y L2, se dan en el interior de los huevos expulsados al mar a través de las heces de los hospedadores definitivos. En el tercer estadio larvario, los huevos eclosionan liberando las larvas L3. Estas son capaces de infestar a crustáceos del plancton marino, constituyendo el primer hospedador intermediario. Estos crustáceos infestados son consumidos por peces marinos y cefalópodos, lo que les convierte en

hospedadores intermedios. Finalmente, los grandes mamíferos marinos, que se alimentan de peces marinos y cefalópodos, son sus hospedadores definitivos donde *A. simplex* completa su último estadio larvario L4 y alcanza el estadio adulto. El ser humano se convierte en hospedador accidental debido al consumo de hospedadores intermedios, pescados marinos y cefalópodos, infestados por larvas de *Anisakis simplex* L3 (Gago *et al.*, 2007). Sin embargo, en el ser humano, no se completa el último estadio larval L4 (Olivares Ponce, 2012).

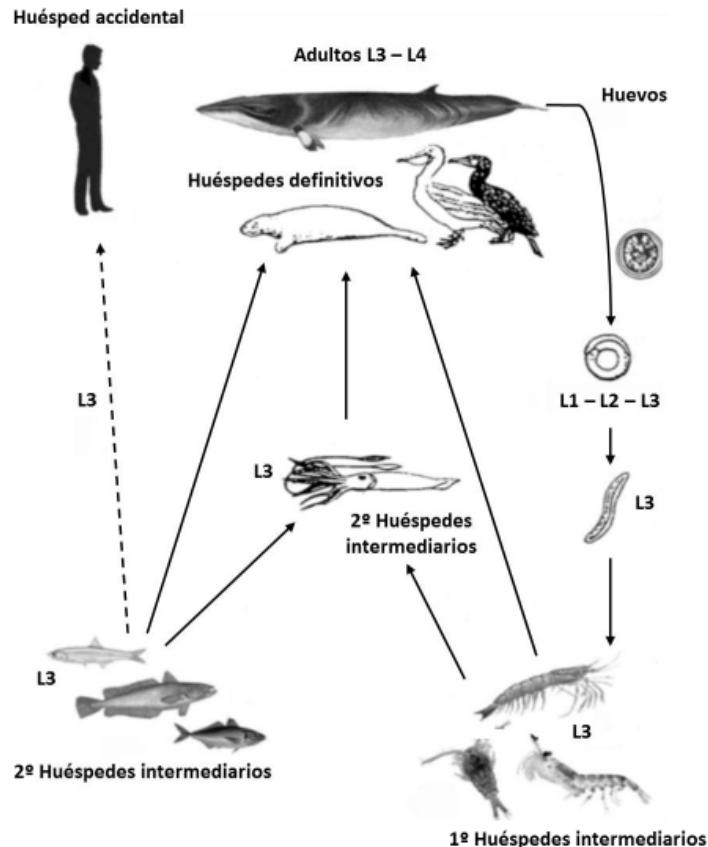


Figura 3.2. Ciclo biológico de *Anisakis* spp. (Levsen y Lunestad, 2010).

3.1.1. Distribución geográfica

Las especies del género *Anisakis* se encuentran distribuidas por todo el mundo (Olivares Ponce, 2012). En España, el 36% del pescado capturado y muestreado se encuentra parasitado por *Anisakis* spp. Los pescados procedentes del mar Cantábrico tienen una frecuencia mayor de parasitación alcanzando cifras cercanas al 50% frente al 6% que supone para los capturados en el mar Mediterráneo.

La prevalencia de parasitación varía en función de las especies analizadas, la prevalencia de larvas de *Anisakis simplex* en merluzas (*Merluccius* spp.) capturadas en la zona de Galicia, costa mediterránea de España y la costa portuguesa alcanzan tasas de parasitación del 100%. Otras

especies, con altas tasas de prevalencia de entorno al 70% son la caballa (*Scomber scombrus*) y el rape (*Lophius piscatorius*) en la zona de Galicia (Olivares Ponce, 2012; EFSA, 2010).

El incremento de la temperatura de los océanos y mares debido al cambio climático constituye un efecto potencial de la distribución geográfica de género *Anisakis*. Según Kliment y Palm (2011), esto ha provocado que hospedadores intermedios y definitivos se desplacen geográficamente, aumentando la presencia de ciertas especies del género *Anisakis* en el Pacífico y norte del Atlántico.

3.1.2. Problemática

La presencia de larvas de *Anisakis* spp. compromete la calidad y la inocuidad de los productos pesqueros, siendo un motivo de preocupación para consumidores, autoridades oficiales de control e industrias pesqueras. Han dado lugar a importantes pérdidas económicas e incluso alarmas sociales como “la crisis de los nemátodos” en Alemania en 1987 (Bao *et al.*, 2019).

En la actualidad, la presencia de larvas L3 se detecta en la mayoría de las especies marinas consumidas en España, siendo su prevalencia en las lonjas de entre un 25% y un 80%. Este valor es superior en especies como la merluza (*Merluccius merluccius*) capturadas en el Atlántico Norte con prevalencias de larvas L3 en el 100% de los pescados capturados (Olivares Ponce, 2012).

La anisakiasis es una enfermedad presente a nivel global. La proliferación de la comercialización del pescado y su consumo crudo podría ser el motivo del aumento de los casos (Lymbery y Walters, 2014). En España, la anisakiasis es una de las enfermedades causadas por nematodos más comunes, cuya prevalencia varía entre 0,43% hasta 22% según la región (Puente *et al.*, 2008). Se ha indicado que en nuestro país se producen cerca de 8000 casos al año siendo el país europeo con mayor incidencia (Puente *et al.*, 2008). Esta enfermedad zoonótica se produce debido al consumo de pescado infestado con larvas en estadio L3 sin un tratamiento previo que inactive el parásito, lo que provoca síntomas gastrointestinales. Además de la infestación, el consumo de pescado parasitado con estas larvas también puede provocar otros efectos adversos como la anisakiasis gastroalérgica y la alergia a *Anisakis*.

La anisakiasis gastroalérgica consiste en la suma de la afección gastrointestinal propia del consumo del parásito vivo junto con la reacción alérgica debido a la una reacción de hipersensibilidad mediada por inmunoglobulinas E a proteínas del parásito (Olivares Ponce, 2012).

3.1.3. Métodos convencionales de inactivación de *Anisakis* spp.

Congelación.

La congelación es el método más eficaz y seguro para la inactivación de los anisákitos. Estos no son viables a temperaturas inferiores a -20 °C. Por ello, la legislación europea indica que, para aquellos productos de la pesca destinados al consumo crudo o sin un tratamiento térmico que garantice la muerte del parásito, deben mantenerse en congelación a una temperatura inferior o igual a -20 °C en el centro térmico durante un periodo de 24 horas o bien una temperatura igual o inferior a -35 °C en el centro térmico durante un periodo de 15 horas. La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) recomienda a los consumidores prolongar el periodo de almacenamiento a -20 °C al menos 5 días (Reglamento (CE) nº 853/2004; AESAN, 2021).

A pesar de que la congelación es un tratamiento eficaz frente a la inactivación del parásito, no permite la eliminación de las larvas por lo que no reduce la capacidad de producir reacciones alérgicas en el consumidor. Un informe reciente elaborado por el Comité Científico de la AESAN indica que no existen evidencias clínicas que afirmen que el parásito muerto represente un peligro para los consumidores alérgicos. A pesar de ello, no se puede descartar totalmente el riesgo en todas las personas sensibilizadas al alérgeno (AECOSAN, 2016). Por ello, las estrategias de inactivación del parásito repercutirían positivamente para todos los consumidores.

A su vez, la congelación es obligatoria en tratamientos como marinados y escabechados donde a pesar de la reducción significativa del riesgo, no se garantiza la inactivación de anisákitos (AESAN, 2007).

Aunque la congelación es un tratamiento eficaz, repercute en la calidad del pescado debido a la formación de cristales de hielo durante la congelación que deterioran la calidad del pescado. Además, durante la descongelación, los cristales de agua formados se derriten y el tejido dañado no es capaz de reabsorber toda el agua produciendo el ablandamiento de la textura y pérdidas por goteo (Nakazawa y Okazaki, 2020).

Tratamiento térmico.

Las larvas de *Anisakis* no son termorresistentes. El Reglamento (CE) nº 853/2004 establece un tratamiento de 60 °C en el centro del producto durante 1 minuto para garantizar la inactivación de estas. Se debe tener en cuenta el espesor del filete de pescado, necesitando de 10 a 12 minutos por pulgada de grosor (2,54 cm). Otros tratamientos como el ahumado resultan suficientes si se realizan en caliente superando los 62,8 °C (Gago *et al.*, 2020).

3.2. PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

El tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF del inglés, Pulsed Electric Fields) consiste en la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad ($> 0,1 \text{ kV/cm}$) a un producto colocado entre dos electrodos, sumergido en una solución acuosa, de forma intermitente aplicando pulsos de corta duración (del orden de mili a microsegundos) (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2001).

Aunque se considera una tecnología no térmica, la energía generada con los pulsos produce un calentamiento óhmico que repercute incrementando la temperatura del producto por lo que es necesario un sistema de enfriamiento. Dependiendo de la intensidad del calentamiento podría afectar a moléculas termosensibles como las proteínas repercutiendo en la calidad de las muestras de pescado (Nowosad *et al.*, 2020).

La tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje produce cambios estructurales en las membranas celulares formando poros, lo que se traduce en un aumento de la permeabilidad a iones y moléculas, fenómeno conocido como electroporación.

La teoría más aceptada para explicar el fenómeno de la **electroporación** es el modelo propuesto por Zimmerman, Pilwar y Riemann (1974). En dicho modelo electromecánico consideran la célula como un condensador esférico en cuyo interior la membrana celular posee un potencial transmembrana debido a la diferencia entre la constante dieléctrica del interior celular y de la del medio en el que se encuentra. Al aplicar campos de energía externos se produce un acúmulo de cargas a ambos lados de la membrana celular, por lo que dicho potencial aumenta. El incremento de cargas de diferente signo provoca la atracción de cargas provocando la compresión de la membrana celular. Cuando el campo eléctrico aplicado genera un potencial transmembrana de aproximadamente un 1 V, se produce la formación de poros. Según la intensidad del tratamiento pueden ser reversibles o irreversibles. De forma general, en la industria alimentaria se realiza la electroporación irreversible de las membranas celulares, concretamente de la membrana citoplasmática.

Para la aplicación de PEF, es necesario un generador de pulsos que transforme la corriente eléctrica en voltajes de distinta potencia (kilovoltios) para descargarlos de forma intermitente, durante intervalos de tiempo muy pequeños (micro o milisegundos) en la cámara de tratamiento. Aunque existen numerosas configuraciones, las cámaras de tratamiento consisten en dos electrodos de acero inoxidable separados por un material aislante a una determinada distancia. Uno de los electrodos se conecta al generador de PEF y el otro a tierra. La disposición de los electrodos forma un cubículo en el que se introduce el producto junto con una solución acuosa con una determinada conductividad eléctrica.

El tratamiento de PEF se caracteriza por una serie de **parámetros** fundamentales que son la intensidad de campo eléctrico, la anchura y forma de pulso, el tiempo de tratamiento, la energía específica por pulso, el número de pulsos y la frecuencia de aplicación (Raso *et al.*, 1999).

Intensidad del campo eléctrico (E): Se define como la diferencia de potencial (V) generada entre los electrodos dividido por la distancia de estos (d). De forma general, los valores de este parámetro se encuentran entre 0,1 y 30 kV/cm según la aplicación (Álvarez, Condón y Raso, 2006).

$$E = \frac{V}{d} \quad (\text{ecuación 1})$$

Anchura y forma de pulso: Existen fundamentalmente dos tipos de forma de pulso: caída exponencial y onda cuadrada. Los primeros se caracterizan por un rápido incremento del voltaje que disminuye lentamente hasta alcanzar el valor de cero voltios. Por otro lado, los pulsos de onda cuadrada son aquellos en los que tras el incremento rápido del voltaje generado la diferencia de potencial se mantiene durante un determinado período de tiempo para descender rápidamente. La utilización de estos es la más adecuada ya que toda la energía eléctrica se aplica con el voltaje seleccionado. Además, permiten controlar de mejor manera el tiempo de tratamiento y la energía aplicada.

La anchura de los pulsos (τ) de onda cuadrada se corresponde con la duración del pulso, es decir, el tiempo en el que la diferencia de potencial aplicada por los electrodos se mantiene constante. Las anchuras utilizadas son del orden de microsegundos a milisegundos (Raso *et al.*, 1999).

Tiempo de tratamiento (t): Se trata del tiempo total efectivo en el que se aplica el campo eléctrico. Es el resultado de la multiplicación del número total de pulsos (n) por la anchura de estos, es decir su duración.

$$t = n\tau \quad (\text{ecuación 2})$$

Energía específica por pulso: La aplicación de campos eléctricos genera una corriente eléctrica que circula a través del producto generando un calentamiento óhmico por efecto Joule. La energía específica de pulso (W) aplicada al producto se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$W = \frac{1}{m} \int_0^{\infty} \sigma \cdot E_t^2 \cdot dt \quad (\text{ecuación 3})$$

donde m es la masa del producto (kg); σ es la conductividad eléctrica del medio de tratamiento (S/m); E es la intensidad del campo eléctrico aplicado (V/m); y dt el diferencial del tiempo (s) durante el que se aplica el campo eléctrico.

Frecuencia: Representa el número de pulsos que se aplican por unidad de tiempo, oscilando entre 1 y 5000 Hz.

3.3. PEF Y ANISAKIS

A pesar de las aplicaciones potenciales de los pulsos eléctricos en la industria alimentaria, el uso de estos como alternativa a la congelación para la inactivación de *Anisakis* spp. apenas se ha estudiado.

La alternativa más segura para la inactivación de *Anisakis* spp. es la congelación cuando se habla de pescado sin cocinar. Esta técnica como ya se ha mencionado repercute en la calidad del pescado y supone un gasto energético elevado. Por ello, se hace necesaria la investigación para la aplicación de nuevas tecnologías que no interfieran en la calidad y garanticen la inactivación del parásito.

Hasta el momento, tan solo se encuentran publicados dos estudios acerca del tratamiento PEF para la inactivación de larvas L3 en pescado. En el primero de ellos, Onitsuka *et al.* (2022) mediante la introducción artificial de larvas L3 de *Anisakis* en filetes de caballa (*Trachurus japonicus*) estudiaron la eficacia letal de diferentes condiciones de tratamiento de PEF. Los autores estudiaron la dependencia del número de pulsos aplicados en la inmovilización y, por tanto, en la inactivación de los anisákitos (la prueba de la no movilidad se considera una medida indirecta de la inactivación de la larva). Además, estudiaron la influencia de la conductividad eléctrica del medio acuoso de tratamiento para optimizar el tratamiento de PEF. Los autores concluyeron que el porcentaje de inmovilización del parásito incrementaba con el número de pulsos aplicados, así como con la conductividad. Los resultados del estudio resultaron prometedores alcanzando el 100% de inactivación de las larvas sin apenas afectar a la calidad del producto, aunque el tratamiento aplicado no queda del todo explicado. Según el estudio, aplicaron tratamientos de 1 kV/cm y unos 400-500 pulsos de 7 kJ energía y 1 Hz de frecuencia. Este tratamiento sería de 600-700 kJ/kg aplicado en un periodo de 10 minutos lo que repercutiría en la calidad del pescado debido al incremento de la temperatura. No obstante, los autores evaluaron el impacto de la calidad con análisis de textura, color y un análisis sensorial. El resultado de la evaluación sensorial clasificó las muestras pulsadas ligeramente por debajo del control lo que indicaba que la calidad se mantenía. El análisis del color lo realizaron utilizando la escala CIELAB, obteniendo resultados inconclusos. En cuanto al análisis de textura, evaluaron el modo elástico y la carga de rotura. Según el estudio, los filetes control y los tratados con PEF eran similares mientras que los filetes congelados obtuvieron medidas menores en ambos parámetros.

Recientemente en el estudio llevado a cabo por Abad *et al.* (2023), se desarrolló una ecuación matemática capaz de predecir el número de larvas que sobrevivirían al tratamiento PEF según las condiciones aplicadas a las larvas en agua salina. Esta ecuación se validó con los datos de inactivación obtenidos de trozos de merluzas parasitadas artificialmente. Introduciendo en la

ecuación diferentes intensidades de campo eléctrico, energía y anchuras de pulso, permite conocer la letalidad del tratamiento aplicado. Además, se evaluó la calidad de las muestras tratadas obteniendo resultados prometedores frente a la congelación, es decir con un menor impacto en parámetros de calidad como la capacidad de retención de agua y las pérdidas tras el cocinado que la congelación y descongelación del pescado.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El incremento de la prevalencia de larvas de *Anisakis* spp. en pescados marinos junto con las pérdidas de calidad asociadas a los tratamientos convencionales para la inactivación de las larvas (congelación y tratamiento térmico) hace necesaria la búsqueda de nuevas tecnologías capaces de inactivar el parásito asegurando una óptima calidad del producto.

Los prometedores resultados publicados acerca de la tecnología de PEF para la inactivación de larvas L3 de *Anisakis* en pescado junto con un aparente bajo impacto en la calidad de las muestras tratadas, la posicionan como una potencial alternativa a la congelación.

Hasta el momento, se ha estudiado la posibilidad de implantar dicha tecnología con la finalidad de inactivar las larvas estudiando la letalidad de diferentes tratamientos PEF. No obstante, se desconoce el efecto que el tratamiento PEF pueda producir en la vida útil del pescado.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo consiste en la evaluación del impacto de tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje letales para *Anisakis* en la vida útil de filetes de merluza envasados en atmósferas protectoras. Para alcanzar este objetivo principal se han desarrollado los siguientes objetivos parciales:

1. Comprobar experimentalmente la eficacia letal de distintos tratamientos PEF frente a las larvas en trozos de merluza.
2. Estudiar el efecto de la conductividad eléctrica sobre la letalidad de las larvas en trozos de merluza.
3. Evaluar el impacto del tratamiento PEF en la evolución de la microbiota presente en los filetes de merluza almacenados en atmósferas protectoras.
4. Evaluar el impacto de los tratamientos PEF en la calidad del pescado durante la vida útil.

5. METODOLOGÍA

5.1. MATERIA PRIMA

Para llevar a cabo las pruebas de letalidad con diferentes intensidades de campo eléctrico y conductividad eléctrica en el tratamiento PEF, se utilizaron lomos y ventrescas de merluza (*Merluccius merluccius*) suministradas por la empresa Scanfisk Seafood S.L.

El estudio microbiológico a escala de laboratorio se realizó con filetes de merluza adquiridos en supermercado local mientras que el estudio realizado a escala de planta piloto se realizó con filetes de merluza suministrados por la empresa Scanfisk Seafood S.L. (Figura 5.1). Las piezas se transportaron en sistemas portátiles de refrigeración con hielo picado y se almacenaron en la cámara de refrigeración a 4 °C.

Para la realización de las pruebas de calidad durante la vida útil, se emplearon lomos de merluza adquiridos en supermercado local. Se transportaron en sistemas portátiles de refrigeración con hielo picado y se almacenaron en la cámara de refrigeración a 4 °C.



Figura 5.1. Lomos de merluza (*Merluccius merluccius*) utilizados en el estudio microbiológico.

5.2. TRATAMIENTOS DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

Con el fin de seleccionar un tratamiento de PEF capaz de inactivar las larvas, se aplicaron distintos campos eléctricos a trozos de merluza de 4,5 cm x 2,5 cm parasitados artificialmente con 10 larvas de *Anisakis* spp. Previamente, se comprobaba la viabilidad de las larvas mediante la técnica de estimulación mecánica recomendada por la European Food Safety Authority (EFSA, 2010). En dicha técnica, se considera que las larvas están vivas si al estimularlas mecánicamente con pinzas estas se mueven. Las larvas se colocaron en el interior del músculo de pescado tras la realización de un corte por la mitad y tras ello se ataron con una cuerda (Figura 5.2.1). Cada trozo, se introdujo en la cámara de tratamiento PEF de electrodos paralelos de acero inoxidable de dimensiones 6 cm x 5 cm x 6 cm, siendo 5 cm la distancia entre los electrodos.



Figura 5.2.1. Cubo de merluza parasitado artificialmente en cámara de tratamiento.

El equipo de generación de pulsos utilizado a escala de laboratorio fue el VITAVE Tech (Modletice, República Checa) (Figura 5.2.2.). Este equipo es un generador capaz de aplicar pulsos de onda cuadrada de hasta 32 μ s, con una frecuencia de hasta 32000 Hz. La tensión y la intensidad máxima de salida son 20 kV y 500 A, respectivamente. El control de los parámetros de procesado (voltaje de carga, anchura de pulso, número de pulsos y frecuencia) se realiza a través de la pantalla táctil. Se aplicaron tratamientos PEF de distinto campo eléctrico (1, 2, 3, 4 y 5 kV/cm) de 30 μ s de anchura de pulso y 20 kJ/kg de energía específica. Tras el tratamiento, se trajeron las larvas y se determinó su supervivencia mediante la técnica de estimulación mecánica.

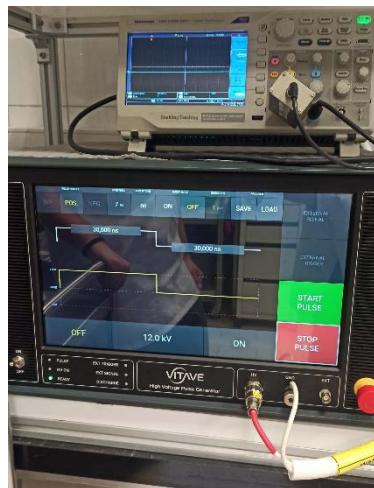


Figura 5.2.2. Equipo VITAVE Tech.

Por otro lado, se trataron trozos de ventrescas parasitadas de tamaño 4,5 cm x 2,5 cm. En estas muestras la viabilidad de las larvas se comprobaba únicamente tras el tratamiento PEF, momento en el cual se extraían las larvas.

A escala de planta piloto se utilizó el equipo PEFPilotTM Dual (Quakenbrück, Alemania). Este equipo genera pulsos de onda cuadrada de 7 μ s de anchura de hasta 24 kV de voltaje, con una frecuencia máxima de 500 Hz (Figura 5.2.3). Se aplicaron pulsos a distintos campos

eléctricos (1,2 y 3 kV/cm) y energías específicas (20 y 40 kJ/kg). Este equipo permitía el tratamiento de piezas de mayor tamaño debido a las dimensiones de la cámara de tratamiento utilizada (10 cm x 8 cm x 10 cm) con 8 cm de distancia entre los electrodos.



Figura 5.2.3. Imagen del equipo PEFPilot™ Dual (izquierda) y cámara de tratamiento (derecha).

A su vez, se realizaron tratamientos PEF en distintos rangos de conductividad eléctrica para estudiar su efecto sobre la supervivencia de las larvas. A escala de laboratorio con un campo eléctrico de 1 kV/cm, 20 kJ/kg de energía específica y 30 µs de anchura de pulso se estudió el efecto de la conductividad eléctrica de la solución acuosa en la supervivencia de las larvas L3. La conductividad eléctrica de la solución salina se medía a temperatura ambiente con una sonda de conductividad eléctrica (Almemo FYA641LF series, Alhborn, Alemania). Las soluciones acuosas se prepararon añadiendo NaCl al agua de la cámara de tratamiento y tenían las siguientes conductividades: 1,3, 3 y 5,4 mS/cm.

A escala de planta piloto, también se evaluó el efecto de este parámetro. Para ello, se trabajó con las máximas capacidades que permitía el equipo (3 kV/cm y 7 µs) en base de las conductividades eléctricas investigadas. Se estudiaron diferentes energías específicas y conductividades eléctricas desde la conductividad del agua 0,4 mS/cm hasta 8 mS/cm. Para ello, de igual manera que en el laboratorio se añadían cantidades crecientes de NaCl al agua y se medía la conductividad mediante una sonda de conductividad eléctrica.

5.3. ESTUDIO DEL IMPACTO DE LOS PEF SOBRE LA MICROBIOTA DEL PESCADO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN

Una vez determinadas las condiciones de tratamiento PEF capaces de inactivar las larvas de *Anisakis* spp., se llevó a cabo un estudio microbiológico a lo largo de su almacenamiento en refrigeración a 4 °C en atmósfera protectora. El estudio se realizó con muestras tratadas con la tecnología PEF y muestras sin pulsar con el fin de comprobar si la tecnología de pulsos afectaba

a la microbiota del pescado durante su almacenamiento. A su vez se envasaron muestras pulsadas y control en atmósferas modificadas (50% N₂, 50% CO₂) utilizando la envasadora termoselladora (ULMA SMART-400, Oñati, España).

Para realizar el estudio del efecto de los PEF a escala de laboratorio, se pulsaron muestras de pescado con campos eléctricos de 4 kV/cm y 4,5 kV/cm de 20 kJ/kg de energía y 30 µs de anchura de pulso con una conductividad eléctrica del medio acuoso de 1 mS/cm. Las muestras no tratadas (control) se introducían de igual manera en la cámara de tratamiento durante el mismo tiempo. Tras ello, se envasaron muestras control y muestras pulsadas en atmósferas modificadas y se almacenaron en refrigeración a 4,9 ± 0,4 °C. Se realizaron 7 puntos de control para ambos campos eléctricos, (día 0, 2, 5, 8, 11 y 14) para las muestras pulsadas con un campo eléctrico de 4 kV/cm y para las pulsadas a 4,5 kV/cm (día 0, 2, 4, 7, 10 y 14).

Para realizar el análisis microbiológico, en condiciones de esterilidad, se tomaron aproximadamente 3 gramos de muestra y se introdujeron junto con 27 ml de agua de peptona tamponada estéril (APT, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) en bolsas de plástico estériles de Stomacher (VWR, Radnor, EE. UU.). Se homogeneizaban durante 60 segundos a 230 rpm en el Stomacher® 400 Circulator (Sweard, Worthing, Reino Unido). Tras la homogenización, se vertía en un bote estéril y a partir de ésta se preparaban las diluciones y se adicionaba 0,1 mL en la superficie de las placas de Petri con el correspondiente medio de cultivo para los recuentos por extensión en superficie y 1 mL para los recuentos por homogenización en masa.

A escala de planta piloto, se aplicaron pulsos eléctricos de 3 kV/cm de campo eléctrico, 20 kJ/kg de energía y 7 µs de anchura de pulso. Se realizaron dos estudios, uno de ellos con la conductividad del agua (0,4 mS/cm) y el otro con una conductividad eléctrica de 8 mS/cm para estudiar la influencia de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento en el desarrollo de la microbiota. Se realizaron cinco puntos de control para ambos estudios (día 0, 2, 4, 6, 8) ya que la empresa Scanfisk Seafood S.L. comunicó que estimaban una vida útil de 7 días en los filetes envasados en atmósferas protectoras. El equipo PEF utilizado permitía el tratamiento de muestras de mayor tamaño, por lo que de cada muestra se tomaron 25 gramos que se introducían en bolsas de Stomacher (VWR, Radnor, EE UU.) junto con 225 mL de agua de peptona tamponada estéril (APT, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Tras 1 minuto de homogenización a 230 rpm, se vertía en un bote estéril y se preparaban las diluciones con agua de peptona estéril. Se adicionaba 0,1 mL en la superficie de las placas en el caso de los recuentos en superficie y 1 mL para los recuentos por homogenización en masa.

Los grupos microbianos estudiados y sus condiciones de incubación se muestran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Condiciones de incubación de los diferentes grupos microbianos estudiados.

Grupo microbiano	Agar	T [°] C	Tiempo	Atmósfera	Siembra
Psicrótrofos aerobios	Agar LH ¹	7 °C	10 días	Aerobia	S*
Psicrótrofos anaerobios	Agar LH ¹	7 °C	10 días	Anaerobia	S
<i>Pseudomonas</i>	Agar GSP ²	25 °C	24-48 horas	Aerobia	S
<i>Shewanella</i>	Agar Iron ³	25 °C	3 - 4 días	Aerobia	S
Bacterias ácido-lácticas	Agar Elliker ⁴	25 °C	24-48 horas	Aerobia	HM**
F ^a <i>Enterobacteriaceae</i>	Agar VRBG ⁵	37 °C	48 horas	Aerobia	S

*S: extensión en superficie; **HM: homogenización en masa.

¹La preparación de 1 litro agar Long and Hammer (LH) requiere de la mezcla de varios componentes: 20 gramos de Proteasa-Peptona (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), 40 gramos de gelatina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), 1 gramo de K₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), 10 gramos de NaCl (Panreac AppliCheam, Barcelona, España), 15 gramos de agar técnico (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y 0,25 gramos de citrato de amonio e hierro (III) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

²Agar Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) más Penicilina G (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

³Agar Iron (Conda, Madrid, España).

⁴Caldo Elliker (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) más 16 g/L de agar bacteriológico (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).

⁵Agar Violet Red Bile Glucose (VRBG) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), se aplica una doble capa tras la siembra del inóculo.

Tras la incubación, se llevaba a cabo el recuento de las colonias de las placas con un analizador de imagen (Image Analyzer Automatic Colony Counter, Protos, Synoptics, Cambridge, Reino Unido).

5.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN

Debido a la complejidad de la evaluación de la calidad del pescado, en este trabajo, se evaluó el impacto del tratamiento de PEF sobre las pérdidas por goteo, la humedad, la capacidad de retención de agua y las pérdidas de cocinado durante el almacenamiento a escala de laboratorio en refrigeración a 4 °C y con atmósfera protectora (50% CO₂ / 50% N₂), de piezas de pescado de unos 20 gramos, tomando como puntos de estudio los días 0, 4 y 7. Con la finalidad de comparar resultados, se evaluaron dichos parámetros en filetes de merluza no tratados (control), tratados

con PEF de 3 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs de anchura de pulso y con muestras descongeladas a 4 °C tras una congelación a -20 °C durante 5 días siguiendo las recomendaciones emitidas por AESAN a los consumidores.

5.4.1. Pérdidas por goteo

Se pesaron trozos de merluza de alrededor de 20 gramos procesados con cada tecnología para estimar las pérdidas de peso que hubieran podido tener las muestras antes y después de los tratamientos aplicados. Para ello se pesaron previamente el día 0 siendo este el valor P_i y se volvieron a pesar tras retirar la humedad exterior con un papel el día del análisis (P_f). Las pérdidas de peso se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Pérdidas de peso} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (\text{ecuación 4})$$

donde P_i es el peso inicial en gramos y P_f es el peso final en gramos.

5.4.2. Humedad

Se pesaron 7 muestras de cada tratamiento de aproximadamente 5 gramos por muestra y se introdujeron en una estufa a 105 °C durante 24 horas (Braña *et al.*, 2011). El contenido de humedad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (\text{ecuación 5})$$

donde P_i es el peso inicial de la muestra en gramos y P_f es el peso final en gramos de la muestra.

5.4.3. Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Para cada tratamiento, se prepararon 7 muestras de entre 5 y 6 gramos que se envolvieron en una gasa estéril. Cada muestra se introdujo en un tubo Falcon junto con perlas de vidrio. Los tubos se sometieron a una de centrifugación de 1300 rpm durante 15 minutos en un centrífuga (MEGAFUGE 1.0 R, Kendro, Alemania) y se volvió a pesar el pescado (Trout, 1988). Para calcular la CRA, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CRA} = 100 - \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \right) \quad (\text{ecuación 6})$$

donde P_i es el peso inicial en gramos y P_f es el peso final en gramos.

5.4.4. Pérdidas por cocinado (*Cook-loss*)

Para cada tratamiento, se prepararon 7 muestras de aproximadamente 5 gramos que se introdujeron en tubos Falcon y se sumergieron en agua hirviendo hasta alcanzar una temperatura de 75 °C en el interior de la muestra. Posteriormente, se recuperó la muestra y se

eliminó el agua superficial con papel. Tras ello, se volvieron a pesar las muestras (Honikel, 1998).

Para calcular las pérdidas por cocinado se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cook - loss} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (\text{ecuación 7})$$

donde P_i es el peso inicial en gramos y P_f es el peso final en gramos.

5.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Con la finalidad de estudiar la existencia de diferencias significativas entre los parámetros estudiados, se realizó un análisis estadístico entre los parámetros estudiados mediante Análisis de Varianza (*one-way ANOVA* con el post-test *Tukey*) cuando el número de muestras a comparar era superior a 2 y, para analizar datos de muestras diferentes dos a dos se utilizó el test t de Student. Para ello se utilizó el programa GraphPad PRISM® (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE. UU.). Las barras de error verticales de las figuras se corresponden con la desviación estándar de la media y las diferencias estadísticamente significativas se determinaron para un valor p de 0,05, indicado en las gráficas con diferentes letras. Las letras minúsculas representan las diferencias estadísticamente significativas para cada día en base a la tecnología y las mayúsculas las diferencias estadísticamente significativas para cada tecnología en función del periodo de almacenamiento.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de facilitar la lectura del trabajo, a continuación se van a presentar en primer lugar los resultados obtenidos a escala de laboratorio centrados en la inactivación de *Anisakis* mediante PEF en medios de distinta conductividad eléctrica y el efecto en la microbiota de la merluza tratada por PEF; y en segundo lugar los resultados obtenidos a escala de planta piloto de nuevo considerando el efecto de la conductividad eléctrica del medio y el impacto en la microbiota y calidad del pescado.

6.1. APLICACIÓN PEF A ESCALA DE LABORATORIO

6.1.1. Inactivación de *Anisakis* por PEF. Efecto del campo eléctrico y de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento.

La Figura 6.1.1.1 muestra el efecto del campo eléctrico en la inactivación de los anisákitos con tratamientos de PEF de 20 kJ/kg de energía específica y 30 µs de anchura de pulso. Como se observa, para un tratamiento de 1 kV/cm, la supervivencia de *Anisakis* se redujo al 40%, mientras que para un campo eléctrico de 5 kV/cm el porcentaje de inactivación fue mayor del 90%. De forma general, el porcentaje de supervivientes disminuyó al incrementar la intensidad del

campo eléctrico. Este nivel de inactivación observado hasta 3 kV/cm concuerda con los datos publicados por Abad *et al.* (2023) tratando los *Anisakis* directamente en solución salina de 1 mS/cm.

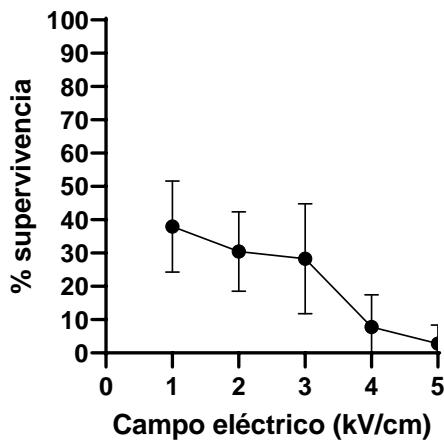


Figura 6.1.1.1. Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la supervivencia de *Anisakis* en trozos de merluza parasitados artificialmente aplicando PEF de 20 kJ/kg, 30 µs, en un medio de 1 mS/cm de conductividad eléctrica.

El mismo estudio se realizó con ventrescas parasitadas de forma natural. Los resultados se encuentran representados en la Figura 6.1.1.2. Como se observa, el porcentaje de supervivencia, aplicando pulsos eléctricos con la misma anchura de pulso (30 µs) y energía (20 kJ/kg), es mayor en ventrescas que en pescado parasitado artificialmente. Para un campo eléctrico de 3 kV/cm el porcentaje de supervivencia de las larvas en ventrescas fue del 65% frente al 30% alcanzado en merluzas parasitadas artificialmente. Con un campo eléctrico de 5 kV/cm se alcanzó un 80% de inactivación de anisákitos frente al 98% obtenido mediante la parasitación artificial. Por otro lado, indicar que la anchura de los pulsos aplicados en el rango estudiado no afectó a la eficacia letal de los mismos.

Esta mayor resistencia de *Anisakis* en las ventrescas naturalmente parasitadas sería debido a que estas poseen una piel que actuaría como aislante protegiendo a los *Anisakis* de los PEF. Además, en los trozos de merluza parasitados artificialmente se eliminaba la piel y las fibras musculares resultaban dañadas debido al corte realizado en la manipulación para introducir los *Anisakis* por lo que el impacto de los pulsos sería mayor en la inactivación de las larvas.

Por otro lado, el elevado número de parásitos existentes en la ventresca en comparación con el pescado parasitado artificialmente (10 larvas L3) podría también producir un efecto protector como han observado con simulación numérica el grupo de investigación donde he realizado he realizado el TFG, determinándose menores intensidades del campo eléctrico cuando el número de parásitos es elevado (comunicación personal de Abad).

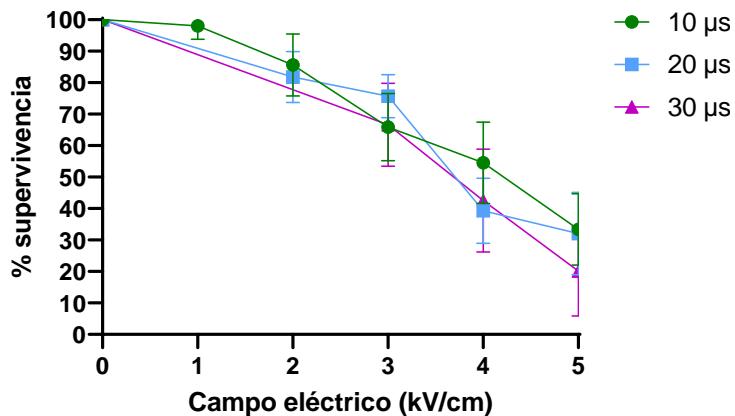


Figura 6.1.1.2. Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la supervivencia de *Anisakis* en ventrescas parasitadas de forma natural aplicando PEF de 20 kJ/kg de diferentes anchuras de pulso, en un medio de 1 mS/cm de conductividad eléctrica.

La Figura 6.1.1.3. muestra el efecto de la conductividad eléctrica en la inactivación de *Anisakis* en ventrescas. Este parámetro junto con la intensidad del campo eléctrico, resultan de gran importancia para la inactivación del parásito. Como se observa, la supervivencia de *Anisakis* fue menor conforme la conductividad del medio aumentaba aplicando el mismo tratamiento PEF. Estos resultados están alineados con los observados por Onitsuka *et al.* (2022) si bien en aquel estudio, la energía aplicada fue muy superior utilizando campos eléctricos de hasta 1 kV/cm, indicando la importancia de la conductividad eléctrica en este producto. Resultados preliminares obtenidos en el grupo de investigación donde he desarrollado el TFG utilizando simulación numérica con elementos finitos apuntan que, al aumentar la conductividad eléctrica del medio, el campo eléctrico que recibe el parásito es mayor que en el pescado o en el medio de tratamiento, lo que justificaría la mayor inactivación observada de *Anisakis* (comunicación personal de Abad).

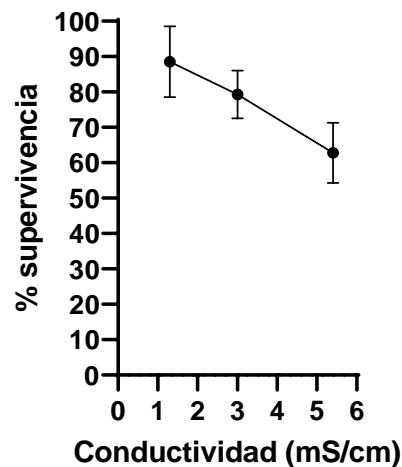


Figura 6.1.1.3. Influencia de la conductividad del medio acuoso en el porcentaje de supervivencia tras un tratamiento de 1 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs en ventrescas.

6.1.2. Evaluación de la microbiota de la merluza tratada por PEF a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.

Con el fin de no alargar el trabajo y a modo de ejemplo, solo se presentan los resultados correspondientes al tratamiento PEF de campo eléctrico 4 kV/cm debido a que los resultados obtenidos con el campo eléctrico de 4,5 kV/cm son similares. Para estos tratamientos la letalidad en ventresca sería del 60% y 70% respectivamente, como se ha presentado en la Figura 6.1.1.2. Las Figuras 6.1.2.1., 6.1.2.2., 6.1.2.3., 6.1.2.4. y 6.1.2.5. muestran la evolución de los distintos grupos microbianos investigados: microorganismos psicrótrofos aerobios y anaerobios, *Pseudomonas*, *Shewanella*, bacterias ácido-lácticas y enterobacterias, respectivamente, de trozos de merluza tratadas y no tratadas por PEF, almacenados en refrigeración y envasados o no en atmósfera protectora (50% CO₂ / 50% N₂). Como se observa en todos los grupos microbianos, el tratamiento PEF no afectó a los recuentos microbiológicos iniciales, observándose los mismos niveles iniciales de microbiota. Habría que destacar que, de forma general, estos valores fueron relativamente elevados en comparación con estudios similares (Antunes-Rohling *et al.*, 2019) probablemente debido a que la calidad microbiológica de la materia prima no era la más adecuada para el estudio. Por otro lado, dichos tratamientos PEF tampoco afectaron en la evolución de la microbiota durante el almacenamiento para ninguno de los grupos microbianos investigados. Por el contrario, el uso de atmósferas modificadas ralentizó la velocidad de crecimiento de la microbiota investigada durante el almacenamiento independientemente de haber aplicado o no PEF. Como se observa, el uso de atmósferas protectoras permitió reducir hasta casi 2 unidades logarítmicas la carga microbiana de la merluza en comparación a cuando no se utilizaron tras 10-14 días de almacenamiento. En el caso concreto de *Pseudomonas*, al ser un microorganismo aerobio estricto, el almacenamiento en la atmósfera modificada sin oxígeno limitó completamente su crecimiento como se puede observar en la Figura 6.1.2.3.

En resumen, los resultados indican que el tratamiento PEF aplicado que inactivaría el 60% de la población de *Anisakis* en ventrescas, no afectaría a la calidad microbiológica de la merluza y sería la atmósfera modificada la que controlara el crecimiento microbiano, permitiendo prolongar la vida útil del producto.

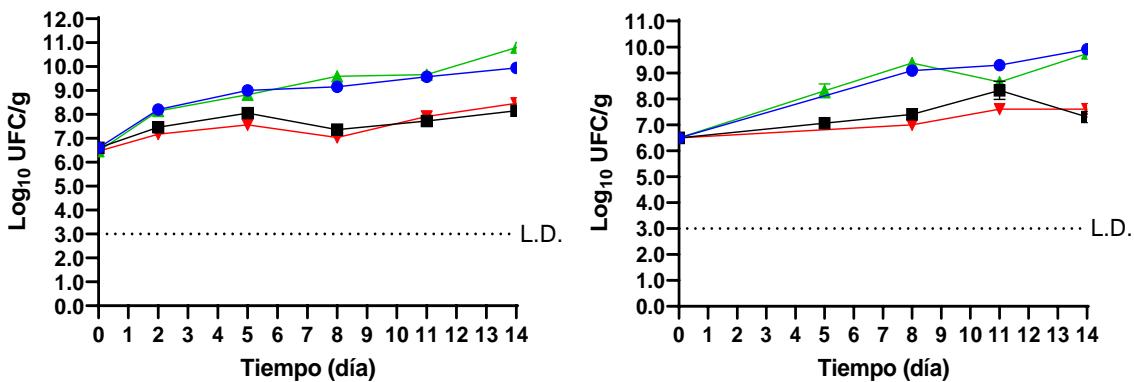


Figura 6.1.2.1. Evolución de microorganismos psicrótrofos aerobios (izquierda) y psicrótrofos anaerobios (derecha) durante el periodo de almacenamiento en refrigeración. Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) y envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

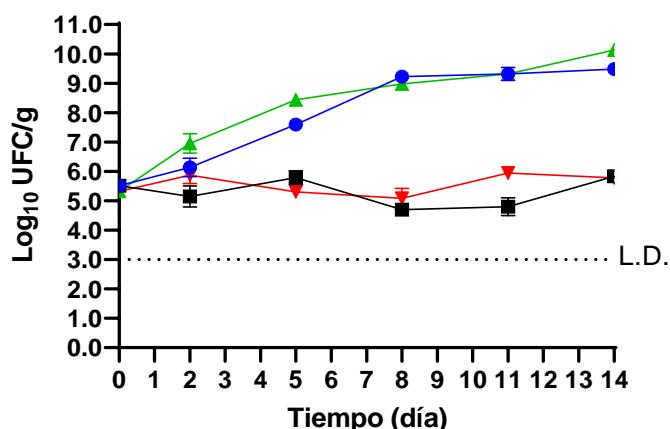


Figura 6.1.2.2. Evolución de *Pseudomonas* durante el periodo de almacenamiento en refrigeración. Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

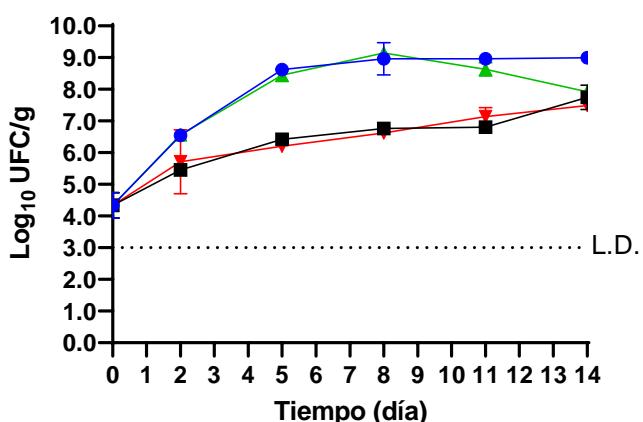


Figura 6.1.2.3. Evolución de *Shewanella* durante el periodo de almacenamiento en refrigeración. Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

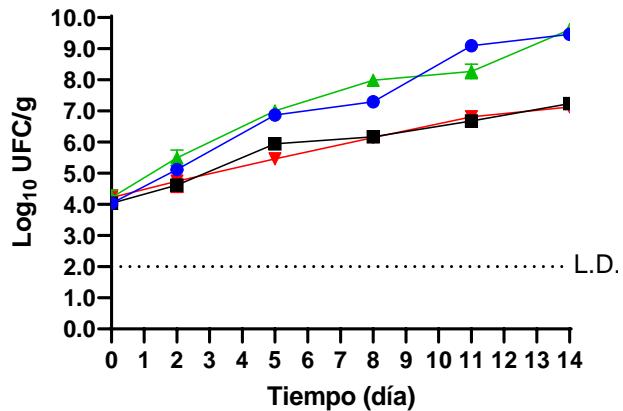


Figura 6.1.2.4. Evolución de bacterias ácido-lácticas durante el periodo de almacenamiento en refrigeración. Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) y envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

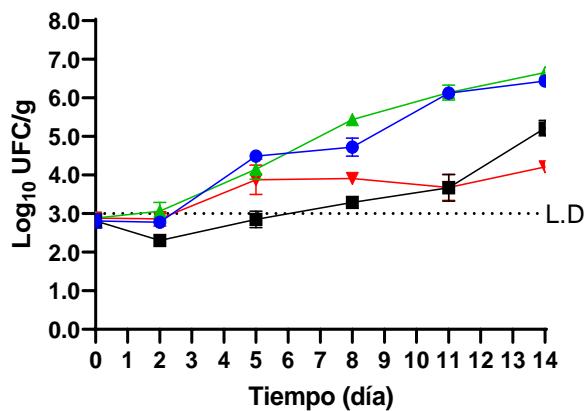


Figura 6.1.2.5. Evolución de enterobacterias durante el periodo de almacenamiento en refrigeración. Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) y envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (4 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

6.1.3. Evaluación de la calidad de la merluza tratada por PEF a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.

Con el fin de evaluar de forma indirecta el impacto de los tratamientos PEF en la calidad del pescado durante su almacenamiento en atmósferas protectoras en refrigeración, a continuación, se muestran los resultados sobre las pérdidas por goteo, la humedad, la capacidad de retención de agua (CRA) y las pérdidas tras el cocinado (CL) de muestras tratadas por PEF de 3 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs. Con el fin de comparar resultados se presentan los correspondientes a las muestras control sin tratar y a muestras congeladas y posteriormente descongeladas. Si bien se ha evaluado en el apartado anterior la evolución de la microbiota a 4 y 4,5 kV/cm, debido a una limitación del equipo, en este caso solo se pudieron aplicar tratamientos de 3 kV/cm.

6.1.3.1. Pérdidas por goteo.

La Figura 6.1.3.1. muestra las pérdidas de peso de los trozos de pescado por goteo de las muestras control y tratadas por PEF y congeladas/descongeladas durante su almacenamiento en refrigeración. En dicha figura, se observa que las pérdidas de peso debido a las pérdidas por goteo fueron superiores en las muestras congeladas y posteriormente descongeladas en todos los días analizados. Las muestras tratadas por PEF también presentaron mayores pérdidas respecto a los controles y estas fueron mucho menores con respecto a las congeladas.

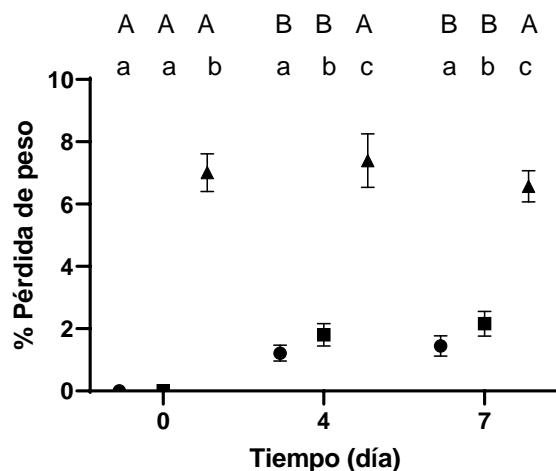


Figura 6.1.3.1. Pérdidas de peso de muestras control (●), tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 μ s) (■), congeladas/descongeladas (▲) durante el almacenamiento en refrigeración. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras del mismo día en base a la tecnología aplicada, y las mayúsculas diferencias en base al día de almacenamiento para una misma tecnología.

6.1.3.2. Humedad

La humedad es una medida esencial para saber cuánta agua tienen de partida lo trozos de pescado y para valorar si la electroporación que producen los PEF podría interferir en los resultados de CRA y CL. La Figura 6.1.3.2. muestra el porcentaje de humedad de las distintas muestras. Como se observa, de forma general, la humedad de las muestras disminuyó durante el periodo de almacenamiento para todos los tratamientos a excepción del día 7 para las muestras tratadas con PEF, pero no de forma estadísticamente significativa. La tendencia en la reducción de la humedad se debería a las pérdidas de agua que tiene el pescado a causa de su deterioro, como se ha observado en las pérdidas por goteo mostradas en la figura anterior. En el caso concreto de los tratamientos PEF (■), estos no afectaron a este parámetro de forma estadísticamente significativa si bien la variabilidad en los datos medidos fue elevada. Es decir, en el caso de producirse electroporación que se manifestase en una pérdida de agua, ésta no resultó ser significativa.

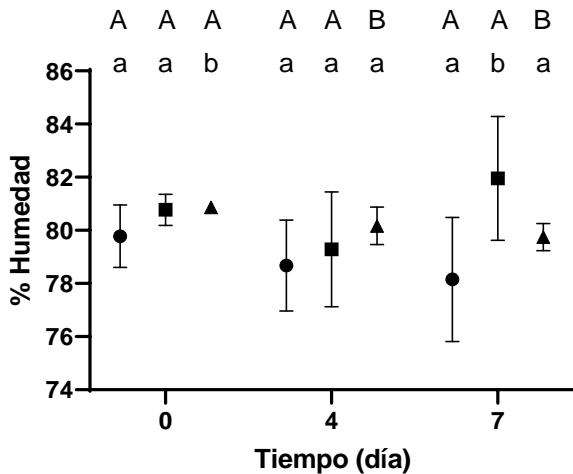


Figura 6.1.3.2. Humedad de las muestras control (●), tratada por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) (■) y congelada/descongelada (▲) de filetes de merluza. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras del mismo día en base a la tecnología aplicada, y las mayúsculas diferencias en base al día de almacenamiento para una misma tecnología.

6.1.3.3. Capacidad de Retención de Agua

La medida de la CRA indica la pérdida de la capacidad de retención de agua que sufre el pescado tras una centrifugación. La Figura 6.1.3.3. muestra la CRA de las distintas muestras en los distintos días de estudio. El comportamiento de los tratamientos PEF sobre este parámetro tiene diferencias significativas con respecto a las no tratadas. De forma general, las muestras tratadas por PEF presentaron durante todo el almacenamiento valores de CRA similares a las muestras control. Esto podría indicar que a pesar de aplicar tratamientos PEF que estarían produciendo la muerte de *Anisakis*, no estaría afectando significativamente a las células del tejido muscular del pescado. Estimaciones realizadas por simulación numérica apuntarían a esta hipótesis al determinarse campos eléctricos en el músculo del pescado inferiores a los que se alcanzarían en el *Anisakis* al aplicar el mismo campo eléctrico en la cámara de tratamiento debido a la diferente conductividad eléctrica entre el pescado y las larvas (comunicación personal Abad). Por otro lado, las muestras congeladas son las que más diferencia mostraron con el control el primer día de análisis, por lo tanto, la congelación afectaría más que los PEF en cuanto a la CRA, concordando estos resultados con los mostrados en la Figura 6.1.3.1. sobre las pérdidas por goteo. Finalmente, indicar que, durante el almacenamiento, la CRA del pescado congelado y posteriormente descongelado parecía aumentar, si bien esto podría deberse a que estos resultados podrían estar enmascarados con las mayores pérdidas de agua por goteo presentadas en estas muestras como se ha descrito.

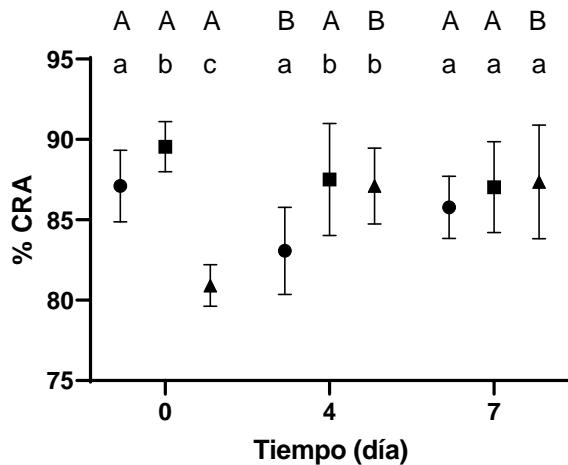


Figura 6.1.3.3. Capacidad de retención de agua de las muestras control (●), tratada por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 μ s) (■) y congelada/descongelada (▲) de filetes de merluza. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras del mismo día en base a la tecnología aplicada, y las mayúsculas diferencias en base al día de almacenamiento para una misma tecnología.

6.1.3.4. Pérdidas por cocción

Las pérdidas por cocinado permiten medir de forma indirecta el daño que sufren las proteínas tras los tratamientos aplicados y su posterior cocción. Al someter a los trozos de pescado a altas temperaturas hasta alcanzar en el interior del producto 75 °C, las proteínas afectadas por los diferentes tratamientos terminan de desnaturalizarse y no son capaces de retener el agua que contenían. La Figura 6.1.3.4. muestra las pérdidas por cocinado de las distintas muestras durante la vida útil. En este caso, los resultados son muy variables debido a las dificultades para recuperar la muestra tras la coagulación del pescado durante la cocción. Pese a no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre tecnologías en base al tiempo de almacenamiento, sí se puede apreciar que las pérdidas por cocinado son ligeramente superiores en el caso de la congelada en el primer día de estudio. Sin embargo, para las 3 tecnologías, las pérdidas por cocinado disminuyen durante el almacenamiento posiblemente debido a las pérdidas por goteo de las muestras.

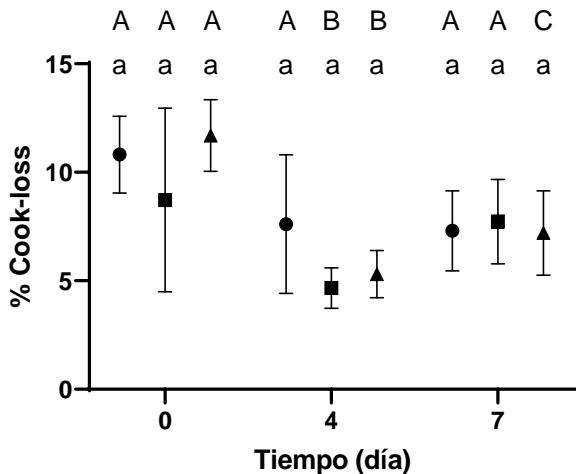


Figura 6.1.3.4. Pérdidas por el cocinado de las muestras control (●), tratada por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 µs) (■) y congelada/descongelada (▲) de filetes de merluza. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras del mismo día en base a la tecnología aplicada, y las mayúsculas diferencias en base al día de almacenamiento para una misma tecnología.

Como resumen de este apartado, se podría decir que los tratamientos PEF evaluados no afectaron de forma significativa a la calidad del pescado en comparación al pescado fresco, y siendo ligeramente superior al pescado que se había congelado y descongelado. Esto apuntaría a una calidad superior de las muestras PEF respecto a las congeladas. En cualquier caso, sería de interés evaluar el efecto de tratamientos de mayor intensidad de hasta 5 kV/cm en el impacto en la calidad.

6.2. APLICACIÓN PEF A ESCALA DE PLANTA PILOTO

6.2.1. Inactivación de *Anisakis* por PEF. Efecto del campo eléctrico y de la conductividad eléctrica del medio de tratamiento.

Una vez determinada la eficacia de los tratamientos a escala de laboratorio en músculo de pescado parasitado artificialmente y ventrescas, se tuvo la oportunidad de validar los resultados con un equipo de pulsos que permitía el tratamiento de muestras de mayor tamaño. En la Figura 6.2.1.1., se muestra la eficacia letal de varios tratamientos en ventrescas de merluza. Se aplicaron pulsos eléctricos de 7 µs de anchura de pulso a distintas intensidades del campo eléctrico y energía específica.

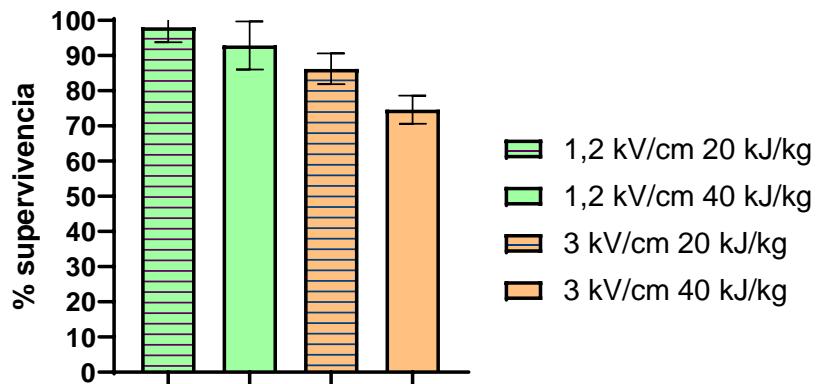


Figura 6.2.1.1. Influencia de la intensidad del campo eléctrico y la energía específica en la supervivencia de *Anisakis* en ventrescas de merluza.

Debido a las limitaciones del equipo relacionadas con la cámara de tratamiento que no permitía regular la distancia entre los electrodos no se pudieron alcanzar mayores intensidades de campo eléctrico. Pese a ello, se puede observar que el porcentaje de supervivientes disminuyó al aumentar el campo eléctrico y la energía específica. Con un campo eléctrico de 1,2 kV/cm y 20 kJ/kg de energía la supervivencia de *Anisakis* fue del 98% mientras que, con la misma energía, pero un campo eléctrico de 3 kV/cm la supervivencia de las larvas disminuyó hasta el 85%. Para un mismo campo eléctrico (3 kV/cm), la letalidad resultó superior con una energía específica de 40 kJ/kg alcanzado cifras de supervivencia del 75%. Estos resultados se alinean con los obtenidos a escala de laboratorio mostrados en la Figura 6.1.1.2. si bien la supervivencia en este caso fue ligeramente superior posiblemente debido a la menor anchura de pulsos aplicado que podría influir como indicó Abad *et al.* (2023) cuando las anchuras de pulso eran inferiores a 10 µs. La conductividad eléctrica como se ha descrito en las pruebas a escala de laboratorio es un parámetro importante en la inactivación de las larvas posiblemente debido al incremento de la intensidad del campo eléctrico sobre los *Anisakis* al aplicar PEF en medios de más alta conductividad eléctrica. En la Figura 6.2.1.2., se muestra la eficacia letal de varios tratamientos en ventrescas de merluza tratadas con PEF de 7 µs de anchura de pulso, 3 kV/cm de campo eléctrico y 20 kJ/kg.

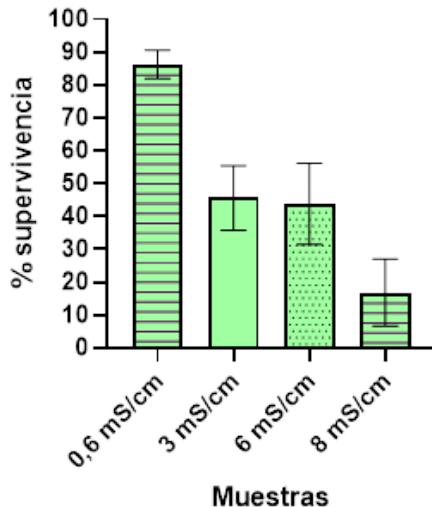


Figura 6.2.1.2. Influencia de la conductividad eléctrica en el porcentaje de supervivencia de *Anisakis* en ventrescas tratadas con PEF de 3 kV/cm y 20 kJ/kg.

Como se puede observar, para un mismo tratamiento PEF, la inactivación incrementó con la conductividad eléctrica del medio. Así para el mismo tratamiento PEF que apenas inactivaba un 15% de la población de *Anisakis* en ventrescas tratadas en un medio de 0,6 mS/cm, se redujo en casi un 90% cuando el medio tenía una conductividad eléctrica de 8 mS/cm. Este efecto de la conductividad eléctrica abre las posibilidades de la tecnología PEF al escalado ya que no son necesarios equipos potentes que permitan alcanzar altos campos eléctricos para conseguir una eficacia letal elevada.

6.2.2. Evaluación de la microbiota de la merluza tratada por PEF a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.

La Figura 6.2.2.1. muestra la evolución de microorganismos psicrótrofos aerobios presentes en trozos de merluza tratados con PEF con diferentes conductividades eléctricas. En dicha figura se observa que el medio de tratamiento no tuvo repercusión en la evolución de este grupo microbiano. Este resultado se dio en los demás grupos microbianos investigados por lo que solo se presentan los resultados del estudio de un tratamiento PEF con una conductividad eléctrica de la solución salina de 8 mS/cm ya que presentó una letalidad mayor (85%) sobre las larvas de *Anisakis*. Así, las figuras 6.2.2.2., 6.2.2.3. y 6.2.2.4. muestran la evolución de los restantes grupos microbianos investigados: microorganismos psicrótrofos anaerobios, *Pseudomonas*, *Shewanella*, bacterias ácido-lácticas y enterobacterias, en trozos de merluza tratados y no tratados por PEF, almacenados en refrigeración y envasados o no en atmósfera protectora (50% CO₂ / 50% N₂). Como se observa en todos los grupos microbianos investigados, el tratamiento PEF no afectó a los recuentos microbiológicos iniciales y la evolución fue la misma en las

muestras tratadas por PEF y los controles. La calidad microbiológica inicial de la materia prima utilizada en este estudio resultó más favorable obteniendo menores recuentos iniciales que en el estudio realizado a escala de laboratorio. Al igual que lo observado a escala de laboratorio, el uso de atmósferas modificadas ralentizó la velocidad de crecimiento de todos los grupos microbianos independientemente de si las muestras habían sido tratadas o no con PEF.

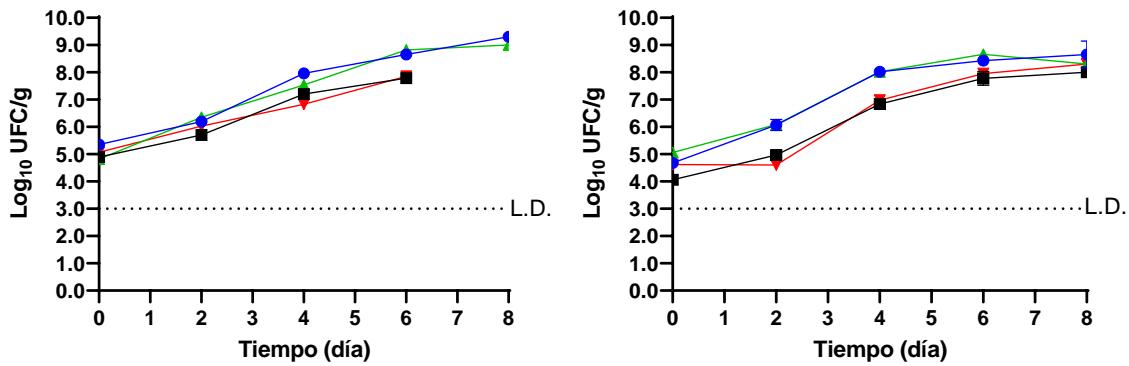


Figura 6.2.2.1. Evolución de microorganismos psicrótrofos aerobios durante su almacenamiento en refrigeración en trozos de merluza tratados en una cámara de tratamiento con una conductividad eléctrica del medio acuoso de 0,4 mS/cm (izquierda) y 8 mS/cm (derecha). Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 μ s) envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 μ s) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

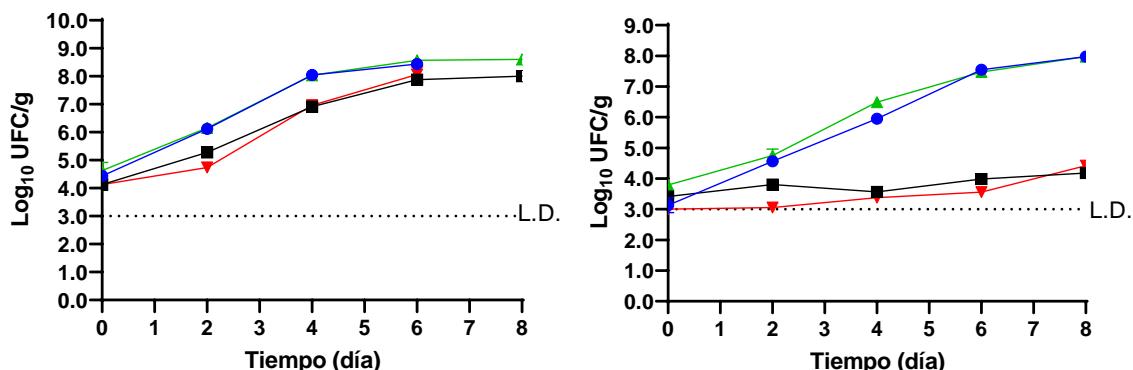


Figura 6.2.2.2. Evolución de microorganismos psicrótrofos anaerobios (izquierda) y *Pseudomonas* (derecha) durante el periodo de almacenamiento en refrigeración. Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 μ s) envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 μ s) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

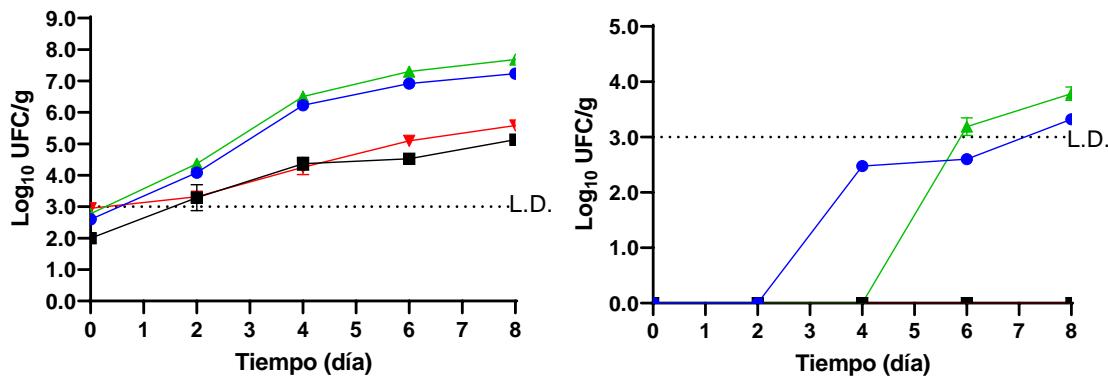


Figura 6.2.2.3. Evolución de *Shewanella* (izquierda) y enterobacterias (derecha) durante el periodo de almacenamiento en refrigeración. Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 µs) envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 µs) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

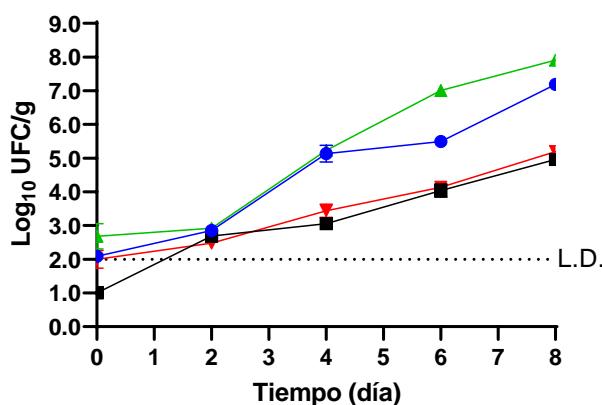


Figura 6.2.2.4. Evolución de bacterias ácido-lácticas durante el periodo de almacenamiento en refrigeración. Muestras control sin atmósfera (●), controles envasados en atmósfera (50/50) (■), tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 µs) envasadas sin atmósfera (▲) y tratadas por PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 µs) envasadas en atmósfera (50/50) (▼). L.D.: Límite de detección.

Como se puede observar, los resultados obtenidos a escala de laboratorio fueron validados a escala de planta piloto en este caso con tratamientos de 3 kV/cm y una conductividad de 8 mS/cm que produjo una letalidad similar de larvas L3 de *Anisakis*.

6.2.3. Evaluación de la calidad de la merluza tratada por PEF a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.

Si bien hubiera sido de interés volver a valorar durante el almacenamiento en refrigeración los parámetros indirectos de la calidad evaluados a escala de laboratorio, en este caso, y por limitación de tiempo, no se llegó a hacer. En cualquier caso y por el interés de los resultados, se presenta la evaluación de la calidad sensorial que realizó la propia empresa Scanfisk Seafood S.L.

de las muestras pulsadas con tratamientos PEF al inicio y al final de la vida útil que consideró la empresa sin el uso de atmósferas protectoras (7 días a 4°C) y la comparación con los controles. En las Figura 6.2.3.1 y 6.2.3.2., se muestra el aspecto de trozos de merluza control y tratado con PEF (3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 μ s con una conductividad eléctrica de 8 mS/cm) justo tras el tratamiento (Fig. 6.2.3.1.) y tras 7 días de almacenamiento en refrigeración (Fig. 6.2.3.2.). Tras la realización de un examen visual de las muestras, determinaron que no había diferencias visuales entre los trozos ni en el día 0 ni en el día 7 de almacenamiento pulsados y sin pulsar. Según la valoración de la empresa, ambas muestras se comportaron de forma similar independientemente de haber recibido o no un tratamiento PEF que inactivaría el 90% de las larvas L3 de *Anisakis* que estuvieran presentes.



Figura 6.2.3.1. Trozo de merluza control el día 0 (izquierda) y trozo de merluza pulsado el día 0 (derecha).



Figura 6.2.3.2. Trozo de merluza control el día 7 (izquierda) y trozo de merluza pulsado el día 7 (derecha).

7. CONCLUSIONES

Tras el estudio de diferentes parámetros que definen la intensidad de los tratamientos PEF en la letalidad de *Anisakis*, se puede concluir que tratamientos de campo eléctrico de 5 kV/cm, 20 kJ/kg y 30 μ s fueron efectivos para la inactivación del 98 \pm 5% de las larvas cuando se encontraban en una solución salina de conductividad eléctrica de 1 mS/cm. Sin embargo, en ventresca, debido posiblemente a la piel que actuaría como aislante de los pulsos eléctricos y por la elevada cantidad de larvas L3 de *Anisakis* presentes, este mismo tratamiento produjo la inactivación del 80 \pm 14% de las larvas L3 en un medio de 1 mS/cm. Sin embargo, la aplicación de tratamientos PEF en medios de mayor conductividad eléctrica incrementó la letalidad de los

mismos. Así, a escala de planta piloto, tratamientos de pulsos de 3 kV/cm, 20 kJ/kg y 7 µs con una conductividad eléctrica de 8 mS/cm fueron efectivos para la inactivación del 85 ± 10% de los parásitos.

La letalidad de las larvas de *Anisakis* aumentó cuando se incrementó la intensidad de campo eléctrico y, a su vez, resultó mayor cuando la conductividad eléctrica del medio de tratamiento aumentaba. Es decir que una combinación adecuada de intensidad de campo eléctrico y conductividad eléctrica podrían resultar efectivos para la inactivación del 100% de las larvas L3. Los tratamientos PEF no presentaron un impacto en el desarrollo y evolución de la microbiota del pescado por lo que se puede concluir que no afectaron a la vida útil del pescado. La utilización de atmósferas modificadas permitió controlar el crecimiento microbiano en las muestras de pescado control y tratado por PEF. Además, el aumento de la conductividad eléctrica del medio no afectó al desarrollo de la microbiota.

Respecto a la calidad del pescado, el pescado de mayor calidad en todos los parámetros estudiados resultó ser el que no estaba tratado (control); sin embargo, el pescado tratado por PEF mostró características similares al producto fresco, y superiores de forma general al que se había congelado con el objetivo de inactivar *Anisakis*, presentando una menor capacidad de retención de agua y mayores pérdidas por goteo.

8. CONCLUSIONS

After the study of different parameters that define the intensity of the PEF treatments in *Anisakis* lethality, it can be concluded that the electric field treatments of 5 kV/cm, 20 kJ/kg and 30 µs were effective for the inactivation of 98 ± 5% of the larvae when found in a saline solution with an electrical conductivity of 1 mS/cm. However, in hake belly, possibly due to the skin that would act as an insulator for the electrical pulses and due to the high number of *Anisakis* L3 larvae present, this same treatment produced the inactivation of 80 ± 14% of the L3 larvae in a medium of 1 mS/cm. However, the application of PEF treatments in media with higher electrical conductivity increased their lethality. Thus, a pilot plant scale, pulse treatments of 3 kV/cm, 20 kJ/kg and 7 µs with an electrical conductivity of 8 mS/cm were effective for the inactivation of 85 ± 10% of the parasites.

The lethality of *Anisakis* larvae increased when the electric field intensity increased and, in turn, it was higher when the electrical conductivity of the treatment medium increased. In other words, an appropriate combination of electric field intensity and electrical conductivity could be effective for the inactivation of 100% of the L3 larvae.

PEF treatments did not have an impact on the development and evolution of the fish microbiota, so it can be concluded that they did not affect the shelf life of the fish. The use of modified

atmospheres allowed to control microbial growth in the control and PEF-treated fish samples. Furthermore, the increase in the electrical conductivity of the medium did not affect the development of the microbiota.

Regarding the quality of the fish, the highest quality fish in all the parameters studied turned out to be the one that was not treated (control); however, the fish treated with PEF showed similar characteristics to the fresh product, and generally superior to the one that had been frozen with the aim of inactivating *Anisakis*, showing a lower water retention capacity and higher drip losses.

9. VALORACIÓN PERSONAL

La valoración general de este trabajo es muy positiva, tanto a nivel personal como profesional. Ha sido una gran oportunidad para descubrir cómo se llevan a cabo los trabajos de investigación y el trabajo, tiempo y esfuerzo que requieren. Además, he podido aprender mucho acerca de la tecnología PEF, así como del pescado y *Anisakis*.

La realización de este proyecto experimental me ha facilitado el desarrollo personal en varios aspectos, no solo prácticos, como el trabajo en laboratorio; sino también otros que considero importantes como la gestión del tiempo y el trabajo en equipo.

Desde mi punto de vista, realizando este trabajo consigues poner en práctica muchos de los conocimientos adquiridos en años anteriores y además contribuye a pensar y razonar de forma crítica.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abad, V., Alejandre, M., Hernández-Fernández, E., Raso, J., Cebrián, G. y Álvarez-Lanzarote, I. (2023). "Evaluation of Pulsed Electric Fields (PEF) Parameters in the Inactivation of *Anisakis* Larvae in Saline Solution and Hake Meat". *Foods*, 12(2), 264.

Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) (2016). "Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la alergia a Anisakis." *Revista del comité científico* nº 24, pp 23-33.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (2021). *Anisakis*. Madrid: AESAN. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/anisakis.htm [Consultado 16-05-2023].

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (2007). "Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre medidas para

reducir el riesgo asociado a la presencia de Anisakis". *Revista del Comité Científico*, 6, pp. 61-65.

Disponible

en:

http://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/TRATAMIENTOS_ANISAKIS.pdf [Consultado 16-04-2023].

Álvarez, I., Condón, S. y Raso, J. (2006). "Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields". *Food Engineering Series*, pp. 97-129.

Antunes-Rohling, A., Artaiz, Á, Calero, S., Halaihel, N., Guillén, S., Raso, J., Álvarez, I. y Cebrián, G. (2019). "Modelling microbial growth in modified-atmosphere-packed hake (*Merluccius merluccius*) fillets stored at different temperatures". *Food Research International*, 122, pp. 506-516.

Bao, M., Pierce, G., Strachan, N., Pascual, S., González-Muñoz, M. y Levsen, A. (2019). "Human health, legislative and socioeconomic issues caused by the fish-borne zoonotic parasite *Anisakis*: Challenges in risk assessment". *Trends in Food Science & Technology*, 86, pp.298-310.

Barbosa-Cánovas, G.V., Fernández-Molina, J. J. y Swanson, B. G. (2001). "Pulsed electric fields: A novel technology for food preservation", *Agro Food Industry Hi-Technology*, 12, pp: 9-14.

Braña, D., Ramírez, E., Rubio, M., Sanchez, A., Torrescano, G., et al. (2011). "Manual de Análisis de Calidad en Muestra de Carne", *Folleto Técnico*, 11.

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (2010). "Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products". *EFSA Journal*, 8 (4), pp.10-18.

Gago Cabezas, L., García Iglesias, E., Fernández Nuevo, J. y González Izquierdo, J. (2007). *Detection and Inactivation Methods of Anisakis simplex and Diseases that this parasite produces*. Biotechnology Innovation Circle. Madrid Science Park. Disponible en: <https://pesca.elika.eus/metodos-para-la-deteccion-e-inactivacion-de-anisakis-simplex-2007/> [Consultado 28-03-2023].

Honikel, K. (1998). "Reference Methods for the Assessment of Physical Characteristics of Meat", *Meat Science*, 49 (4), pp. 447-457.

Klimpel, S. y Palm, H. W. (2011). "Anisakis nematode (Ascaridoidea) life cycles and distribution: increasing zoonotic potential in the time of climate change?". *Progress in Parasitology*. Parasitology Research Monographs 2 (11).

Levsen, A. y Lunestad, B. T. (2010). "Anisakis simplex third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh". *Veterinary parasitology*, 171(3-4), pp. 247–253.

Nakazawa, N. y Okazaki, E. (2020). "Recent research on factors influencing the quality of frozen seafood". *Fish Sci*, 86, pp. 231–244.

Olivares Ponce, F. (2012). *Efecto sobre los alérgenos de las larvas I3 de Anisakis al aplicar tratamientos selectivos en pescado parasitado*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Onitsuka, C., Nakamura, K., Wang, D., Matsuga, M., Tanaka, R., Inoue, Y., Kuroda, R., Noda, T., Negoro, K., Negoro T. y Namihira, T. (2022). "Inactivation of anisakis larva using pulsed power technology and quality evaluation of horse mackerel meat treated with pulsed power". *Fisheries Science*, 88, pp. 337-344.

Raso, J., Álvarez, I., Condón, S. y Sala, F.J. (1999): "La conservación de los alimentos mediante pulsos eléctrico de alto voltaje. Aspectos técnicos", *Alimentación: equipos y tecnología*, 8, pp: 115- 124.

Trout, G.R. (1988). "Techniques for Measuring Water-Blinding Capacity in Muscle Foods- A Review of Methodology", *Meat Science*, 23, pp. 235-252.

Zimmermann, U., Pilwar, G. y Riemann, F. (1974). "Dielectric breakdown of cell membranes", *Biophysical Journal*, 14, pp: 881-889.

10.1. REFERENCIAS LEGALES

Reglamento (CE) nº 853/2004, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L139, de 30 de abril de 2004.