



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



## Trabajo Fin de Grado

# Determinación de la vida útil de hamburguesas de potón

Autor/es

Teodoro J. Martín Echeverría

Director/es

Santiago Condón Usón  
José Antonio Beltrán Gracia

Facultad de Veterinaria  
Curso 2014-2015

## **DATOS PERSONALES.**

- Apellidos: Martín Echeverría
- Nombre: Teodoro J.
- DNI: 73018630-R
- Dirección: C/ Cortes de Aragón Nº 32, Rueda de Jalón (Zaragoza).
- Teléfono: 666 36 71 86
- Correo electrónico: teo\_ruedero\_21@hotmail.com

## **AGRADECIMIENTOS.**

Para la elaboración de este trabajo fue indispensable la colaboración de Zarafish, empresa que ha suministrado todas las hamburguesas precisas para el desarrollo. Ademas, nos ha facilitado toda la información necesaria para el conocimiento de este cefalópodo y los tratamientos que recibe antes de elaborar las hamburguesas.

# INDICE

1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1    Hábitos alimentarios.....	3
2.2    Calamar gigante ( <i>Dosidicus Gigas</i> ). ....	5
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
4.1    Diseño experimental.....	11
4.2    Análisis.....	12
Determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT). ....	12
Determinación de la oxidación lipídica:.....	13
Recuento de Mesófilos Viables Totales (MVT) .....	14
Recuento de Psicrótrofos Viables Totales (PST): .....	15
Recuento de bacterias de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> (ET): .....	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5.1    Efecto de la temperatura de almacenamiento en la calidad de las hamburguesas de calamar gigante. ....	16
5.1.1    Calidad microbiológica.....	16
5.1.2    Calidad organoléptica.....	23
5.2    Vida útil de las hamburguesas de calamar gigante.....	27
6. CONCLUSIONES .....	32
CONCLUSIONS.....	33
7. APORTACIONES DE LA ASIGNATURA.....	34
8. BIBLIOGRAFÍA .....	35

## 1. RESUMEN.

El modo de vida actual, ha cambiado los hábitos de consumo de alimentos de los ciudadanos. Por una parte, ha aumentado la demanda de productos de rápida y fácil preparación, y por otra, ha disminuido el consumo de algunos que, como los productos del mar, se consideran altamente saludables. Con objeto de dar satisfacción a los consumidores, las empresas agroalimentarias están intentado desarrollar nuevos productos. Este es el caso de Zarafish, una empresa dedicada a la preparación y venta de potón (*Dosidicus Gigas*) congelado, que en la actualidad está intentado comercializar una hamburguesa de potón que previsiblemente aumentaría la demanda de este cefalópodo, sobre todo en el sector infantil y juvenil de la población.

Zarafish ha desarrollado ya una hamburguesa que en principio pretendía comercializar congelada; sin embargo, a petición de algunos de sus distribuidores, desea intentar comercializarla en refrigeración. Para ello, la empresa necesita saber la vida útil que tendría el producto refrigerado en distintas condiciones de almacenamiento, motivo por el que solicitó nuestra colaboración.

Para el estudio de vida útil, se consideran como principales factores de alteración: el crecimiento microbiano, el aumento de la concentración de nitrógeno básico volátil total y el nivel de oxidación del producto. La variable del estudio, seleccionada a partir de las demandas de la empresa, fue la temperatura de almacenamiento, por lo que las hamburguesas se mantuvieron a: 4°C, por ser la temperatura habitual de almacenamiento en refrigeración; 7 °C, por ser una temperatura habitual en las neveras domésticas; y 10 °C, por ser una temperatura que, aunque indeseable, se alcanza con relativa frecuencia cuando la cadena de frío no está bien controlada.

El trabajo realizado permitió desarrollar un modelo matemático terciario capaz de predecir la vida útil del producto a cualquier temperatura de almacenamiento.

## ABSTRACT

The current way of life has changed the food habits of citizens. On the one hand, it has increased the demand for fast and easy preparation, and on the other hand, it has decreased the consumption of some who, like seafood, are considered very healthy. In order to satisfy consumers, the agri-food companies are trying to develop new products. This is the case of Zarafish, a company dedicated to the preparation and sale of Giant Squid (*Dosidicus Gigas*) frozen, which is currently trying to sell a giant squid burger that is expected to increase the demand for this cephalopod, especially in the children's sector and youthful population.

Zarafish has already developed a hamburger initially frozen intended market; however, at the request of some of its distributors, this company wants to try to sell refrigerated. For this, the company needs to know the life would refrigerated storage in different conditions, why it requested our collaboration.

To study useful life, it considered as main factors for alteration: the microbial growth, the increased concentration of total volatile basic nitrogen and the level of the oxidation product. The endpoint of the study, selected from the demands of the company, was the storage temperature, so that the burgers were kept at: 4 °C, as the usual temperature of refrigerated storage; 7 °C, being a usual temperature in domestic refrigerators; and 10 °C, being a temperature, although undesirable, is achieved with relative frequency when the cold chain is not well controlled.

The work done allowed to develop a tertiary mathematical model to predict the lifetime of the product at any temperature storage.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

Transcurrida la crisis del petróleo de los setenta, se produjo una época de bonanza económica en todo el mundo desarrollado que cambio sus hábitos alimentarios, mejoró el nivel cultural de la población y su capacidad adquisitiva, lo que le llevo a demandar alimentos de cada vez mayor calidad. Por otra parte, la mayor demanda de alimentos y la crisis económica de los últimos años, llevó a la industria a buscar nuevas fuentes de materia prima que permitiesen abaratar los costes de producción. Finalmente, la dura competencia existente en el sector, obligó a las empresas a desarrollar nuevos productos que aumenten la demanda. Estas tendencias de la industria agroalimentaria obligan a los científicos y tecnólogos de los alimentos a dar respuesta a multitud de problemas.

### **2.1 Hábitos alimentarios.**

La alimentación de la población española mostró variaciones a lo largo de los años 50/60 debido a cambios como la urbanización, industrialización y solarización que provocaron grandes desplazamientos de las poblaciones, principalmente del mundo rural a la vida urbana, y cambios en los sectores de trabajo. Todo ello provocó el enfrentamiento de los modelos alimenticios de ambas zonas. Además, el cambio en las prácticas de trabajo tuvo como consecuencia, un menor desgaste físico que derivó en una disminución de la necesidad energética.

Inicialmente las jornadas de trabajo se amoldaban a los rituales de alimentación, sin embargo, el desarrollo industrial dio lugar a una nueva situación de trabajo que favorece el fenómeno “comer fuera de casa” y que, además, ha derivado en la subordinación de la alimentación a los ritmos de las jornadas laborales, llegando al extremo de desestructurar la alimentación familiar tradicional. (Instituto de salud pública, 2003).

Actualmente, la sociedad dedica la mayor parte de su tiempo al trabajo, dejando en segundo plano el resto de actividades cotidianas; incluyendo la alimentación. Así mismo la población, que cada vez dispone de menos tiempo libre, prefiere dedicarlo a otras actividades. Es por ello, que el consumidor cada vez demanda alimentos más

fáciles de preparar -“ready to eat” en el mundo anglosajón-. Ya en el año 2013, el consumo de alimentos frescos en los hogares era inferior al 50% (48%) del total consumido y el gasto en alimentación extradoméstica se situaba en el 32% del gasto total en alimentación. Paralelamente, la sociedad muestra cada vez más interés por los efectos que pueden ejercer los alimentos en su salud (Román y col., 2003) y busca productos de alta calidad, sanos y naturales.

Por otra parte, la situación antes descrita ha llevado a un cambio notable de las dietas habituales que, en general, son mucho menos saludables que las utilizadas hace años. Por ejemplo, se considera que la dieta tradicional mediterránea es una de las más saludables, pero paradójicamente en lugar de extenderse a otras zonas esta reduciéndose en los países de origen. A este respecto, cabe señalar que el consumo de pescado ha disminuido entorno a un 4% respecto al año 2013. Casi la mitad (44,7%) del total fue consumo de pescado fresco, mientras que el resto correspondía a pescado congelado y derivados. (MAGRAMA, 2014). En cuanto a moluscos cefalópodos, su consumo en España también experimentó un leve descenso por lo que respecta a producto fresco y congelado, sin embargo, se observó un pequeño aumento del consumo de conservas que alcanzaron los 4,37 kg/persona/año. (MAGRAMA, 2014).

En respuesta a estos cambios de la demanda las empresas agroalimentarias han respondido intentando mejorar la información, la calidad y seguridad de los productos que comercializan. Además, han intentado facilitar el modo de vida de los consumidores, adaptando los productos a sus nuevos hábitos de consumo: fuera del hogar, en porciones, de preparación rápida, y que cubran sus necesidades nutricionales y dietéticas (Pino García, 2001).

De todos los factores antes mencionados, seguramente los más significativos son: el alimento debe ser fácil de preparar, debe ser atractivo para el consumidor y debe ser barato. La originalidad en la elaboración y presentación permite diferenciar al producto de la competencia, logrando así un mayor atractivo. Además, la elaboración de nuevos productos a partir de materias primas baratas o que presentan rechazo por un sector de la población, permite aumentar su demanda y competitividad. Por ejemplo, en el caso del pescado existe un rechazo creciente en el sector de niños y jóvenes. Por ello, su procesado para la obtención de nuevos productos elaborados, como las

hamburguesas, salchichas, etcétera, seguramente aumentaría la demanda de ese sector de la población.

Para la obtención de una hamburguesa de pescado es posible utilizar cualquier variedad marina, por lo que las empresas agroalimentarias buscan especies abundantes que les permitan abaratar el producto manteniendo unos estándares mínimos de calidad sensorial, nutritiva y sanitaria. En este contexto, la empresa Zarafish pretende elaborar hamburguesas de calamar gigante (*Dosidicus Gigas*), especie que presenta características similares al pulpo, pero con un precio más asequible por ser más abundante.

## **2.2 Calamar gigante (*Dosidicus Gigas*).**

El calamar gigante, o potón del Pacífico, es un cefalópodo perteneciente a la familia *Ommastrephidae*, dentro de la subfamilia *Ommastrephinae*, especie *Dosidicus Gigas*. Se trata del ejemplar más grande entre los calamares, alcanzando tamaños de hasta 1,2 m de longitud y un peso de hasta 50 kg. Se caracteriza por presentar un notable dimorfismo sexual, una alta tasa de fecundidad y una vida corta (máximo dos años) (Nigmatullin., 2001).

En el año 2013, España importó de Perú 47.100 toneladas de potón del pacifico, congelado en bruto, lo que supone un 98% de las importaciones totales de esta especie. Las importaciones se encuentran en alza, lo que se atribuye a que este producto, tras ser procesado en España, se exporta con facilidad a otros países europeos. (PRO ECUADOR, 2014).

*Dosidicus Gigas* presenta una estructura particular debida a una evolución temprana, que supuso la pérdida del exoesqueleto cuando aún no había sido introducida la estructura ósea en el reino animal, lo que tuvo como consecuencia un notable desarrollo del tejido muscular para la protección de las vísceras, facilitar el movimiento y mantener la forma del cuerpo; desde el punto de vista tecnológico, la consecuencia fue un importante endurecimiento de su tejido muscular (Kreuzer, 1984).

El músculo del potón está constituido por proteínas miofibrilares, formadas por actina y miosina, al igual que el resto de animales, pero además, presenta notables

cantidades de paramiosina rodeando a la miosina (Cortés-Ruiz J.A y col, 2008). La principal característica fisiológica de esta proteína, es que produce contracciones musculares sostenidas durante largos periodos de tiempo, con poco o nulo gasto energético, por lo que también se la responsabiliza de la elasticidad y dureza característica de este cefalópodo (Cooley, L.B y col., 1978).

Su composición química presenta una gran variabilidad en función del estado de desarrollo, estación del año en la que es capturado, lugar de pesca e incluso de si ha sido capturado antes o después del desovado (Ibarra L.R, 2006). El manto y los tentáculos presentan una composición muy similar a los pescados magros, es decir: 75-84% de humedad, 13-22% de compuestos nitrogenados, 0,1-2,7% de lípidos y el 0.9-1,9% de minerales. La principal característica distintiva de esta especie, es que alrededor del 37% del total de sustancias nitrogenadas corresponden a compuestos no proteicos. En cuanto a los lípidos del manto, están constituidos principalmente por fosfolípidos, correspondiendo un 4% al colesterol (Rosas Z.G, 2007).

La fracción de nitrógeno no proteico tiene un bajo peso molecular, es soluble en agua e incluye al óxido de trimetilamina, a sus productos de degradación -la trimetilamina (TMA), producida por el crecimiento bacteriano, y la dimetilamina (DMA), producida por la actividad autolítica de los enzimas del propio potón durante el almacenamiento en congelación o por reducción no enzimática durante el tratamiento térmico (Zhu y col., 2013)-, al amoniaco, producto de la desaminación de los nucleótidos, y otros compuestos nitrogenados relacionados con la degradación del pescado (FAO., 1998). El contenido de nitrógeno básico volátil total (NBTV) es utilizado como parámetro de frescura en el pescado, pero en el caso del calamar gigante los contenidos iniciales son normalmente altos, por lo que no necesariamente implica que el producto este deteriorado, aunque si le confiere características sensoriales poco agradables.

Además de amoniaco, se ha demostrado que el calamar gigante también presenta altas concentraciones de óxido de trimetilamina (OTMA), que al degradarse puede dar lugar a trimetilamina (TMA) o dimetilamina y formaldehido (FA). Estas sustancias producen un olor muy desgradable; pero además, un elevado contenido de DMA implica la existencia de elevadas concentraciones de FA -DMA y FA que se producen en cantidades equimolares-, y que pueden ocasionar el entrecruzamiento de las fibras

proteicas con el consiguiente endurecimiento del producto (Fu y col., 2007). Por esta razón, el procesado del potón es complicado.

El calamar gigante que es procesado en España, se importa mínimamente manipulado y congelado. El producto se recibe sin cabeza, aletas, vísceras ni pico, por lo que el flujo de procesado en estas industrias se reduce a: descongelación de la materia prima, marinado y cocción posterior; además de otras etapas opcionales y posteriores como son: el corte del producto, el glaseo o el envasado.

Debido a que es un producto muy perecedero por sus altos niveles en aminoácidos libres y bases nitrogenadas volátiles, además de la normalmente alta contaminación de especies psicrotrofas (Sallam, 2007), las industrias introducen en el flujo de procesado una etapa de marinado, similar a la utilizada en el acondicionamiento de otras especies marinas. Esto permite paliar, en mayor o menor medida el olor amoniacial, la dureza excesiva de la carne y el sabor amargo que en ocasiones presenta.

El marinado tradicionalmente era una etapa que posibilitaba aumentar la conservación de los productos procedentes del mar. Es una técnica que consiste en la disolución de un ácido orgánico, tal como el ácido acético, y de cloruro sódico en agua, en la que posteriormente se introduce el pescado durante un tiempo prefijado. Esta etapa permitía retrasar la acción bacteriana y enzimática (Kilinc y col., 2005). Sin embargo, actualmente estos objetivos han pasado a un segundo plano, puesto que las tecnologías de conservación han evolucionado y el consumidor es más exigente en cuanto a calidad nutritiva y sensorial del producto, teniendo esta etapa como principal objetivo el ablandamiento de los productos y la modificación de las propiedades texturales y estructurales (Duyar., 2009). Esto ha supuesto también, un cambio de los aditivos utilizados para el marinado. Actualmente, se utilizan una gran variedad entre los que destacan los polifosfatos y los citratos. Estos son los aditivos que se utilizan para conseguir una mayor “apertura” de la estructura muscular, facilitando la entrada de agua y la salida de amoniaco, de ácidos y del resto de sustancias indeseables. El marinado persigue hoy la reducción del olor amoniacial, el aumento de la jugosidad y terneza del tejido muscular y el aumento del rendimiento del proceso, para lo que es preciso mejorar la capacidad de retención de agua tras la maceración (Sheard y col., 2004).

Los tratamientos térmicos del calamar gigante presentan gran importancia sobre el producto final. El calentamiento del producto, provoca numerosos cambios en las

propiedades funcionales de las proteínas, lo que se traduce en grandes cambios de textura. Éstos son debidos principalmente a la desnaturalización de las proteínas que, por tanto, inducen también la deshidratación del producto, que resulta más elástico y duro. A pesar de ser una etapa de gran interés, existen muy pocos documentos que estudien el comportamiento de este cefalópodo ante el calor. Las teorías más afianzadas establecen que el tratamiento debe realizarse o bien a elevadas temperaturas (superiores a 100 °C) durante tiempos inferiores a los 3 minutos o a muy bajas temperaturas durante tiempos prolongados (p.e. 98 °C, 30 minutos).

La calidad del tejido muscular no solo se ve influenciada por la pérdida de agua, sino también por la pérdida de las proteínas por lixiviación, ya que, si bien la perdida de agua debería producir un aumento de la concentración de proteínas del producto, la realidad es que durante los primeros minutos de cocción pueden llegar a perderse hasta un 25% del total (Kreuzer R, 1984).

Otro de los factores determinantes de la calidad de los derivados de *Dosidicus gigas* es su carga microbiana. La alteración microbiana del pescado se describe como un proceso proteolítico, que da lugar a la alteración del producto, pudiendo presentar problemas sanitarios si se produce la multiplicación de especies patógenas. En los músculos, además, se produce la degradación del glucógeno provocando el descenso del pH conforme se acumulan ácidos residuales (ICMSF., 2004)

En el potón, predominan las especies psicrótrofas y psicrófilas, dado que están adaptadas a las bajas temperaturas del agua, son capaces de crecer durante el almacenamiento en refrigeración del producto. Tras la captura, la flora bacteriana se adapta al nuevo ambiente, pudiendo presentar un crecimiento exponencial, incluso almacenado a bajas temperaturas. Los géneros aislados con mayor frecuencia en los cefalópodos son: *Aeromonas*, *Flavobacterium*, Psicrótrofos, *Proteus*, *Vibrio*, *Bacillus* y *Streptococcus* (Castellanos-Martínez, 2013).

Como ya se ha mencionado, la elaboración de hamburguesas de calamar gigante, presenta la posibilidad de desarrollar nuevas líneas de comercio. Zarafish, empresa que se beneficiará de este estudio, nos proporcionó las muestras necesarias y no pidió que estudiásemos la posibilidad de comercializarlas refrigeradas. La hamburguesa de potón fabricada por Zarafish, se elabora con una mezcla, en distintos porcentajes, de manto y

rejo picados. Además, contiene otros ingredientes como ajo picado, cebolla, sal, pimienta y espesantes.

Las hamburguesas de potón no tienen actualmente una definición legal específica, por lo que deben utilizarse otras referencias, como lo establecido en el Reglamento (CE) N° 853/2004 del parlamento europeo y del consejo 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, o más específicamente en lo concerniente a productos de la pesca preparados. Se entiende por "Productos de la pesca preparados" a los productos de la pesca sin transformar que han sido sometidos a una operación que afecte a su integridad anatómica, como evisceración, descabezado, corte en rodajas, fileteado y picado.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El consumo de Calamar gigante (*Dosidicus Gigas*) está aumentando rápidamente en los países desarrollados, dado su alto valor nutritivo, su abundancia y su bajo coste. Estas últimas características hacen que se trate de una materia prima muy adecuada para la elaboración de nuevos productos. La tendencia creciente en las sociedades occidentales hacia el consumo de alimentos preparados y elaborados ha provocado la búsqueda de nuevas alternativas para la venta de potón, en el caso de la empresa interesada en este trabajo (Zarafish) de hamburguesas refrigeradas. Este calamar, y por tanto sus derivados, son muy perecederos por contener habitualmente altas concentraciones de especies psicrotrofas. Por ello, a requerimiento de Zarafish, decidimos:

#### **Objetivo:**

Determinar el tiempo de vida útil de hamburguesas de potón (*Dosidicus Gigas*), fabricadas por Zarafish, al ser almacenadas a distintas temperaturas. Para la consecución de este objetivo general consideramos necesario:

- Determinar las cinéticas de crecimiento microbiano en el producto almacenado a distintas temperaturas.
- Determinar las concentraciones iniciales y las cinéticas de variación del NBVT de las hamburguesas almacenadas a distintas temperaturas.
- Determinar la evolución de la oxidación lipídica de las hamburguesas durante el almacenamiento en refrigeración.
- Establecer el parámetro limitante de la vida útil del producto a las diferentes temperaturas mediante el desarrollo de un modelo matemático terciario que permita predecir la vida útil del producto a cualquiera que sea la temperatura de refrigeración.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 4.1 Diseño experimental.

Las hamburguesas utilizadas por el estudio fueron gentilmente suministradas por Zarafish. El potón utilizado para la fabricación de este lote tenía las siguientes características: Procedencia: Flota Extranjera (O. pacífico, zona FAO 87); Origen: captura; Arte de pesca: red de enmalle superficial.

Se partió de hamburguesas congeladas que se descongelaron durante 24 horas en una cámara de refrigeración a una temperatura de 0-1°C. Posteriormente, las hamburguesas se dividieron en tres grupos, formados por 15 unidades cada uno, y se almacenaron a las temperaturas preseleccionadas.

Los parámetros de calidad utilizados para establecer el límite de vida útil fueron: el recuento microbiano, utilizando como referencia los recuentos totales de mesófilos, psicrótrofos y enterobacterias; la concentración de nitrógeno básico volátil total; y el grado de oxidación.

Los valores que mostraron las hamburguesas de los parámetros llevados a estudio en el momento 0, tras la descongelación, se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Representación de los valores iniciales en las hamburguesas de calamar gigante de los recuentos microbianos, NBVT y grado de oxidación. Media de los valores obtenidos a partir de las réplicas y desviación estándar.

		$\bar{x}$	$\sigma$
Recuento microbiano	<b>MES</b>	4,42324	0,50973
	<b>ENT</b>	4,41686	0,15389
	<b>PST</b>	3,68994	0,44712
<b>NBVT</b>		21,4861	4,23893
<b>Grado de oxidación</b>		1,03313	0,00216

Las temperaturas de almacenamiento en refrigeración seleccionadas fueron: 4 °C, por ser la más frecuentemente utilizada en la industria; 7 °C, por ser la temperatura habitual de los frigoríficos domésticos; y 10 °C por ser la temperatura máxima de abuso admitida por la mayoría de las empresas.

Los tiempos de almacenamiento fueron: para las hamburguesas almacenadas a 7 y 10°C, el muestreo se realizó cada 24 horas, a excepción del último que se realizó con un intervalo de 72 horas; y para las almacenadas a 4°C, se muestreó cada 48 horas, a excepción del tercer y sexto. En cada muestreo se extrajeron 3 hamburguesas de cada condición.

Todos los análisis se realizaron por triplicado.

## **4.2 Análisis.**

### **Determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT).**

Se realizó tal como se indica en el protocolo del capítulo III del Reglamento (CE) N°2074/2005 titulado: “Determinación de la concentración de NBVT en pescados y productos de la pesca”, modificado por el Reglamento (CE) N°1022/2008.

El protocolo de este Reglamento establece la forma de determinar la concentración de los compuestos nitrogenados de carácter volátil que son liberados a causa de la degradación del producto post- morten, y el rango de concentraciones de NBVT entre 5 y 100 mg/ 100g. El resultado final incluye sustancias tales como la trimetilamina, producida por la acción de deterioro bacteriano, la dimetilamina, producida a partir de las enzimas autolíticas durante el almacenamiento, el amoniaco, que aumenta por la desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos, así como otros compuestos volátiles de carácter nitrogenados que están asociados al deterioro de los productos pesqueros.

Se lleva a cabo la extracción de las bases volátiles mediante una solución con ácido perclórico 0,6M; con el medio alcalinizado, se lleva a cabo la absorción de los componentes básicos volátiles mediante una destilación al vapor que es recogida mediante un receptor acido. Todo ello, se lleva a cabo en un equipo diseñado

especialmente para la determinación del NBVT (mod. UDK 130 D, VELP SCIENTIFICA, Usmate, Italia). La concentración de NBVT se obtiene mediante una valoración con ácido clorhídrico.

Se pesaron 2 gramos por muestra y se añadió 20 ml de ácido perclórico 0,6M para la extracción de las bases nitrogenadas; Se homogeneizó mediante ultraturrax y posteriormente se llevó a centrifuga a 3400rpm durante 4 minutos para depositar los trozos de hamburguesa. Una vez alcalinizado, se somete el extracto a destilación al vapor absorbiéndose los componentes básicos volátiles en ácido bórico. Para determinar la concentración de NBVT, se lleva a cabo una titulación de las bases absorbidas mediante ácido clorhídrico.

Cabe destacar que se modificó el procedimiento original, teniendo en cuenta la ausencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos con ambos métodos. Respecto del protocolo original: se modificó el peso de muestra, se redujo el volumen de ácido perclórico de 100ml a 20ml, con lo que se mantenía la misma proporción (1:10) que en el protocolo original. Además se disminuyó la concentración del ácido clorhídrico de titulación a 0.05N.

Cálculo:

$$\text{mg N / 100 g muestra} = \frac{14 \times (V_1 - V_0) \times 0,05}{M} \times 100$$

Dónde:

$V_1$  = Vol. en ml de HCl en la muestra

$V_0$  = Vol. en ml de HCl en el blanco

$M$  = Peso de la muestra de músculo (g)

### **Determinación de la oxidación lipídica:**

La determinación de la oxidación lipídica se llevó a cabo mediante la cuantificación de las sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo el método descrito por Pfalzgraf y col. (1995); Este método está basado en la reacción del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con moléculas de malonaldehído (MDA) producidas por la oxidación lipídica. El TBA tiene una gran afinidad por dicho compuesto, y reacciona con él en proporción 2:1 dando lugar a un compuesto rosáceo que es cuantificable mediante espectrofotómetro:

2 moléculas TBA + 1 molécula Malonaldehído → Compuesto rosáceo

Para la determinación del contenido de MDA se realizó, cada día de análisis, una curva patrón utilizando un isómero del malonaldehido, el 1,1,3,3 tetrametoxipropano (TMP). A partir del TMP, utilizado como referencia para la construcción de la recta patrón para el estudio, obtenemos la cantidad de malonaldehido presente en la muestra, ya que el MDA puede ser obtenido por hidrolisis del TMP mediante una reacción equimolar.

El método de extracción seguido fue el dictado por Fernández y col. (1997), basado en la extracción ácida de las muestras mediante el uso de una solución acuosa de tricloroacético previa a la reacción con el TBA. Siguiendo el protocolo, se utilizó una muestra de 10 g de hamburguesa homogeneizado con 20ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% en tubos de centrifuga en un Ultra-Turrax. Los tubos se centrifugaron a 10°C durante un tiempo de 20 minutos y una velocidad de 4000 rpm. Posteriormente se extrajo el sobrenadante y se tomaron 2 ml del mismo, añadiéndole 2 ml de una solución 20 mM de TBA. La muestra se homogeneizó y se incubó en un baño termostático a 97°C durante 20 minutos.

La lectura de las muestras se llevó a cabo a una absorbancia de 532 nm y se calcularon los resultados utilizando la ecuación obtenida a partir de la curva patrón obtenida anteriormente.

#### **Recuento de Mesófilos Viables Totales (MVT).**

Se siguió el procedimiento descrito en la norma ISO 4833:2003 modificada. Se llevó a cabo un recuento total en placa mediante siembra por homogeneización en masa, con agar TSA con 0,6% YE. Para ello, se pesó 25 g de cada hamburguesa y se añadió 225 ml de agua de peptona esterilizada al 0,1% con 1% de NaCl. La muestra fue homogeneizada en stomacher. A partir de ella, se realizaron diluciones seriadas tomando 1 ml de la muestra inicial en 9 ml de agua de peptona (0,1% y 1% de NaCl) sembrando las diluciones pertinentes. Las placas se incubaron durante 48 horas a 30°C ± 1°C realizando al cabo del tiempo el recuento de colonias características.

### **Recuento de Psicrótrofos Viables Totales (PST).**

El procedimiento utilizado para el recuento de Psicrótrofos, fue el mismo que en el caso anterior, con la salvedad de que las placas fueron incubadas a 10°C durante 5-7 días.

### **Recuento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (ET).**

Se llevó a cabo siguiendo lo descrito en la norma ISO 21528-2:2004 modificada. Las muestras y sus respectivas diluciones fueron preparadas de igual forma que en los casos anteriores, realizando la siembra en agar VRBD (Crystal-violet neutral-red bile glucose agar, Merck), en doble capa y las placas se sometieron a incubación durante 48 h a 30°C ± 1°C, para el posterior recuento de colonias características.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **5.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la calidad de las hamburguesas de calamar gigante.**

Las hamburguesas de calamar gigante son un producto nuevo en el mercado cuyo comportamiento durante el tiempo de almacenamiento se desconoce. Además, a partir de estudios anteriores, se puede concluir que el calamar gigante presenta un alto contenido en NBVT y un elevado recuento inicial microbiano que se incrementa en la hamburguesa (Tabla 1) durante la etapa de procesado en la empresa. El aumento de contaminación sin duda se debe a que la elaboración del producto exige una manipulación excesiva en las actuales condiciones de fabricación.

Al margen del crecimiento de la flora contaminante, también el aumento del nitrógeno básico volátil total y la oxidación de los lípidos pueden ser factores limitantes de la vida útil de las hamburguesas. Por el momento se desconoce cuál de estos parámetros evolucionará más rápidamente.

#### **5.1.1 Calidad microbiológica.**

Para estudiar la calidad microbiológica de las hamburguesas de calamar gigante, se debe tener en cuenta que el producto presenta recuentos microbianos muy elevados inmediatamente después de la fabricación. Seguramente, esto es debido a que la empresa suministradora, Zarafish, fabricó manualmente este lote, puesto que se trata de un estudio a nivel de laboratorio; es pues inevitable, que los recuentos microbianos aumenten durante el mezclado de cada uno de los ingredientes necesarios para su elaboración. Cabe destacar, que es necesario el barnizado del molde de la máquina con aceite y que su congelación se realiza en cajas de plástico; además, no se realiza un envasado individual o en pequeñas cantidades tras la producción. Todo ello, facilita el desarrollo microbiano y la recontaminación del producto.

En cualquier caso, es previsible que sea cual sea la forma de elaboración, la flora contaminate final del producto será semejante a la existente en las muestras suministradas. Por ello, se estudió la evolución de los recuentos de los tres grupos microbianos seleccionados: mesófilos totales, psicrótrofos y enterobacterias en las

hamburguesas almacenadas a tres temperaturas: 4 °C, 7 °C, y 10 °C. El experimento se realizó por triplicado y los recuentos por duplicado.

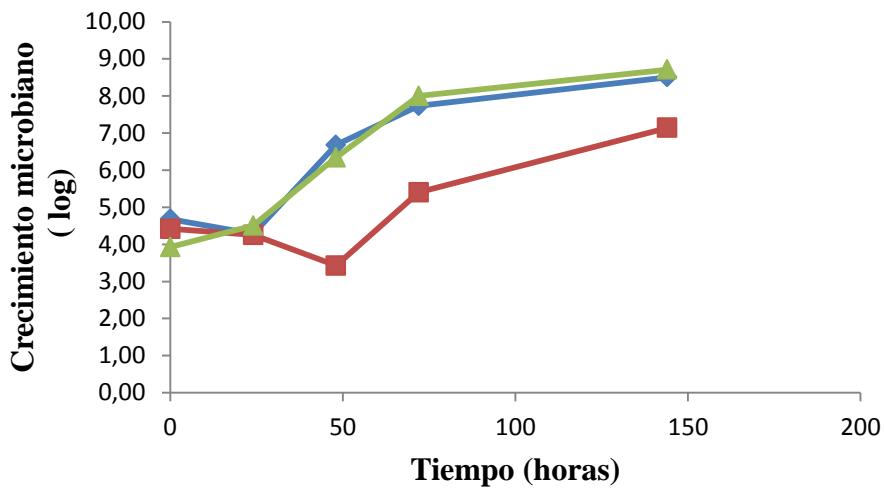


Figura 1. Representación del crecimiento de (•) Mesófilos, (•) Enterobacterias y (•) Psicrótrofos en hamburguesas de calamar gigante almacenadas a una temperatura de 10 °C.

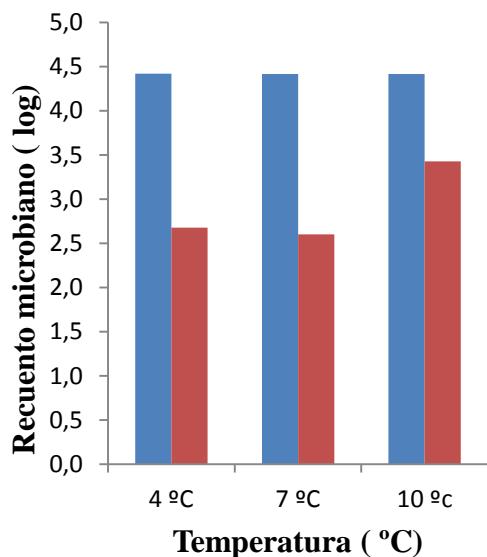
La Fig. 1, que se incluye a modo de ejemplo, muestra que la evolución de mesófilos y psicrótrofos es muy similar. Es bien sabido que la clasificación de los microorganismos por su temperatura de crecimiento es subjetiva y es posible que la especie crecida en ambas condiciones de cultivo sea la misma. Estudios preliminares, han demostrado que son las Psicrótrofos spp el grupo que tiende a predominar y limitar la vida útil de *Dosidicus Gigas*. (Lahoz, 2013). Evolución del crecimiento de los microorganismos a las distintas temperaturas recogida en el anexo I.

La Figura también muestra que, a 10 °C, el crecimiento de las enterobacterias en ningún momento es predominante en el producto. No obstante, cabe destacar que los recuentos de coliformes son muy elevados desde el inicio del estudio. Es previsible que el recuento tan elevado de estos microorganismos no se deba a la contaminación natural del calamar gigante, sino más bien a una recontaminación durante el procesado de las hamburguesas que, como hemos mencionado previamente, fue excesivamente artesanal. En cualquier caso, cuando se aadecue el proceso industrial mejorará significativamente la calidad higiénica del producto y disminuirán los recuentos de enterobacterias, confiriendo mayor relevancia todavía a la flora propia del calamar gigante. Es por ello

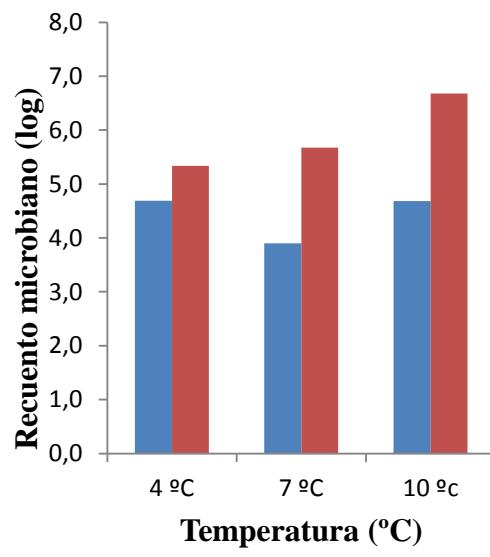
que, a pesar de que todos los estudios microbianos realizados para este trabajo han incluido al grupo de las enterobacterias, su significación práctica es mucho menor.

En la Figura 1, se observa además que al principio del almacenamiento no solo no aumenta el recuento de enterobacterias, sino que incluso puede disminuir. Este es un aspecto interesante que creemos merece una atención especial. La Figura 2, permite comparar el recuento inicial con el obtenido a las 48 horas de almacenamiento de todos los grupos microbianos a todas las temperaturas de refrigeración.

A



B



C

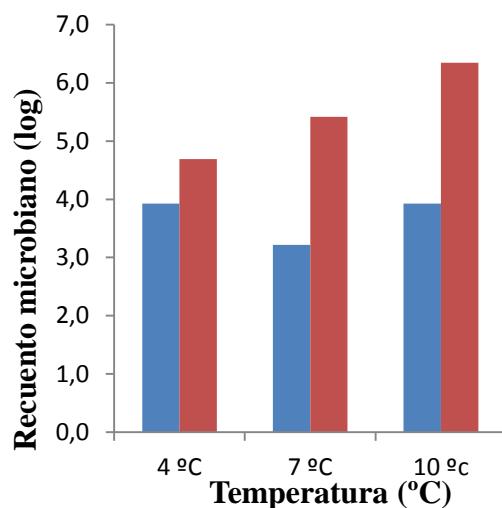


Figura 2. Recuentos microbianos de enterobacterias (A), Mesófilos (B) y psicrótrofos (C) a las (●) 0 horas y las (●) 48 horas de almacenamiento.

Como se observa en la Fig. 2, mientras que el recuento de mesófilos y psicrótrofos es siempre mayor después de 48 horas de almacenamiento, el de las enterobacterias disminuye.

La muerte celular de las enterobacterias al principio del almacenamiento a 4 °C fue muy similar a la producida a 7°C, sin embargo a 10 °C la disminución del recuento fue menor. A pesar de ello, el crecimiento de este grupo tampoco fue predominante en el producto a esta temperatura (Fig. 1). Esto indica que los psicrótrofos, que seguramente también crecen en el medio de los mesófilos, tienen mayor facilidad de adaptación a las nuevas temperaturas y crecen rápidamente durante el almacenamiento, mientras que las enterobacterias se adaptan con dificultad y en esta fase incluso mueren; esto explicaría que las células muertas son menores a 10 °C que a 4 y 7 °C.

Al margen de la anormalidad antes descrita, se observa que la evolución de los recuentos se adapta a la curva de crecimiento microbiano típica, con una fase de latencia inicial, una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria de crecimiento. La Figura 3, que se incluye también a modo de ejemplo, muestra con mayor detalle esta evolución. En la figura, se han incluido los resultados de las tres réplicas para mostrar la dispersión habitual de los resultados.

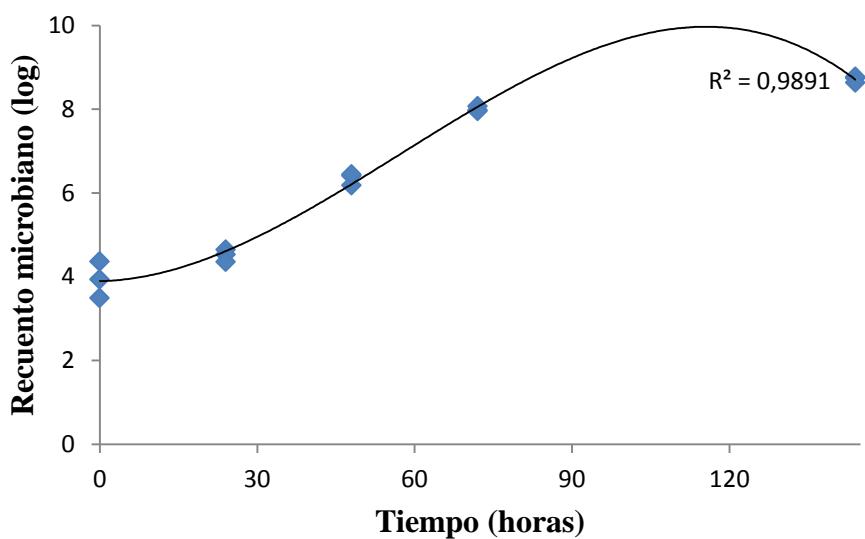


Figura 3. Curva de crecimiento de psicrótrofos en hamburguesas almacenadas a 10 °C.

En la Figura 3 se ha incluido una línea de regresión polinomial. Este tipo de regresión ajusta bien los valores, pero en la práctica es poco útil porque no tiene ninguna base teórica ni parámetros que puedan relacionarse con fenómenos biológicos.

Por este motivo, habitualmente se utilizan modelos matemáticos diversos para ajustar los recuentos de las curvas de crecimiento. No hay un acuerdo general sobre cuál de estos modelos es el más adecuado; por ello, para la consecución del primer objetivo parcial fue preciso evaluar los modelos más utilizados en la actualidad -modelo de Baranyi, modelo de Gompertz, modelo logístico y modelo de Gompertz modificado- para seleccionar el más adecuado a nuestros propósitos. La elección, se llevó a cabo en función de los siguientes valores:

Error Cuadrático Medio, que establece la discrepancia entre los valores observados y los predichos.

$B_f$ , factor de sesgo, representa el acuerdo entre los valores predichos y obtenidos experimentalmente

$A_f$ , factor de precisión, indica la exactitud media de los valores estimados, es decir, cuantifica entre predichos y observados

La Tabla 2. Muestra los parámetros estadísticos de cada uno de los modelos, para cada una de las temperaturas y grupos microbianos estudiados. A juzgar por los valores incluidos en la tabla, todos los modelos ajustan razonablemente bien las curvas obtenidas en todas las condiciones exploradas, si bien, globalmente el modelo de Gompertz modificado resultó el más adecuado; además, el modelo de Gompertz es uno de los más utilizados en la bibliografía por lo que su utilización puede favorecer la comparación de los resultados obtenidos en esta investigación con los de los demás investigadores.

Tabla 2. Valores ECM Bf y Af obtenidos con los distintos modelos matemáticos al modelizar los resultados de los recuentos microbianos

		Modelos probabilísticos:			
		Baranyi	Gompertz	Modelo logístico	Gompertz modificado
Mesófilos	4 °C	ECM	0,2150241	0,220433	0,189379518
		Bf	1,010091	1,0133141	1,011139539
		Af	1,0227049	1,0300165	1,025080403
		R <sup>2</sup>	0,9929	0,9899	0,9935
	7 °C	ECM	0,1329078	4,437E-05	0,208114633
		Bf	1,0088604	1,009314	0,99642823
		Af	1,0199211	1,0209467	1,008033112
		R <sup>2</sup>	0,9765	0,9842	0,9924
Enterobacterias	4 °C	ECM	0,5242736	0,4261588	0,799622959
		Bf	1,0272936	1,0174096	1,049341615
		Af	1,062062	1,0393485	1,113708676
		R <sup>2</sup>	0,8974	0,8754	0,9362
	7 °C	ECM	0,178993	0,0014741	4,27431E-05
		Bf	1,0032989	0,999754	0,99999762
		Af	1,0073915	1,00005503	1,000005322
		R <sup>2</sup>	0,9835	0,9531	0,953
Psicrófagos	4 °C	ECM	0,8494514	0,1448014	0,145273982
		Bf	0,9475719	1,0237597	1,022144283
		Af	1,1279679	1,05391	1,050194972
		R <sup>2</sup>	0,914	0,9476	0,9472
	7 °C	ECM	0,3725956	0,3713051	0,672784589
		Bf	1,0444846	1,0427061	1,056714475
		Af	1,1022148	1,0980227	1,131282185
		R <sup>2</sup>	0,9602	0,9593	0,9984
	10 °C	ECM	0,2111511	0,194599	0,149970927
		Bf	0,9887012	0,9900687	1,008186515
		Af	1,0257343	1,0225689	1,018398281
		R <sup>2</sup>	0,9117	0,9161	0,9463
Psicrófagos	7 °C	ECM	0,2315383	0,1641295	0,11798944
		Bf	1,0153583	0,9899194	1,011677954
		Af	1,0346685	1,0229139	1,026301336
		R <sup>2</sup>	0,9674	0,9774	0,9825
	10 °C	ECM	0,2750346	0,5982892	0,03793849
		Bf	0,9724018	1,0084666	1,002903989
		Af	1,0645786	1,0190311	1,006505174
		R <sup>2</sup>	0,8502	0,9399	0,8601

En definitiva, a partir de los parámetros incluidos en la Tabla 2 y considerando otro tipo de ventajas, antes mencionadas, decidimos utilizar finalmente el modelo de Gompertz modificado.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento de enterobacterias, mesófilos y psicrótrofos a distintas temperaturas (modelo de Gompertz modificado).

		<b>A</b>	<b>C</b>	<b>Rg</b>	<b>tlag</b>
<b>Enterobacterias</b>	<b>4 °C</b>	2,67003	2,9813	0,02942	100,333
	<b>7 °C</b>	6,27905	2,92086	0,16262	65,0717
	<b>10 °C</b>	4,25291	2,88766	0,1666	62,9235
<b>Mesófilos</b>	<b>4 °C</b>	4,59142	5,236	0,02525	29,729
	<b>7 °C</b>	3,82303	5,35452	0,05868	14,9947
	<b>10 °C</b>	4,68326	3,82818	0,10033	27,8649
<b>Psicrótrofos</b>	<b>4 °C</b>	3,9195	4,73049	0,03887	29,9098
	<b>7 °C</b>	3,37084	5,91916	0,06453	19,2377
	<b>10 °C</b>	3,89239	4,87921	0,0755	15,2301

A: Se trata del recuento inicial.

C: Corresponde a los ciclos que aumenta el recuento

Rg: Es la pendiente de la fase exponencial-ciclos/ minuto

Tlag: Corresponde a la duración de la fase lag

Como se desprende de la tabla, las fases de latencia disminuyen al aumentar la temperatura, salvo en el caso de los mesófilos, siendo las más bajas, a todas las temperaturas las del grupo de los psicrótrofos. Por el contrario, la velocidad de multiplicación aumenta con la temperatura de almacenamiento, pero también en este caso la mayor es siempre la del grupo de psicrótrofos. En resumen, previsiblemente siempre serán los psicrótrofos los limitantes de la vida útil del producto.

La Figura 4 el curso previsible de crecimiento, deducido de los parámetros del modelo, del grupo de los psicrótrofos.

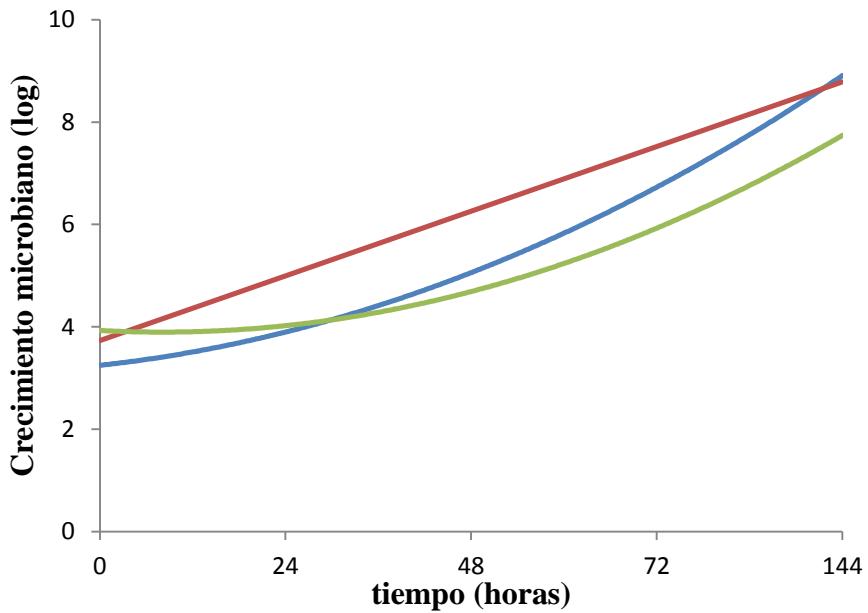


Figura 4. Crecimiento de Psicrótrofos a distintas temperaturas: (●) 4 °C, (●) 7 °C y (●) 10 °C. Datos obtenidos a partir de la media de 3 réplicas y modelizados mediante Gompertz modificado.

La Figura 4 muestra el recuento de psicrótrofos en la hamburguesa de calamar gigante, que presenta una fase de latencia, seguramente debida a la adaptación de los microorganismos a las temperaturas de almacenamiento, relativamente corta. Salvo a 4 °C, el crecimiento arranca prácticamente en la fase exponencial, hasta alcanzar la fase estacionaria con recuentos de 8-9 unidades logarítmicas.

### 5.1.2 Calidad organoléptica

*Dosidicus Gigas* presenta unas características organolépticas muy similares a las del pulpo. Es por ello que se utiliza para obtener sucedáneos a precios más asequibles. El calamar gigante presenta un alto nivel de nitrógeno básico volátil de manera natural. Ésto es debido a las altas concentraciones de amoniaco que contiene de forma natural y que utiliza para regular su flotabilidad. Además de sus altas concentraciones iniciales, los valores aumentan todavía más a lo largo del almacenamiento, debido a la actividad microbiana y a la desaminación de las proteínas. Con el fin de alcanzar el segundo objetivo parcial, se llevó a cabo el estudio de la evolución de la concentración de NBVT a las distintas temperaturas a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento.

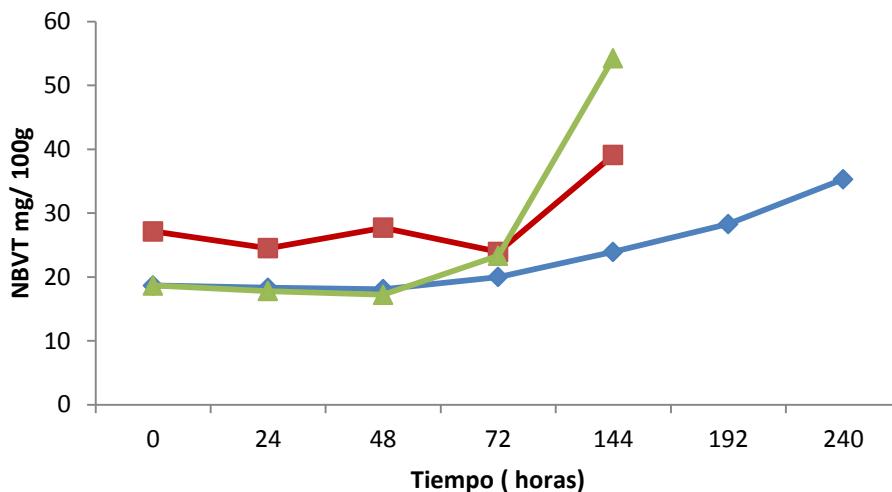


Figura 5. Evolución de la concentración de nitrógeno básico volátil total a lo largo del tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas: (●) 4 °C. (■) 7 °C y (▲) 10 °C

En la Fig. 5, se observa que los valores iniciales de nitrógeno básico volátil total son relativamente altos, dado que procedían de un potón ya marinado. A lo largo del almacenamiento se produce, tras una fase “lag” inicial, un aumento de la concentración de nitrógeno, posiblemente debida a la proliferación microbiana. Por otra parte, a pesar de que el aumento es claro a las tres temperaturas, se observa como a 10 °C el aumento es más rápido, lo que parece confirmar que la temperatura influye de manera indirecta, aumentando los recuentos microbianos. Al comparar los valores obtenidos a 10 °C con respecto a las otras dos temperaturas, una vez comienza el aumento del NBVT, se observa que la velocidad a la que se produce el incremento en uno de los primeros puntos de la fase de incremento de la concentración, es mucho más rápida a 10 °C que a 4 °C, donde el aumento de la concentración es muy paulatino.

La Figura 6 muestra, a modo de ejemplo, la evolución del contenido en NBVT de las hamburguesas almacenadas a 10 °C. En la figura, se incluyen los resultados de las tres réplicas con objeto de ilustrar la dispersión de los resultados.

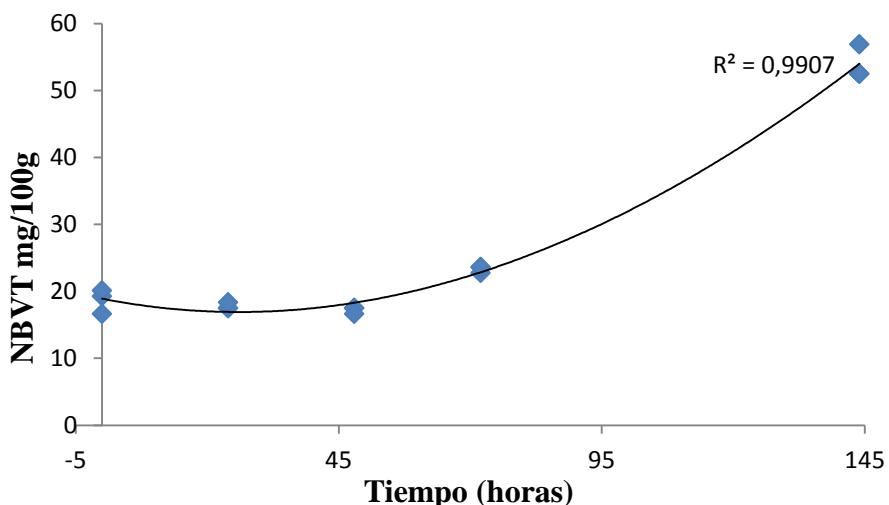


Figura 6. Evolución de la concentración de NBVT con el tiempo de almacenamiento a 10 °C. La figura incluye las tres réplicas de cada punto de muestreo.

La evolución de la concentración, podría modelarse simplemente con una regresión polinomial pero, como ya antes hemos mencionado, este tipo de regresiones es difícil de interpretar con la simple comparación de los parámetros de la fórmula. Decidimos utilizar para el ajuste el modelo de Gompertz modificado, con objeto de homogeneizar el análisis de los resultados.

La Tabla 4 muestra los parámetros de aumento de la concentración NVBT obtenidos ajustando los datos experimentales con el modelo de Gompertz modificado. La tabla incluye también los parámetros estadísticos que permiten apreciar la bondad de los ajustes.

Tabla 4. Parámetros de aumento del NBVT de las hamburguesas de potón almacenadas a distintas temperaturas. Modelo de Gompertz modificado.

	T <sup>a</sup>	A	C	Rg	tlag	ECM	Af	Bf	R
NBVT	4 °C	18,644	54,396	0,157	133,983	0,775	1,004	1,002	0,882
	7 °C	24,736	19,952	0,353	100,006	2,870	1,075	0,968	0,764
	10 °C	17,791	36,514	1,334	68,303	0,652	1,007	0,997	0,848

Como se observa en la tabla, los errores cuadráticos obtenidos son sensiblemente mayores a los calculados para las curvas de crecimiento, pero los parámetros Af y Bf son tan buenos como en aquel caso. Estos datos parecen indicar que el modelo es bueno

para nuestro propósito, pero que la evolución del NBVT es más variable que la de los recuentos microbiológicos.

La modelización de los resultados, al igual que en los recuentos microbianos, nos permite obtener los valores predecibles para cada situación, consiguiendo eliminar los errores instrumentales y los fallos cometidos en la realización del estudio. La Figura 7, muestra las curvas teóricas de evolución del NBVT a las tres temperaturas de almacenamiento investigadas.

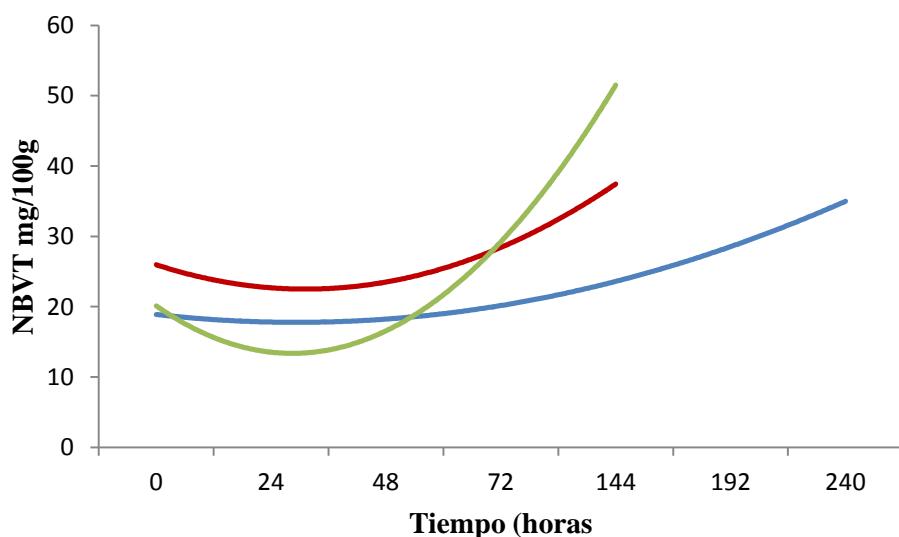


Figura 7. Evolución teórica (modelo de Gompertz modificado) de la concentración de NBVT con del tiempo de almacenamiento a: (●) 4 °C. (●) 7 °C y (●) 10 °C.

Además de los valores de nitrógeno básico volátil total, el grado de oxidación de los lípidos es otro parámetro determinante de la calidad organoléptica del producto. Para la consecución del tercer objetivo parcial estudiamos, como primera aproximación, la evolución de este parámetro durante su almacenamiento a 10 °C. Es de esperar, que a esta temperatura la velocidad de la oxidación sea la más rápida y por tanto nos permitiría conocer la importancia de este parámetro de la calidad.

Los resultados de oxidación se obtuvieron midiendo la absorbancia a 532 nm. Extrapolando los datos de la correspondiente curva patrón y utilizando un factor de conversión adecuado (2,884\*(ABS (532nm)/1,49379) obtuvimos los mg de malonaldehido por cada 100g de hamburguesa.

La Figura 8 muestra la evolución de los valores calculados. La figura, incluye también la curva de regresión polinomial que mejor se ajusta a los resultados.

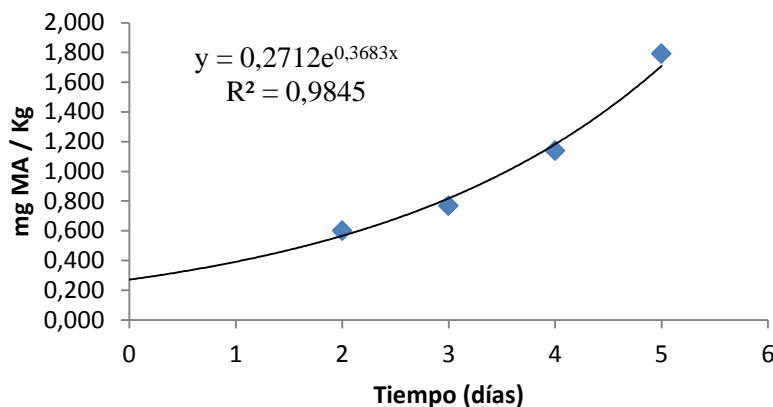


Figura 8. Evolución de la concentración de malonaldehido de hamburguesas de calamar gigante, almacenadas a 10 °C.

La Fig. 8 demuestra que el aumento de la oxidación sigue un curso exponencial y, lo que es más relevante en este trabajo, que la oxidación del producto en ningún momento condicionará la vida útil del producto. Por ello, y aunque mantuvimos congeladas las muestras obtenidas a las otras dos temperaturas, no consideramos necesario realizar su análisis.

## 5.2 Vida útil de las hamburguesas de calamar gigante.

Para la comercialización de las hamburguesas de calamar gigante en fresco es preciso conocer el tiempo máximo durante el cual, el producto presentará características aceptables y por tanto, el tiempo máximo de vida útil.

Para determinar la vida útil, es necesario establecer los valores máximos aceptables para cada uno de los parámetros considerados. Puesto que no existe ninguna normativa específica para este producto, decidimos utilizar, cuando fue posible, las recomendaciones de organismos y/o investigadores con prestigio en este campo. Por lo que respecta a los recuentos microbianos, se siguió el criterio recomendado por la ICMSF, que considera aceptables hasta  $10^6$  UFC/gramo, aunque nos parece importante destacar que, actualmente se están comercializando productos de la pesca con recuentos

superiores; mientras que, por lo que respecta al grado de oxidación, 40 mg MA/ 100g de hamburguesa; y en referente al contenido de NBVT, que tampoco está legislado para este producto, se fijó en 40 mg/100g de hamburguesa, dado que los textos especializados indican que concentraciones superiores confieren ya aromas desagradables. Obviamente, como ya hemos indicado y como se deduce de la Fig 8, el grado de oxidación producido a la temperatura más elevada de entre las investigadas se halla tan lejos del límite permisible que su consideración como parámetro limitante era irrelevante.

El cuarto objetivo consistía en buscar relaciones matemáticas que nos permitiesen discernir cual de los dos parámetros restantes (recuento microbiológico y concentración de NBVT) era el limitante de la vida útil. Para este propósito, se construyeron hojas de cálculo que, utilizando los modelos primarios previamente descritos, permitieran predecir los tiempos de almacenamiento en que se alcanzarían los recuentos microbianos y concentraciones de NBVT seleccionadas como máximos permisibles para cada temperatura estudiada y posteriormente, se intentó relacionar los tiempos calculados para las distintas temperaturas de almacenamiento. Las Figuras 9 y 10 muestran las mejores relaciones encontradas.

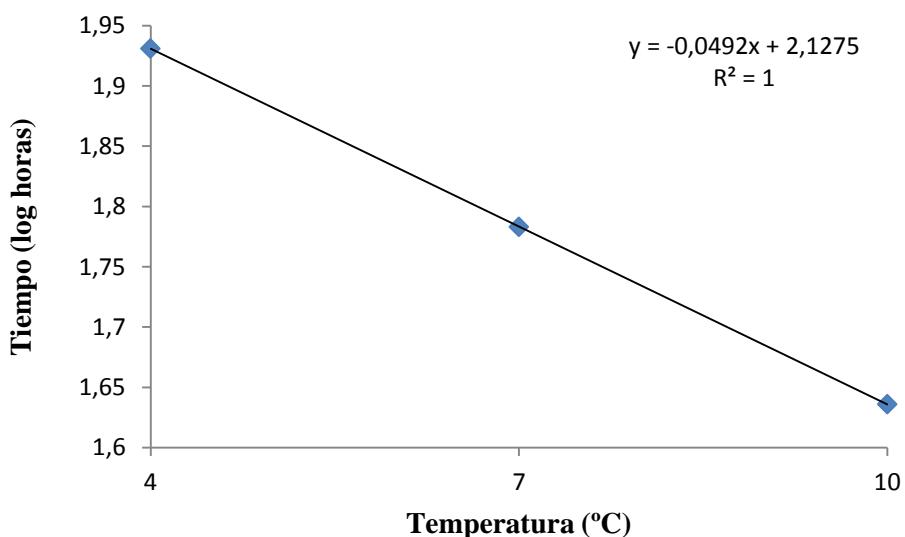


Figura 9. Relación entre el tiempo al cual se alcanzan recuentos de seis ciclos logarítmicos y la temperatura de almacenamiento.

La Figura 9 relaciona el tiempo necesario para que el recuento de psicrótrofos alcance 6 ciclos logarítmicos y la temperatura de almacenamiento. Como se observa en

la figura, existe una relación exponencial entre ambas variables. La ecuación de la recta de regresión obtenida, que tambien se incluye en la figura, nos permite calcular el tiempo máximo de almacenamiento para cualquier temperatura.

La Figura 10 relaciona el tiempo necesario para que las hamburguesas alcancen una concentración de NBVT de 40 mg / 100g a la temperatura de almacenamiento. Como se observa en la figura, tambien en este caso existe una relación exponencial entre ambas variables.

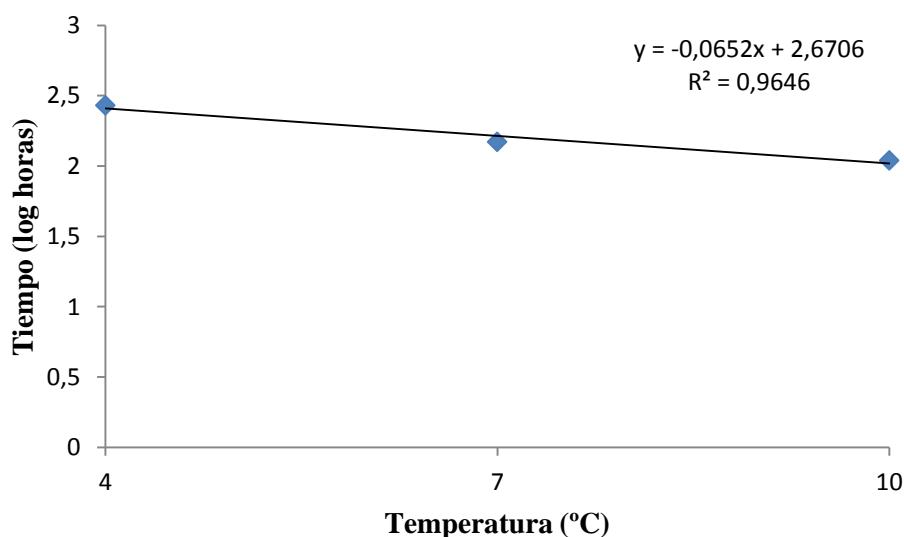


Figura 10. Relación entre la concentración máxima admisible de NBVT (40 mg MA/100g) y la temperatura de almacenamiento.

Comparando la pendiente de las líneas de regresión de las Figura 9 y 10 se puede concluir que la velocidad de generación de NBVT es menos termodependiente que el crecimiento microbiano.

Si no se consideran relevantes los resultados obtenidos en función de lo establecido por el ICMSF en cuanto a recuentos microbianos, la vida útil de las hamburguesas puede alargarse ligeramente hasta que la concentración de NBVT sea quien limite el tiempo de vida útil; a partir de los 40 mg MA/100g de hamburguesa, se produce un rechazo total por el consumidor debido a las características organolépticas del producto, siendo principal el olor que desprende.

Utilizando las ecuaciones que permiten calcular la vida útil de las hamburguesas tomando como referencia el recuento microbiano:

$$\log t = -0,0492 \cdot T + 2,1275$$

Y las que permiten calcularla tomando como referencia el contenido en NBVT:

$$\log t = -0,0652 \cdot T + 2,6706$$

Elaboramos la Tabla 5

Tabla 5. Predicción de la vida útil de las hamburguesas de potón de Zarafish en función del recuento microbiano y de la concentración de NBVT a temperaturas elegidas aleatoriamente.

Tiempo de vida útil (Horas)		
Temperatura ( °C )	Rec. Microbiano	Concentración NBVT
3	95,48	298,54
5	76,12	221,11
8	54,19	140,93
13	30,75	66,53
16	21,89	42,40
22	11,09	17,23
30	4,48	5,18
33,9	2,88	2,89
34	2,85	2,84
40	1,44	1,16

Tal como se muestra en la tabla 5, el factor limitante de la vida útil de las hamburguesas es el recuento microbiano hasta alcanzar 34 °C, siéndolo el NBVT por encima de ese valor. Obviamente, este hecho resulta anecdótico dado que en la cadena de frío nunca se alcanzan estas temperaturas, no obstante, resulta conveniente resaltar, que si las hamburguesas en algún momento alcanzasen esas temperaturas, en tan solo 1 hora aproximadamente, dejarían de ser comestibles, al menos aplicando nuestros criterios de calidad.

Por otra parte, se cree conveniente resaltar, aunque también se deduce de la discusión anterior, que los límites utilizados para los cálculos son subjetivos y que por tanto un industrial podría modificarlos a su gusto. Por ejemplo, un industrial podría tolerar recuentos microbianos mayores y menores contenidos de NBVT, y viceversa. Lógicamente podríamos, a partir de los modelos primarios desarrollados, elaborar tablas semejantes a la Tabla 5 para cualquier requerimiento del sector industrial.

## 6. CONCLUSIONES.

Las hamburguesas de Zarafish contienen inmediatamente tras su elaboración una excesivamente elevada carga microbiana, especialmente de enterobacterias.

El recuento de mesófilos totales y psicrótrofos siguen una cinética muy semejante, lo que parece indicar que las especies contaminantes son mayoritariamente especies psicrótrofas con un amplio rango de temperaturas de crecimiento.

El tiempo que tarda en alcanzarse un recuento máximo admisible es una función exponencial de la temperatura de almacenamiento.

El NBVT de las hamburguesas inmediatamente después de su fabricación es adecuado para su comercialización.

El grado de oxidación de las hamburguesas en nuestras condiciones de almacenamiento nunca será un factor limitante de la vida útil.

En las condiciones habituales de almacenamiento en refrigeración la vida útil del producto siempre vendrá determinada por la proliferación microbiana.

### **Recomendaciones para la industria:**

Mejorar las condiciones higiénicas durante la elaboración del producto.

Dado que la vida útil de producto es corta, incluso a la temperatura más baja investigada, sería conveniente que se añadiesen antimicrobianos más eficaces o mayor cantidad de las sustancias añadidas como saborizantes, por ejemplo ajo, que poseen cierta actividad antimicrobiana.

## **CONCLUSIONS.**

Zarafish's burguers immediately after preparation containing an excessively high microbial load, especially Enterobacteriaceae.

The total count of mesophilic and psychrotrophic follow a very similar kinetics suggesting that contaminant species are mainly psychrotrophic species with a wide range of growth temperatures.

The time taken to reach a maximum allowable count is an exponential function of storage temperature.

The NBVT burguers immediately after manufacture is suitable for preservation.

The degree of oxidation of the burguers in our storage conditions will never be a limiting factor of useful life.

In the usual conditions of refrigerated storage, the useful life of the product always is determined by microbial growth.

### **Recommendations for the industry:**

Improve hygienic conditions during processing of the product.

As the useful life of the product is short, even at the lowest temperature investigated, it would be desirable for more effective should be added antimicrobial or greater amount substances added as flavorings, for example garlic, which possess some antimicrobial activity.

## 7. APORTACIONES DE LA ASIGNATURA.

La realización de este trabajo me ha permitido afianzar los conocimientos y ganar confianza personal a la hora de solventar problemas y en el trabajo en laboratorio. Me ha permitido el aprendizaje del método científico, desarrollo de técnicas instrumentales y metodología de análisis tanto instrumental como de los datos obtenidos. Ademas me ha ayudado a consolidar los conocimientos adquiridos durante los cuatro años de grado, poniendo en práctica algunos de ellos.

También, este trabajo me ha permitido conocer y profundizar sobre el tema tratado, de manera diferente y más práctica que lo habitual en las clases. Cabe destacar, que este trabajo me ha ayudado a desarrollar mi capacidad de planificación en cuanto a trabajo se refiere, búsqueda de información y el desarrollo de informes científicos. En definitiva, me ha preparado para abordar el mundo laboral.

Todo este aprendizaje no podría haber sido posible sin la ayuda de mi Director D. Santiago Condón Usón, que me ha aportado su conocimiento paciencia y apoyo y entusiasmo para la realización de un estudio de investigación. Así mismo, agradecer, también, a mi otro Director J. Antonio Beltrán Gracia, por su apoyo y concienciación en el estudio y a Selene Pedróz, que ha mostrado todo su interés y compartido su conocimiento en el laboratorio para la realización de este trabajo.

Sugerencias de mejora:

- Determinar con anterioridad el tema del trabajo, así como el tutor asignado para facilitar la planificación del estudiante.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Castellanos-Martínez, S., y Gestal, C. (2013). Pathogens and immune response of cephalopods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 447:14-22.
- Chavarriás, M., (2013) El control microbiológico de hierbas aromáticas y especias. Consumer. [Visitado 28 09 2015]. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2013/05/16/216713.php>
- Comisión europea. Reglamento (CE) N° 1022/2008 de la Comisión de 17 de octubre de 2008, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2074/2005 en lo que respecta a los valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT).
- Comisión europea. Reglamento (CE) N° 853/2004, por el que se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- Cooley L.B, Krause S. (1980). pH Titrations of molluscan paramyosin at two different ionic strengths. *Biophysical Journal*. 32: 755-766.
- Cortés-Ruiz J.A y col. (2008). Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (*Dosidicus Gigas*) by acid dissolution and isoelectric precipitation. *Food Chemistry*. 110: 486-492.
- Duyar, H., y Eke, E. (2009). Production and quality determination of marinade from different fish species. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 8: 270-275.
- Fu, X. Y., Xue, C. H., Miao, B. C., Li, Z. J., Zhang, Y. Q. y Wang, Q. (2007). Effect of processing steps on the physico-chemical properties of dried- seasoned squid. *Food Chemistry*, 103: 287 – 294.
- Gómez Tomé, N., Modelización de la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.
- Huss, H. (1998). El pescado fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. FAO Fish-series. Technical paper 34

Ibarra, L.R. (2006). Efectos sobre la calidad y funcionalidad del músculo de manto de calamar gigante (*Dosidicus Gigas*) sometido al almacenamiento en hielo. Tesis Profesional. Instituto tecnológico de Tepic. Nayarit. México.

ICMSF (1986). International Commission on Microbiological Specifications for foods. In: ICMSF (eds), Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, Vol. 2, (2nd ed). University of Toronto Press, Toronto, Canadá.

Instituto de promoción de exportaciones e inversiones (PRO ECUADOR). (2014). *Dosidicus Gigas* en España [Visitado 17 06 2015]. Disponible en: [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2014/11/PROEC\\_PPM2014\\_CALAMAR\\_ESPA%C3%91A.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2014/11/PROEC_PPM2014_CALAMAR_ESPA%C3%91A.pdf)

Kilinc, B., y Cakli, S. (2005). Determination of the shelf life of sardine (Sardina pilchardus) marinades in tomato sauce stored at 4°C. Food Control. 16:639-644.

Kreuzer, R. (1984). Cephalopods: handling, processing and products. FAO Fisheries. Technical paper 254.

Lahoz, R., (2013). Optimización de la elaboración de salpicón de potón en conserva. Trabajo fin de grado. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

MAGRAMA (2015). Informe del Consumo de Alimentación en España 2014 [visitado 05 07 2015]. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2014\\_tcm7-382148.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2014_tcm7-382148.pdf)

Nigmatullin, Ch. M., Nesis, K. N. y Arkhipkin, A. I. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus Gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). Fisheries Research, 54: 9 - 19.

Otowell, S., y Hamann, D. (1979). Textural characterization, on of squid (*Loligo pelalei* L.): instrumental and panel evaluations. J. Food Sci., Vol 44, 6: 1636-1643.

Pino García. (2001). Instituto Tecnológico Agroalimentario. Tendencias tecnológicas en el sector agroalimentario. [Visitado 03 10 2015]. Disponible en:

<http://www.minetur.gob.es/Publicaciones/Publicacionesperiodicas/EconomiaIndustrial/RevistaEconomiaIndustrial/342/4AngelDelpino.pdf>

Román, J., Arpe Muñoz, C., Urrialde, R., Fontecha, J., Murcia, M<sup>a</sup> A., Gómez, C., Villarino, A., (2003). Nuevos alimentos para nuevas necesidades. Nutrición y salud. Madrid: Instituto de salud pública.

Rosas, Z.G. (2007). Caracterización parcial de sólidos solubles presentes en el agua de cocción del músculo de calamar gigante. Tesis Profesional. Instituto tecnológico de los Mochis. Silona. México.

Sallam, K. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18: 566 – 575

Sheard, P., y Tali, A. (2004). Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yiel and tendernss of cooked pork loin. *Meat Sciencie*, 68: 305-311.

Zhu, J., Jia, J., Li, X., Dong ,L. y Li, J. (2013). ESR studies on the thermal decomposition of trimethylamine oxide to formaldehyde and dimethylamine in jumbo squid ( *Dosidicus Gigas* ) extract. *Food Chemistry*, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.083>